

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.ЮЩУК, д.м.н., проф., акад. РАН

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

5

сентябрь—октябрь

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

Индексы подписки на 2018 год:

Каталог Агентство «Роспечать» 71436 (I полугодие 2018 г.).
Объединенный каталог «Пресса России» 10277 (I полугодие 2018 г.),
16729 (годовая подписка)

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

<http://www.jmicrobiol.com>

Подписано в печать 13.09.17. Выход в свет 03.10.17.
Формат 70x108 1/16. Печать офсетная. Заказ

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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© Ю.Ю.ФИЛИПОВА, А.Л.БУРМИСТРОВА, 2017

Ю.Ю.Филиппова, А.Л.Бурмистрова

КОГНИТИВНАЯ ОСЬ СТАРОСТИ: ВОСПАЛЕНИЕ — МИКРОБИОТА ТОНКОГО КИШЕЧНИКА

Челябинский государственный университет

Цель. Выявить взаимосвязь когнитивной дисфункции у людей пожилого возраста с системным воспалительным профилем и структурой микробиоты тонкого кишечника. **Материалы и методы.** В исследование были включены 42 человека пожилого возраста. По результатам оценки психического статуса все обследованные были разделены на 2 группы: 20 человек с умеренными когнитивными расстройствами — группа «активное долголетие» и 22 человека, с выраженной когнитивной недостаточностью — группа «милосердие». У всех лиц пожилого возраста определяли системный воспалительный статус и структуру и количественный состав микробиоты тонкого кишечника с помощью метода газовой хроматографии масс-спектрометрии микробных маркеров. **Результаты.** Определена взаимосвязь между системным уровнем цитокинов и структурой микробиоты тонкого кишечника у людей пожилого возраста с разным когнитивным статусом. Впервые обнаружены значимые корреляции между концентрацией провоспалительного цитокина интерлейкина-6 в плазме крови, количеством микроорганизмов *Propionibacterium jensenii*, *Moraxella* spp., *Bacillus cereus* и *Fusobacterium* spp. в тонком кишечнике и степенью выраженности когнитивной несостоятельности у лиц пожилого возраста. **Заключение.** Полученные показатели могут быть использованы в качестве предиктивных биомаркеров когнитивной дисфункции у пожилых людей.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 3—9

Ключевые слова: цитокины, микробиота тонкого кишечника, пожилые люди, когнитивная несостоятельность

Yu. Yu. Filippova, A. L. Burmistrova

COGNITIVE AXIS OF AGING: INFLAMMATION — MICROBIOTA OF SMALL INTESTINE

Chelyabinsk State University, Russia

Aim. Detect connection between cognitive dysfunction in senior people with systemic infection profile and small intestine microbiota structure. **Materials and methods.** 42 senior individuals were included into the study. All the examined have been divided into 2 groups based on the results of psychic status: 20 individuals with moderate cognitive disorders — «active longevity» group and 22 individuals with pronounced cognitive deficiency — «mercy» group. Systemic inflammation status and structure and quantitative composition of microbiota of small intestine was determined in all the senior individuals using gas chromatography mass-spectrometry of microbial markers. **Results.** Interconnection between systemic level of cytokines and microbiota structure of small intestine in senior people with various cognitive status was determined. Significant correlations between levels of pro-inflammatory cytokine IL-6 in blood plasma and quantity of *Propionibacterium jensenii*, *Moraxella* spp., *Bacillus cereus* and *Fusobacterium* spp. in small intestine and the degree of cognitive failure were detected for the first time. **Conclusion.** The parameters obtained could be used as predictive biomarkers of cognitive dysfunction in senior people.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 3—9

ВВЕДЕНИЕ

Старение — это естественный мультифакторный феномен, характеризующийся накоплением дегенеративных процессов, которые, в свою очередь, поддерживаются многочисленными изменениями или повреждениями молекулярных механизмов клеточных функций [13]. Одним из наиболее известных эффектов старения является нарушение регуляции функций иммунной системы в результате дефектов в инициации и завершении иммунных реакций — иммунное старение. Иммунное старение сопровождается низкоградированным хроническим провоспалительным состоянием во многих тканях, характеризующимся повышенной продукцией провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и TNF- α , острофазовых белков, активных форм кислорода и аутоантител. Это провоспалительное состояние является весьма существенным фактором риска развития патофизиологических процессов и смертности среди пожилых людей, так как большинство, если не все, возраст-ассоциированные заболевания, включая нейродегенеративные (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз и деменция), имеют воспалительный патогенез [Franceschi C. et al., 2014]. В настоящее время «провоспалительный профиль старости» все чаще связывают с изменением композиции кишечной микробиоты при старении [Kim K.A. et al., 2016]. Выдвинута концепция и растет количество доказательств, что микробиота кишечника, иммунная, эндокринная, автономная нервная и кишечная нервная системы, образуя взаимозависимые сетевые системы, формируют ось «микробиота-кишечник-мозг» [4]. Несмотря на значительное количество работ, посвященных изучению функциональных изменений оси «микробиота-кишечник-мозг» в течение жизни, а именно при решении таких вопросов, как здоровье/болезнь/старение организма, развитие когнитивных нарушений и возраст-ассоциированных заболеваний, большинство исследований сосредоточено на изучении фекальной микробиоты толстого кишечника. В то же время, в последние 10 лет представлен ряд доказательств о фундаментальной роли тонкого кишечника (ТК) и его эндогенной микробиоты в физиологии человека: 1) в метаболическом статусе — в ТК происходят основные события переваривания и абсорбции питательных веществ, которые обеспечивают приблизительно 90% общей энергии, получаемой из пищи; 2) в иммунном гомеостазе — большая масса лимфоидной ткани (кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань и Пейеровы бляшки), представленной в подвздошной кишке, гарантирует кофункционирование микробиоты и иммунной системы хозяина в мутуалистическом режиме [5].

Как обсуждается в последние годы, кишечная микробиота способна влиять практически на все функции организма, в том числе, выступать в качестве модулятора пластичности мозга, его когнитивных функций и в целом поведения персоны в ходе старения [9]. Вопрос о том, влияет ли хроническое воспаление на изменение структуры микробиоты или изменения композиции кишечной микробиоты при старении и развитии возраст-ассоциированных заболеваний приводят к «провоспалительному профилю старости», остается открытым. В данной работе мы оценили взаимосвязь между системным воспалительным профилем и структурой микробиоты тонкого кишечника у пожилых людей с разным ментальным статусом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 42 человека пожилого возраста, проживающих в Челябинском геронтологическом центре. Средний возраст обследованных составил 79 ± 5 лет. Всем пожилым людям врачами-клиницистами центра был проведен мониторинг когнитивных нарушений с использованием шкалы «Mini Mental State Examination» и классификации стадий дисциркуляторной энцефалопатии Н.Н. Яхно и др. (2003). По результатам оценки психического статуса все обследованные были разделены на две группы: 20 человек с умеренными когнитивными расстройствами — группа «активное долголетие» (А/Д) и 22 человека с выраженной когнитивной недостаточностью, проявляющейся, в основном, сосудистой деменцией — группа «милосердие» (М). Пожилые люди обеих групп имели одинаковые возраст-ассоциированные заболевания: кардиоваскулярные, бронхолегочные, заболевания желудочно-кишечного тракта и опорно-двигательного аппарата. При этом из исследованных были исключены индивидуумы с ожирением, онкологическими заболеваниями, болезнью Паркинсона и Альцгеймера, врожденными нарушениями центральной нервной системы.

Группу сравнения составили случайным образом отобранные 19 штатных доноров крови Челябинской областной станции переливания крови — группа «доноры» (Д). Средний возраст — 39 ± 4 года. Исследование было одобрено этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016.). Все индивидуумы, которые согласились принять участие в исследовании, подписали форму информированного согласия перед процедурой взятия крови.

Концентрацию цитокинов IL-1 β , IL-18, IL-6, IL-10, IFN- γ и TNF- α оценивали в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа наборами реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Для изучения структуры и количественного состава микробиоты тонкого кишечника определяли специфические химические маркеры микроорганизмов (жирные кислоты, альдегиды, спирты и стерины) непосредственно в периферической крови с помощью метода газовой хроматографии масс-спектрометрии микробных маркеров (ГХ-МСММ), который позволяет выявить более 50 родов/видов микроорганизмов [10]. Метод детектирования микроорганизмов по маркерным жирным кислотам сходен с генетическим анализом, поскольку состав жирных кислот детерминирован в ДНК. Это обстоятельство определяет возможность родового или видового анализа инфекций и дисбиозов на преобладающем фоне биологической жидкости непосредственно в клиническом материале [8]. Приготовление образцов и подсчет результатов проводили, как описано в [10]. Сорок микролитров крови высушивали при добавлении равного по объему количества метанола и подвергали кислую метанолизу в 1М HCl в метаноле в течение 1 часа при 80°C. На этой стадии происходило освобождение жирных кислот и альдегидов из сложных липидов микроорганизмов и других клеток и жидкостей в виде метиловых эфиров и диметилацеталей. Эти компоненты двукратно экстрагировали 200 мкл гексана, высушивали и обрабатывали в течение 15 мин при 80°C 20 мкл N,O-бис (триметилсилил)-трифторацетамидом для получения триметилсилильных эфиров окси-кислот и стиролов. Полученную смесь эфиров вводили в инжектор газового хроматографа Маэстро ГХ 7820 (ООО «Интерлаб», Россия) с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975 (США). Образец был хроматографически разделен на капиллярной колонке HP-5ms Hewlett-Packard. Условия хроматографического разделения: начальная температура

130°C, выдержка при начальной температуре 0,5 мин, нагрев температуры со скоростью 70/мин до 320°C, выдержка при конечной температуре 6 мин. Режим селективных ионов. Газ-носитель гелий, поток 1,2 мл/мин в режиме без деления потока. В результате проведенных исследований получали хроматограммы жирных кислот и других продуктов жизнедеятельности микробных сообществ тонкого кишечника, которые были соотнесены с соответствующим типом и количеством микроорганизмов с помощью программы, разработанной Осиповым Г.А. [10]. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерометиловый эфир тридекановой кислоты. Чувствительность метода составляет 10^4 КОЕ/мл.

В ходе статистической обработки данных использовали порядковые статистики и критерии: для оценки центральной тенденции — расчет медиан и 25 — 75 квартилей, для оценки значимости межгрупповых различий — критерий Краскела — Уоллиса с апостериорными парными сравнениями по Ковверу — Инману. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,001$. В качестве разведывательной техники был применен многомерный эксплораторный анализ методом нелинейных главных компонент для количественных показателей по алгоритму CATPCA. Все расчеты выполнены в пакетах SPSS for Windows (v. 15.0., SPSS Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения системного воспалительного профиля был измерен уровень цитокинов IL-1 β , IL-18, IL-6, IL-10, IFN- γ и TNF- α в плазме крови доноров и пожилых людей с наличием/отсутствием когнитивной недостаточности. Результаты показали, что у пожилых людей, вне зависимости от когнитивного статуса, был значимо повышен системный уровень IL-6 и TNF- α по сравнению с аналогичными показателями здоровых доноров. При сравнении лиц пожилого возраста с наличием/отсутствием когнитивной дисфункции обнаружено, что у людей с выраженной когнитивной несостоятельностью (группа М) наблюдается статистически значимое повышение концентрации IL-6 в плазме крови, по сравнению с индивидуумами группы без когнитивных расстройств (группа А/Д). В уровнях остальных цитокинов статистически значимых различий не обнаружено.

Изучение структуры и количественного состава микробиоты тонкого кишечника на основе определения специфических липидных маркеров микроорганизмов в периферической крови показало, что у пожилых людей наблюдается дефицит общего числа изученных микроорганизмов в тонком кишечнике, достигая статистической значимости для группы людей с когнитивной недостаточностью ($2,3 \times 10^9$ КОЕ/мл: $2,4 \times 10^9$ КОЕ/мл: $2,8 \times 10^9$ КОЕ/мл для групп М: А/Д: Д соответственно). Данный дефицит был обусловлен значимым снижением количества микроорганизмов типа Actinobacteria, а также тенденцией к снижению числа бактерий типа Firmicutes. Количество микроорганизмов типа Fusobacteria, наоборот, было статистически значимо повышено у людей группы «милосердие», по сравнению с аналогичным показателем группы «доноров». В тонком кишечнике пожилых людей группы «активное долголетие» также был повышен уровень бактерий типов Bacteroidetes и Proteobacteria по сравнению с результатами здоровых индивидуумов. При сравнении показателей у людей пожилого возраста с разным когнитивным статусом значимые различия наблюдались только в количестве представителей типа Fusobacteria, которое было понижено в группе пожилых людей с выраженной когнитивной дисфункцией.

Для оценки взаимосвязи и интегрального вклада цитокинов плазмы крови и структуры сообщества бактерий тонкого кишечника в различия между группами молодых лиц и пожилых людей с разным когнитивным статусом был использован нелинейный анализ главных компонент по алгоритму САТРСА с наложением на показатели данных о разделении групп в зависимости от возраста (молодые/пожилые) и степени когнитивных расстройств (с наличием/отсутствием когнитивной недостаточности). В результате анализа главных компонент были выделены три паттерна взаимосвязанных показателей (ГК1, ГК2, ГК3), объясняющие в сумме 37,2% общей изменчивости показателей.

В первый паттерн (ГК1), объясняющий 15,9% общей дисперсии, с высокой силой связи ($>0,5$) вошли показатели цитокинов плазмы крови IL-6 и TNF- α и представителей микробиоты тонкого кишечника *Prevotella* spp., *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Fusobacterium* spp. и *Alcaligenes* spp. Показатели, вошедшие в этот паттерн, позволяют разделить обследуемых людей на молодых доноров и лиц пожилого возраста (вне зависимости от когнитивного статуса). При этом показатели *Bifidobacterium* spp. и *Eubacterium* spp. были статистически значимо снижены, а остальные показатели первого паттерна — значимо повышены в группах пожилых людей, по сравнению с данными группы доноров.

Основу второго паттерна (ГК2; 11,2% общей изменчивости показателей) составили показатели цитокинов плазмы IL-1 β , IL-18 и IL-10, имеющие высокую силу корреляционных связей между собой (значения показателей $>0,9$) и низкую корреляцию с показателями микробиоты тонкого кишечника.

Третий паттерн взаимосвязанных показателей (ГК3; 10,1% общей дисперсии) позволил разделить пожилых людей в зависимости от когнитивного статуса. В него с высокой положительной нагрузкой вошли показатели IL-6, *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus aureus* и *Campylobacter mucosalis*; с высокой отрицательной нагрузкой — *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium jensenii* и *Moraxella* spp., а также *B. cereus* и *Fusobacterium* spp. — со средней силой связи. При этом уровень IL-6 был статистически значимо повышен, а количество микроорганизмов *P. jensenii*, *Moraxella* spp., *B. cereus* и *Fusobacterium* spp. значимо снижено у людей с выраженными когнитивными расстройствами (группа М) по сравнению с лицами пожилого возраста без значительных когнитивных нарушений (группа А/Д). Изменения остальных показателей, вошедших в третий паттерн, не достигали статистической значимости.

ОБСУЖДЕНИЕ

В этой статье мы рассмотрели возраст-ассоциированные различия в системном воспалительном статусе и структуре микробиоты тонкого кишечника, а также вклад данных показателей в развитие когнитивной недостаточности у пожилых людей. Нами обнаружено статистически значимое повышение системного уровня провоспалительных цитокинов (IL-6 и TNF- α) у пожилых людей, что согласуется с концепцией развития с возрастом системного хронического низкоградуированного воспаления [Franceschi C. et al., 2014]. Системный воспалительный уровень этих цитокинов у лиц пожилого возраста коррелировал с изменением структуры сообщества микробов тонкого кишечника: наблюдалось снижение количества бактерий типов Firmicutes (особенно бактерий рода *Eubacterium* spp.) и Actinobacteria (рода *Bifidobacterium* spp.), по сравнению с молодыми донорами. Освободившуюся нишу заняли микроорганизмы типов Fusobacteria, Bacteroidetes и Proteobacteria. Таким образом, нами показано, что в тонком кишечнике пожилых людей также, как и

в фекальной микробиоте [12], происходит изменение соотношения типов Bacteroidetes/Firmicutes в сторону увеличения Bacteroidetes. Снижение количества бифидобактерий, которые являются важными пробиотиками, участвующими в поддержании гомеостаза кишечника и предотвращении инфекции [2], и увеличение числа «патобионтов», таких как *C. perfringens*, *B. cereus*, *Fusobacterium* spp. и *Alcaligenes* spp., может являться ответом на системное воспаление или одним из его триггеров [7]. Интересно отметить, что показатели микробиоты тонкого кишечника имели корреляционные связи только с IL-6 и TNF- α , тогда как системный уровень остальных исследуемых цитокинов (IL-1 β , IL-18 и IL-10 и IFN- γ) образовывал обособленный кластер, абсолютно не взаимосвязанный со структурой микробиоты.

При сравнении уровня системного воспаления в группах людей пожилого возраста обращает на себя внимание, что у пожилых людей без серьезных когнитивных нарушений концентрация в плазме всех исследуемых цитокинов (как провоспалительных, так и IL-10) была выше, чем у доноров, т.е. можно говорить о «сбалансированном» хроническом низкоградуированном воспалении. Для лиц пожилого возраста с выраженными когнитивными расстройствами характерен высокий уровень только провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α , по сравнению с донорами, концентрация остальных исследуемых цитокинов была ниже или равна показателям доноров. Обращает на себя внимание, что у индивидуумов с выраженными когнитивными нарушениями обнаружен статистически значимо высокий системный уровень IL-6, по сравнению с пожилыми людьми без когнитивной дисфункции. Известно, что высокий системный уровень IL-6 является сильным предиктором развития сердечно-сосудистых заболеваний, сосудистой деменции и смертности у людей пожилого и старческого возраста [3]. Ранее нами было показано [1], что такая воспалительная реакция может быть обусловлена, в том числе, эндокринными изменениями: в ответ на физиологический уровень адренокортикотропного гормона у пожилых людей с сосудистой деменцией вырабатывается избыточное количество кортизола. По данным Gupta D. et al. это может привести к развитию хронического стресса и к дестабилизации областей мозга, отвечающих за когнитивные функции (префронтальной коры, паравентрикулярных нейронов, гипокампа). Такие изменения, в свою очередь, могут способствовать развитию депрессии, когнитивных расстройств и болезни Альцгеймера у пожилых людей [6].

Филотипическая структура микробиоты тонкого кишечника в целом не отличалась в разных группах пожилых людей, однако наблюдались значимые различия в видовом/родовом составе: количество микроорганизмов *P. jensenii*, *B. cereus*, *Moraxella* spp. и *Fusobacterium* spp. было значимо снижено у людей с выраженными когнитивными расстройствами. Наибольший интерес представляют данные о снижении числа *P. jensenii*, которые наряду с *Propionibacterium fredenreichii* выделяют вещества, обладающие противовоспалительными, антибактериальными и антимуtagenными свойствами, а также участвует в производстве пропионовой кислоты и витамина B₁₂, дефицит которого может приводить к неврологическим расстройствам [11]. Полученные нами результаты позволяют предположить, что сигнатура бактериального сообщества тонкого кишечника в ассоциации с высоким системным уровнем IL-6 и когнитивной несостоятельностью у пожилых людей могут презентовать функциональную ось: микробиота тонкого кишечника-иммунная система-мозг. Кроме того, полученные нами показатели могут быть использованы в

качестве биомаркеров для диагностики нарушений когнитивной несостоятельности в пожилом возрасте и для конструирования психобиотиков на основе нейроактивных компонентов и штаммов пробиотиков, способных снижать уровень провоспалительных цитокинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю., Михайлова А.С. Нейро-иммуноэндокринная ось у людей пожилого возраста с разным качеством жизни. Российский иммунологический журнал. 2015, 9 (18): 198-200.
2. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б. и др. Метаболический профиль бифидофлоры при различных микрoэкологических состояниях биотопа толстого кишечника человека. Журн. микробиол. 2017, 1: 3-11.
3. Bruunsgaard H. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in elderly populations. Eur. Cytokine Netw. 2002, 13 (4): 389-391.
4. Collins S.M., Surette M., Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. Nat. Rev. Microbiol. 2012, 10 (11): 735-742.
5. El Aidy S., van den Bogert B., Kleerebezem M. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. Curr. Opin. Biotechnol. 2015, 32: 14-20.
6. Gupta D., Morley J.E. Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging. Compr. Physiol. 2014, 4 (4): 1495-1510.
7. Hollister E.B., Gao C., Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. Gastroenterology. 2014, 146 (6): 1449-1458.
8. Larsson L. Determination of microbial chemical markers by gas chromatography-mass spectrometry — potential for diagnosis and studies on metabolism in situ. APMIS. 1994, 102: 161-169.
9. Leung K., Thuret S. Gut microbiota: A modulator of brain plasticity and cognitive function in aging. Healthcare. 2015, 3 (4): 898-916.
10. Osipov G.A., Boiko N.B., Fedosova N.F. et al. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces. Microbial. Ecol. Health Dis. 2009, 21: 159-171.
11. Rai R.V., Bai J.A. Beneficial microbes in fermented and functional foods. CRC Press. 2015, 551-571.
12. Saraswati S., Sitaraman R. Aging and the human gut microbiota—from correlation to causality. Front. Microbiol. 2014, 5: 764.
13. Wagner K.H., Cameron-Smith D., Wessner B. et al. Biomarkers of aging: From function to molecular biology. Nutrients. 2016, 8 (6): 338.

Поступила 25.05.17

Контактная информация: Филиппова Юлия Юрьевна, к.б.н.,
454001, Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129, р.т. (351)799-71-76

БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ: АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ПРИНЦИПЫ

¹Ставропольский противочумный институт, ²Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в городе-курорте Сочи

В статье рассмотрены актуальные вопросы обеспечения биологической безопасности массовых мероприятий. В соответствии со своим целевым и содержательным наполнением выделены два взаимосвязанных и дополняющих друг друга направления работы в рамках системы надзора и контроля в области биологической безопасности — меры по профилактике чрезвычайных ситуаций и меры по обеспечению готовности к чрезвычайным ситуациям. Проанализированы действия отдельных функциональных элементов системы относительно сопутствующих эпидемиологических рисков, ориентированных на их снижение и контроль. Подготовлена определительная база для принципов обеспечения биологической безопасности (рациональность, компетентность, оперативность, гибкость, управляемость, превентивность, согласованность), которые рассматриваются в качестве детерминант решаемых задач в периоды подготовки и проведения массовых мероприятий.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 10—17

Ключевые слова: массовые мероприятия, биологическая безопасность, санитарно-эпидемиологическое благополучие, опасные биологические факторы, чрезвычайная ситуация

D.V.Efremenko¹, O.V.Maletskaia¹, V.G.Orobey², V.I.Efremenko¹

BIOLOGICAL SAFETY OF MASS ACTIONS: TOPICAL ISSUES AND PRINCIPLES

¹Stavropol Research Institute for Plague Control, ²Territory Department of Rospotrebnadzor for the Krasnodar Region at City-Resort Sochi, Russia

Topical issues of ensuring biological safety of mass actions are considered in the article. According to the purpose and content are allocated two interdependent and supplementing each other within the system of supervision and monitoring of biological safety — the measures for prophylaxis of emergency situations and the measures for ensuring readiness for emergency situations. Actions of separate functional elements of system of rather accompanying epidemiological risks focused on their decrease and monitoring are analyzed. The attributive base is developed for the principles of ensuring biological safety (rationality, competence, efficiency, flexibility, controllability, preventiveness, coherence) which are considered as determinants of solvable tasks during the periods of preparation and holding mass actions.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 10—17

Key words: public events, biological safety, sanitary-epidemiological welfare, hazardous biological factors, emergency situations

Исторически понятие биологическая безопасность ассоциировалось в основном с защищенностью работающего персонала и окружающей среды от воздействия патогенных биологических агентов (ПБА) в рамках выполнения экспериментальных, диагностических и производственных работ, что достигается с помощью организационных мероприятий, использования инже-

нерно-технических средств и специальной одежды. Новое развитие эта проблема получила в серии публикаций Онищенко Г.Г. и др. [10, 11, 12]. Авторским коллективом было представлено научное обоснование дифференцирования термина биологическая безопасность в современных условиях на узкий (исторический) и широкий варианты смысловой трактовки, для последнего разработаны концептуальная и терминологическая (понятийная) основы. Биологическая безопасность в широком формате (смысле) определяется как состояние защищенности населения (личности, общества, государства) от прямого и/или опосредованного через среду обитания (производственная, социально-экономическая, геополитическая сфера, экологическая система) воздействия опасных биологических факторов. К опасным биологическим факторам, в свою очередь, относятся не только ПБА, но и представители флоры и фауны, контаминированные биотические и абиотические объекты, а также процессы — эпидемический, эпизоотический, эпифитотический, способные нанести вред отдельному индивидууму и популяции в целом [10].

Таким образом, биологическая безопасность в широком смысле понимания затрагивает сразу несколько сфер деятельности человека. Как следствие ее обеспечение должно строиться на основе межведомственного взаимодействия и осуществляться в целях профилактики и обеспечения готовности к чрезвычайным ситуациям (ЧС) биологического характера (или ЧС в области обеспечения биологической безопасности). Ранее в Международных медико-санитарных правилах 2005 г. (ММСП-2005) было дано определение ЧС в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение — экстраординарное событие, представляющее риск для здоровья населения в других государствах в результате международного распространения болезни, что может потребовать скоординированных международных ответных мер. Данные понятия не являются полностью тождественными, хотя и близки по смыслу. ЧС биологического характера не классифицируется, как ЧС в области общественного здравоохранения, имеющая международное значение, если отсутствует потенциал для трансграничной передачи инфекции (например, массовое отравление токсинами биологического происхождения). Однако ЧС в области обеспечения биологической безопасности всегда характеризуется большим социально-экономическим ущербом, представляющим (и это — обязательное условие) угрозу на национальном и наднациональном уровне [9 — 12]. В санитарно-эпидемиологических правилах «Санитарная охрана территории Российской Федерации. СП 3.4.2318-08» (с изменениями на 29.11.2016), разработанных в рамках работы по имплементации ММСП-2005, пересмотрен и актуализирован перечень инфекционных (паразитарных) болезней, которые могут привести к возникновению ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения (этот термин имеет фактически то же значение, что и ЧС в области общественного здравоохранения), требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории РФ.

Для массовых мероприятий характерным является возрастание числа контактов среди населения, повышенные нагрузки на объекты социальной инфраструктуры, что с эпидемиологической точки зрения определяет предпосылки активизации механизмов передачи инфекционных патогенов [17, 18]. Во время международных массовых мероприятий, особенно трансконтинентального значения, реальную опасность представляет возможный занос экзотических для страны-организатора инфекций. Учитывая нестабильную ситуацию в ряде регионов мира и потенциальные геополитические последствия необходимо серьезно рассматривать угрозу биологического терроризма.

Вышеприведенные условия предопределяют увеличение рисков возникновения ЧС и, как следствие, необходимость несколько иной организации функционирования системы надзора и контроля в области биологической безопасности во время массовых мероприятий.

Цель работы — выделить основные направления и проанализировать особенности деятельности по профилактике и обеспечению готовности к ЧС биологического характера в периоды подготовки и проведения массовых мероприятий.

При всем разнообразии существующих опасных биологических факторов среди них стоит отметить те, потенциальное воздействие которых представляет наибольшую угрозу. К ним относятся возбудители особо опасных инфекций (ООИ), инфекций с высоким эпидемическим потенциалом, способные передаваться от человека к человеку. Особую настороженность и перманентно высокий уровень готовности необходимо соблюдать в отношении биологических факторов, проявление которых может в кратчайшие сроки, например, при появлении одного или нескольких заболевших, привести к возникновению ЧС. В данной области организация профилактических и противоэпидемических мероприятий находится в компетенции Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).

В статье [7] на примере Олимпийских игр 2014 г. в Сочи были сформулированы семь основополагающих принципов обеспечения биологической безопасности, являющиеся, по сути, универсальными для всех международных массовых мероприятий подобного масштаба. В целях функционального наполнения значения данных понятий как детерминант задач в области биологической безопасности нами разработана их определительная составляющая (табл.) [13].

Одно из основных направлений работы на этапе планирования меро-

Функциональное значение принципов обеспечения биологической безопасности в период массовых мероприятий

Понятие	Определение
Рациональность	Определение необходимого комплекса мер, их объема, наиболее актуальных задач, связанных с ними потребностей, создание резервов материально-технических средств на случай возникновения ЧС
Компетентность	Использование высококвалифицированных кадров, профессиональная подготовка специалистов с учетом особенностей работы во время массовых мероприятий, проведение специализированных курсов, тренировочных занятий, учений
Оперативность	Сокращение времени принятия и реализации управленческих решений, использование современных информационных технологий, дублирующего канала связи, экспресс-методик, создание дежурных групп быстрого реагирования
Гибкость	Способность к быстрому перестроению системы (приоритетов), изменению алгоритмов работы в зависимости от обстоятельств, санитарно-эпидемиологической обстановки
Управляемость	Сокращение времени адекватного исполнения поручения вышестоящего учреждения, постоянный контроль практической реализации принятых решений, обеспечение вертикали в соответствии со схемами взаимодействия, в том числе в условиях ЧС, определение ответственных и дежурных лиц
Превентивность	Выполнение мониторинговых исследований, профилактических мероприятий до заезда официальных делегаций и гостей, обоснованное использование измененных схем лабораторного анализа и дополнительных показателей для контроля
Согласованность	Функционирование в общей структуре (системе) обеспечения проведения мероприятия, эффективное взаимодействие с заинтересованными службами и ведомствами, участие в работе организационного комитета

приятия — организация межведомственного взаимодействия. Эта деятельность включает обсуждение и принятие решений в рамках постановки конкретных задач, детализации обязанностей и полномочий, совершенствования вертикальной и горизонтальной системы сотрудничества. С этой целью создается организационный комитет, в состав которого входят представители всех заинтересованных служб. В компетенции данного органа находится также обеспечение контрольных функций и при необходимости выработка корректирующих мер.

Не менее важным является уточнение внутриведомственных алгоритмов функционирования на период мероприятия. В частности, исходя из имеющихся задач и угрозы, необходимо определить обоснованность привлечения дополнительных сил (физических и юридических лиц) и средств (материально-технической базы), установить их место в общей структуре.

Подбор персонала проводится с учетом уровня профессиональной подготовки кадров. На ключевых направлениях работы и руководящих должностях желательно задействовать опытных специалистов, в том числе принимавших ранее участие в обеспечении массовых мероприятий и знакомых с их спецификой. С целью подготовки персонала организуются специализированные курсы, тренировочные занятия. В ходе командно-штабных и полевых учений осуществляется практическая отработка алгоритмов внутри- и межведомственного взаимодействия при стандартных ситуациях и во время ЧС различного генеза, определяется актуальность внедрения новых тактических и технических разработок, порядок их использования. В целом эффективное планирование и достижение поставленных целей в период подготовки к массовому мероприятию становятся основой для успешного решения задач непосредственно во время его проведения.

Деятельность в рамках системы надзора и контроля в области биологической безопасности по своему целевому и содержательному наполнению разделена на два взаимосвязанных и дополняющих друг друга направления — меры по профилактике ЧС и меры по обеспечению готовности к ЧС. Первые из них (предупредительные) ориентированы на снижение рисков, связанных с активизацией региональных нозологических форм, возможным заносом извне и распространением инфекций, должны организовываться в отношении субъектов надзора с учетом риск-ориентированного подхода и современных научных достижений. Вторые (подготовительные) разрабатываются с учетом возможности осложнения санитарно-эпидемиологической обстановки, в целях повышения функциональной готовности системы в целом, отдельных ее звеньев и специалистов, отработки алгоритмов реагирования и контрмер.

Усиление контрольно-надзорной деятельности в области биологической безопасности в периоды подготовки и проведения массовых мероприятий включает как количественную, так и качественную составляющие. В рамках использования риск-ориентированной модели целесообразно обеспечить корреляционную зависимость между потенциальной опасностью отдельных субъектов надзора, установленной по итогам выполненной оценки рисков, и числом проводимых проверок [3]. В решении этой задачи важная роль отводится научно-исследовательским институтам (НИИ) из системы Роспотребнадзора, участвующим в формировании научной основы для управления рисками. С целью повышения эффективности мониторинга опасных биологических факторов может быть расширен перечень показателей для планового лабораторного контроля объектов окружающей среды, пищевых



Целевые «точки» воздействия функциональных элементов системы надзора и контроля в области биологической безопасности в период массовых мероприятий.

продуктов и продовольственного сырья, декретированного контингента (например, определение наличия возбудителей острых кишечных инфекций вирусной этиологии у работников сферы общественного питания). Возрастает роль экспрессных методов индикации и измененных алгоритмов анализа, направленных на сокращение времени выявления ПБА и принятия решений. Опыт положительного применения в период массовых мероприятий в рамках системы санитарно-эпидемиологического надзора географических информационных систем (ГИС), созданных в российских НИИ, использовавшихся, в частности, при контроле эпидемиологически значимых объектов, а также в некоторых других направлениях работы, свидетельствует о необходимости их более широкого внедрения в практику [3, 14, 16].

На этапе подготовки решается вопрос о необходимости задействования дополнительных сил и средств. В последние годы накоплен достаточно существенный опыт интегрирования в общую структуру обеспечения биологической безопасности массовых мероприятий специализированных противозидемических бригад (СПЭБ), функционирующих на базе противочумных институтов Роспотребнадзора. В зависимости от масштабов события СПЭБ использовалась как в полном составе, так и отдельными группами специалистов. При этом неизменно основной задачей бригады было консультативно-методическое и практическое обеспечение противозидемических мероприятий в случае возникновения ЧС биологического характера. Готовность к выполнению лабораторно-диагностических исследований включала экзотические для территории Российской Федерации нозологии и инфекции, возбудители которых представляют наибольшую опасность в случае их применения в целях биологического терроризма [6, 15, 16]. При этом в зависимости

от комплектования СПЭБ специалистами и лабораторным имуществом ее возможности могут позволять проводить не только специфическую индикацию, выделение и фенотипическую характеристику патогенов, но и их генотипирование, в том числе с использованием методов фрагментарного секвенирования. При необходимости более глубокого изучения свойств штаммов ПБА задействуются НИИ Роспотребнадзора.

Наряду с обеспечением санитарно-эпидемиологического благополучия по инфекциям, характерным для региона массового мероприятия, важной задачей является профилактика заноса опасных инфекций с других территорий и прежде всего из-за рубежа. С этой целью осуществляется перманентный мониторинг эпидемиологической обстановки в странах-участниках и в мире в целом. Информация должна находиться в свободном доступе для всех задействованных специалистов. Готовность санитарно-карантинных пунктов пропуска (СКП) обеспечивается с учетом возможных повышенных нагрузок на их инфраструктуру. На рис. показаны основные направления деятельности в рамках системы надзора и контроля в области биологической безопасности в период массовых мероприятий относительно сопутствующих эпидемиологических рисков.

Отдельно необходимо остановиться на вопросе профилактики рисков, связанных с угрозой совершения актов биологического терроризма. Наиболее массовые и тяжелые поражения населения могут возникнуть при использовании пищевого и аэрогенного путей передачи возбудителей инфекций, которые, в то же время, являются и наиболее вероятными в случае практической реализации соответствующих замыслов. Это определяет необходимость лабораторного контроля пищевых продуктов и сырья из важных объектов общественного питания и распределительной сети на дополнительные показатели — наличие возбудителей ООИ, ОКИ, биологических токсинов. Опыт такой работы уже получен при проведении Саммита G-20 в 2013 г. в Санкт-Петербурге, Олимпийских игр 2014 г. в Сочи и некоторых других мероприятий [5, 8]. В настоящее время создается научная основа для осуществления мониторинга атмосферного воздуха на присутствие биологических аэрозолей в реальном времени с использованием оборудования постов контроля [2, 4].

Подводя итоги, следует отметить, что деятельность в области обеспечения биологической безопасности в новом семантическом значении этого понятия (в его широком формате) должна строиться с учетом современных принципов анализа рисков здоровью населения, которые в настоящее время все чаще используются в практической работе [1]. Алгоритм взаимосвязанных и последовательных действий при этом включает: выявление (идентификацию) угрозы; ее оценку с использованием качественных и количественных методов; определение комплекса ответных действий, состоящего из мер профилактической направленности и мер по обеспечению готовности к неблагоприятным сценариям развития ситуации.

Учитывая ограниченную продолжительность массовых мероприятий, повышается значимость краткосрочных прогнозов относительно эпидемиологической обстановки по отдельным инфекционным нозологиям и в целом по региону. Именно во время масштабных международных событий увеличивается потенциальная опасность ЧС биологического характера, которая, кроме своего прямого отрицательного воздействия на благополучие человека, может иметь опосредованное значение и привести к неблагоприятным социально-экономическим и геополитическим последствиям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализ риска здоровью в стратегии государственного социально-экономического развития, Под ред. Г.Г. Онищенко, Н.В. Зайцевой. Пермь, 2014.
2. Ефременко Д.В., Зайцева О.А., Кузнецова И.В., Куличенко А.Н. Пост контроля атмосферного воздуха на наличие патогенных биологических агентов и его значение в системе противодействия биологической угрозе. Журн. микробиол. 2014, 1: 80-85.
3. Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Оробей В.Г., Ефременко А.А., Дубянский В.М., Манин Е.А., Прислгина Д.А., Семенко О.В. Применение риск-ориентированного подхода при планировании и организации противоэпидемического обеспечения массовых мероприятий. Анализ риска здоровью. 2017, 1: 4-12.
4. Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Остапович В.В. Определение оптимальных режимов эксплуатации приборной базы для контроля атмосферного воздуха на наличие патогенных биологических агентов в модельных опытах. Журн. микробиол. 2017, 2: 81-86.
5. Кузькин Б.П., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Ефременко Д.В., Манин Е.А., Котенев Е.С., Рязанова А.Г., Кузнецова И.В., Дикова С.П., Лисицкая Я.В., Волюнкина А.С., Пономаренко Д.Г., Елдинова В.Е., Бойко Е.А., Клиндухов В.П., Оробей В.Г., Кутырев В.В., Казакова Е.С., Куклев В.Е., Дятлов И.А., Карцев Н.Н. Результаты работы СПЭБ ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 2: 17-21.
6. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита АТЭС-2012. Под ред. Г.Г. Онищенко. Новосибирск, 2013.
7. Онищенко Г.Г., Брагина И.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Горский А.А., Гуськов А.С., Аксенова О.И., Иванов Г.Е., Клиндухов В.П., Николаевич П.Н., Гречаная Т.В., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Манин Е.А., Пархоменко В.В., Куличенко О.А. Основные направления деятельности по формированию и организации работы системы санитарно-эпидемиологического обеспечения в период подготовки к проведению XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в Сочи. Журн. микробиол. 2015, 1: 94-100.
8. Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Ракитин И.А., Башкетова Н.С., Коржаев Ю.Н., Гречанинова Т.А., Дятлов И.А., Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Топорков В.П., Шербакова С.А., Казакова Е.С., Шарова И.Н. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита «Группы двадцати» в Санкт-Петербурге в 2013 г. Сообщение 2. Организация и приоритетные направления работы в период проведения Саммита. Проблемы особо опасных инфекций, 2013, 4: 11-15.
9. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Топорков В.П., Смоленский В.Ю., Шербакова С.А., Кутырев В.В. Современные угрозы и вызовы в области биологической безопасности и стратегия противодействия. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 3: 5-9.
10. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Актуальные проблемы биологической безопасности в современных условиях. Понятийная, терминологическая и определительная база биологической безопасности. Вестник РАМН, 2013, 11: 4-11.
11. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Актуальные проблемы биологической безопасности в современных условиях. Научное обеспечение национального нормирования широкого формата биологической безопасности. Вестник РАМН, 2014, 11-12: 118-127.
12. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Концептуальные основы биологической безопасности. Вестник РАМН, 2013, 10: 4-13.
13. Оробей В.Г. Меры профилактики чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера при проведении XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр в г. Сочи. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Ставрополь, 2016.
14. Попова А.Ю., Кузькин Б.П., Демина Ю.В., Дубянский В.М., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Шаяхметов О.Х., Семенко О.В., Назаренко Ю.В., Агапитов Д.С., Мезен-

- цев В.М., Харченко Т.В., Ефременко Д.В., Оробей В.Г., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Тешева С.Ч., Рафеенко Г.К. Использование современных информационных технологий в практике санитарно-эпидемиологического надзора в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр в г. Сочи. Журн. микробиол. 2015, 2: 113-118.
15. XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры 2014 года в г. Сочи. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Под ред. Г.Г. Онищенко, А.Н. Куличенко. Тверь, 2015.
16. XXVII Всемирная летняя универсиада 2013 года в Казани. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В.Кутырева. Тверь, 2013.
17. Abubakar I., Gautret P., Brunette G.W. et al. Global perspectives for prevention of infectious diseases associated with mass gatherings. Lancet Infectious Diseases. 2012, 12: 66-74.
18. Communicable diseases alert and response for mass gatherings: key consideration. Geneva, WHO, 2009.

Поступила 25.04.17

Контактная информация: Ефременко Дмитрий Витальевич, к.м.н., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Н.Ф.Василенко, О.В.Малецкая, Е.А.Манин, Д.А.Прислегина, А.С.Волынкина, Я.В.Лисицкая, Л.И.Шапошникова, Т.В.Таран, А.Н.Куличенко

ПРИЧИНЫ ОБОСТРЕНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ ПО КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2016 ГОДУ

Ставропольский противочумный институт

Цель. Анализ причин обострения эпидемиологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке (КГЛ) в Российской Федерации в 2016 г. *Материалы и методы.* Использованы донесения, представленные Управлениями Роспотребнадзора, Центрами гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, научно-исследовательскими противочумными институтами и противочумными станциями Роспотребнадзора из 8 субъектов Южного и 7 субъектов Северо-Кавказского федеральных округов. Обработку полученных данных проводили с использованием программы Excel. *Результаты.* В 2016 г. эпидемические проявления КГЛ зарегистрированы в 6 субъектах юга России. Рост заболеваемости КГЛ отмечен в Ставропольском крае, Республике Калмыкия, Астраханской и Волгоградской областях. Основными причинами обострения эпидемиологической обстановки по КГЛ в Российской Федерации в 2016 году стали: увеличение периода активности и численности клещей *Hyalomma marginatum* в эпидсезон в связи с благоприятными погодными-климатическими условиями; несоблюдение сроков проведения противоклещевых обработок сельскохозяйственных животных и природных биотопов, а также недостаточный охват поголовья и площадей. *Заключение.* С целью стабилизации эпидемиологической обстановки по КГЛ необходимо своевременное проведение в ранневесенний период (март-апрель) акарицидных обработок скота и природных биотопов (пастбищ) с использованием эффективных противоклещевых препаратов и последующим контролем компетентными специалистами (энтомологами).

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 17—23

Ключевые слова: Крымская геморрагическая лихорадка, эпидемиологическая обстановка, заболеваемость, *Hyalomma marginatum*, акарицидные обработки, субъекты юга России

N.F.Vasilenko, O.V.Maletskaya, E.A.Manin, D.A.Prislegina, A.S.Volyunkina,
Ya.V.Lisitskaya, L.I.Shaposhnikova, T.V.Taran, A.N.Kulichenko

CAUSES OF DETERIORATION EPIDEMIOLOGICAL SITUATION ON CRIMEAN-CONGO HAEMORRHAGIC FEVER IN THE RUSSIAN FEDERATION IN 2016

Stavropol Research Institute for Plague Control

Aim. The analysis of causes of deterioration epidemiological situation on Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) in the Russian Federation in 2016. *Materials and methods.* Data of statistical documentation of Departments of Rospotrebnadzor, Centers of Hygiene and Epidemiology in subjects of the Russian Federation, Plague Control Research Institutions and Anti-Plague stations from 8 subjects of the Southern and 7 subjects of the North-Caucasian Federal Districts were used. The findings have been treated using by Excel program. *Results.* In 2016, epidemiological manifestations of CCHF are identified on the territory of 6 subjects of the south of Russia. An increase in the incidence of CCHF occurred in the Stavropol Territory, the Republic of Kalmykia, Astrakhan and Volgograd Regions. The main cause of the deterioration epidemiological situation on CCHF was increasing of the number and the period of activity of ticks *Hyalomma marginatum*, in the epidemic season as a result of favorable climatic conditions; incorrect dates of the realization and inadequacy of the acaricide treatments livestock and natural biotopes. *Conclusion.* For the improvement epidemiological situation on CCHF timely realization of the acaricide treatments in the early spring (March-April) livestock and natural biotopes using effective insecticides and with its further entomological control it is necessary.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 17–23

Key words: Crimean-Congo haemorrhagic fever, epidemiological situation, morbidity, *Hyalomma marginatum*, acaricide treatments, subjects of the south of Russia

ВВЕДЕНИЕ

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) на юге Российской Федерации остается одной из актуальных природно-очаговых инфекций вирусной этиологии, передающихся клещами. Эпидемическая значимость КГЛ определяется тяжестью клинического течения заболевания с выраженным геморрагическим синдромом, высоким удельным весом летальных исходов (в среднем от 2% до 14%), отсутствием средств специфического лечения и профилактики, расширением нозоареала инфекции в последние годы, высокой контагиозностью при оказании медицинской помощи больным КГЛ [6, 7].

Анализ эпидемиологической обстановки по КГЛ в мире показал, что в последние 3 года неблагополучная эпидемическая ситуация отмечалась в 16 странах мира в пределах эндемичной по КГЛ территории, а наиболее сложная обстановка наблюдалась в Иране, Турции и Пакистане [8, 9]. В 2016 г. впервые выявлены случаи заболевания КГЛ в Испании (2, в т.ч. 1 летальный). Общее число заболевших КГЛ в мире превышает 8000, из них более 2000 — в России.

Первые вспышки КГЛ на территории Советского Союза зарегистрированы в степных районах Крыма в 1944 — 1945 гг. XX века, затем отмечались спорадические случаи заболевания, из них последние — в 80-х годах. В период с 1944 по 1998 гг. на юге России регистрировались единичные случаи заболевания КГЛ в Ростовской и Астраханской областях, Ставропольском и Краснодарском краях [4, 5]. С 1999 г. в России произошла активизация природного очага КГЛ [1, 2, 4].

Цель данной работы — анализ причин обострения эпидемиологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2016 году.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения анализа эпидемиологической обстановки по КГЛ на юге России использованы еженедельные и окончательные донесения, представленные Управлениями Роспотребнадзора, Центрами гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, научно-исследовательскими противочумными институтами и противочумными станциями Роспотребнадзора из 8 субъектов Южного и 7 субъектов Северо-Кавказского федеральных округов (ЮФО и СКФО). Обработку полученных данных проводили с использованием программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В период с 1999 г. по 2016 г. в 10 субъектах юга России выявлено 2046 больных, у 82 (4,0%) из них заболевание закончилось летальным исходом.

В Республиках Калмыкия и Дагестан, Астраханской, Ростовской, Волгоградской областях и Ставропольском крае с 2001 года случаи заболевания КГЛ регистрируются ежегодно. Единичные случаи заболевания были зарегистрированы в Республике Ингушетия (2004, 2007, 2008 гг.), Карачаево-Черкесской (2007, 2008, 2015 гг.) и Кабардино-Балкарской Республиках (2016 г.) и заносные случаи из Крыма в Москву (2013 г.) и Воронежскую область (2015 г.). При этом наибольшее количество больных за период с 1999 по 2016 гг. выявлено в Ставропольском крае (734, 24 с летальным исходом), Ростовской области (622, 24 с летальным исходом) и Республике Калмыкия (337, 9 с летальным исходом) [3].

В 2016 г. эпидемические проявления КГЛ зарегистрированы в 4 субъектах ЮФО и 2 субъектах СКФО Российской Федерации. Выявлено 162 случая заболевания, что на 16,5% больше, чем в 2015 г. (139 случаев). Зарегистрировано 6 летальных исходов (в 2015 г. 1). Заболевания регистрировали преимущественно в Ставропольском крае (60 случаев, 1 летальный) и в Ростовской области (57 случаев, 2 летальных). Кроме того, 25 случаев КГЛ (1 летальный) выявлено в Республике Калмыкия, 14 (1 летальный) — в Волгоградской обл. и 5 — в Астраханской области. Впервые выявлен случай КГЛ (летальный) в Кабардино-Балкарской Республике. Данные, представленные в табл., свидетельствуют о возрастании количества больных КГЛ в Российской Федерации за последние 4 года.

Эпидемическая ситуация последних лет свидетельствует об активизации природного очага КГЛ на территории Российской Федерации, занимающего

Количество больных КГЛ в субъектах юга России

Субъект РФ	Год	2012	2013	2014	2015	2016	1999—2016
Ставропольский край		24/0	32/0	27/0	43/0	60/1	734/24
Ростовская область		41/1	38/2	54/2	79/1	57/2	622/24
Республика Калмыкия		3/0	0	2/0	9/0	25/1	337/9
Астраханская область		6/0	1/0	0	1/0	5/0	154/5
Республика Дагестан		0	2/1	2/0	2/0	0	49/4
Волгоградская область		0	6/1	6/0	3/0	14/1	138/10
Республика Ингушетия		0	0	0	0	0	6/5
Карачаево-Черкесская Республика		0	0	0	1/0	0	3/0
Кабардино-Балкарская Республика		0	0	0	0	1/1	1/1
Заносные случаи из Республики Крым		0	1/0	0	1/0	0	2/0
ИТОГО:		74/1	80/4	91/2	139/1	162/6	2046/82

Примечание. *Числитель — количество больных, знаменатель — количество летальных случаев.

обширную территорию ЮФО и СКФО, за исключением Адыгеи, Северной Осетии-Алании, Чеченской Республики. Наиболее неблагоприятная эпидемиологическая обстановка по КГЛ отмечена в районах, расположенных на юге Ростовской области (Сальский, Песчанокопский), на севере Ставропольского края (Апанасенковский, Петровский) и западе Республики Калмыкия (Яшалтинский).

Анализ территориального распределения больных на юге России в динамике позволил выявить вовлечение новых административных районов в эпидемически активную территорию очага КГЛ. Так, в 2015 г. заболеваемость КГЛ впервые зарегистрирована в 4 районах Ростовской области (Милютинском, Мясниковском, Неклиновском, Родионово-Несветайском), а в Обливском районе, где случаи КГЛ не регистрировались с 2009 г., вновь были выявлены больные. В 2016 г. заболеваемость КГЛ впервые зарегистрирована в Клетском районе Волгоградской области и Зольском районе Кабардино-Балкарской Республики (по 1 случаю).

Анализ заболеваемости показал, что для КГЛ отмечена выраженная сезонность заболевания: пик приходится на май-июнь, спад — на июль—август. В 2016 г. первый больной (по дате заболевания) был зарегистрирован во 2 декаде апреля в Ростовской области. Первые случаи КГЛ в Ставропольском крае, Астраханской, Волгоградской областях, Республике Калмыкия в 2016 г. были выявлены во 2 — 3 декадах апреля, что в среднем на 14 дней раньше, чем в 2015 г. Заболеваемость нарастала с апреля (6,2% от всех больных, в 2015 г. — 2,9%), пик пришелся на май—июнь (31,5 и 45,7% от всех больных), спад — на июль—август (11,7 и 4,3%). Последний случай заболевания отмечен во 2 декаде сентября в Ставропольском крае, что на 20 дней позже, чем в 2015 г.

Заболеваемость регистрировали во всех возрастных группах, но наиболее высокий уровень заболеваемости, как и в предыдущие годы, был отмечен среди трудоспособного населения (20 — 59 лет) — 77,2%. Выявлены 4 случая заболевания детей до 14 лет (в 2015 г. — 1 случай): 2 — в Ставропольском крае, по 1 — в Ростовской области и Республике Калмыкия (новорожденный, умерший на 7 день).

Инфицирование людей происходило при реализации трансмиссивного и контактного механизмов передачи вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (вирус ККГЛ). В 53,1% случаев инфицирование произошло при укусе клещом, в 18,2% случаев — при снятии и раздавливании клещей. В 2016 г. в Ставропольском крае зарегистрирован случай внутрибольничного заражения КГЛ медицинского работника при оказании медицинской помощи больному КГЛ. Инфицирование произошло в результате биологической аварии, случившейся при проведении медицинских манипуляций больному КГЛ (укол кисти руки с прокалыванием кожных покровов и мягких тканей иглой от катетера после проведения внутривенной инъекции). В Республике Калмыкия отмечен случай заболевания КГЛ роженицы и впервые инфицирование новорожденного при реализации контактного (в родах) механизма передачи возбудителя инфекции.

Анализ клинических проявлений КГЛ показал, что преобладала средне-тяжелая форма течения болезни (73,5% от всех случаев заболевания, в 2015 г. — 81,3%), без геморрагических проявлений (72,8%, в 2015 г. — 75,5%). В 4,3% случаев отмечалась легкая клиническая форма заболевания, доля случаев тяжелого течения болезни составила 22,2% (в 2015 г. — 16,5%).

Наряду с ростом заболеваемости отмечается также увеличение доли заболеваний с наличием геморрагического синдрома — с 16,5% с в 2013 году до

27,2% — в 2016 году, а также увеличение доли заболеваний с тяжелым клиническим течением — с 7,6% в 2013 г. до 22,2% — в 2016 г.

Кроме того, в субъектах ЮФО и СКФО количество лиц, обратившихся в лечебно-профилактические организации по поводу укусов клещами, возросло по сравнению с предыдущими годами: в 2016 г. — 36 729 человек, в т.ч. детей 13 169 (в 2015 г. — 35 708, в т.ч. 12 211 детей). В 2016 г. в Республиках Калмыкия, Ингушетия, Чеченской Республике, Волгоградской области, Краснодарском крае число укушенных клещами возросло в 1,2 — 3,2 раза.

Уровень заболеваемости КГЛ зависит от эпизоотического состояния природного очага: численности и инфицированности клещей, а также зараженности резервуаров вируса ККГЛ (мелких млекопитающих, диких птиц). Так, активизация клещей *Hyalomma marginatum* (основного резервуара и переносчика возбудителя инфекции) в 2016 г. после зимней диапаузы зарегистрирована с 1 декады апреля, в те же сроки, что и в 2015 г. Однако уровень клещевленности крупного и мелкого рогатого скота (КРС и МРС) в апреле—мае 2016 г. был выше, чем в аналогичный период 2015 г. в Ставропольском крае, Ростовской и Астраханской областях, Республиках Калмыкия, Дагестан и Карачаево-Черкесской Республике. Индексы обилия клещей *H. marginatum* на сельскохозяйственных животных в апреле—мае 2016 г. в отдельных районах Ставропольского края достигали 21,0, в Республике Дагестан — 15,8, в Астраханской области — 7,6 и превышали эпидемически значимый показатель численности имаго *H. marginatum* (до 3) в 2,5 и более раз.

Результаты, полученные во 2 декаде июля 2016 г. на стационарных точках наблюдения на территории Ставропольского края (в Нефтекумском и Левокумском районах), показали, что численность преимагинальных фаз *H. marginatum* не превышала средние показатели за 2013 — 2016 гг. Индекс обилия преимагинальных фаз *H. marginatum* на домашней птице составил 109,2, на диких птицах семейства врановых — 89,7. Инфицированность вирусом ККГЛ преимагинальных фаз *H. marginatum* на врановых в Левокумском районе составила 31,3%, в Нефтекумском — 6,1%.

Доля зараженности вирусом ККГЛ иксодовых клещей в 2016 г. увеличилась в Ростовской области до 24,8% (в 2014 г. — 12,1%, в 2015 г. — 19,2%), в Астраханской области — до 5,6% (в 2015 г. — 0,6%), в Республике Дагестан — до 5,2% (в 2015 г. — 3,7%), в Республике Калмыкия — до 5,2% (в 2015 г. — 2,3%), в Кабардино-Балкарской Республике — до 3,0% (в 2015 г. положительных проб не выявлено), в Республике Ингушетия — до 2,8% (в 2015 г. — 0,3%).

На энзоотичных территориях ЮФО и СКФО проводились акарицидные обработки сельскохозяйственных животных и природных биотопов, в т.ч. пастбищ, дератизационные мероприятия, велась информационно-разъяснительная работа с населением.

В субъектах ЮФО и СКФО в апреле—мае 2016 г. акарицидными обработками сельскохозяйственных животных было охвачено от 31,3 до 210% поголовья КРС и от 5 до 160% поголовья МРС (с учетом кратности обработок). Акарицидными обработками территории природных биотопов в марте—апреле 2016 г. охвачено 0,03 — 35% от запланированных площадей (наибольшая площадь в Ставропольском крае — 35%). Вместе с тем, в отдельных районах Ростовской, Астраханской, Волгоградской областей, Ставропольского края в течение эпидемического сезона сохранялась высокая степень эпизоотической опасности инфицирования вирусом ККГЛ и регистрировалась высокая численность иксодовых клещей (индексы обилия клещей *H. marginatum* на КРС/

МРС превышали допустимые показатели), что свидетельствует о недостаточной эффективности акарицидных мероприятий.

ОБСУЖДЕНИЕ

В 2016 году на юге Российской Федерации наблюдалось обострение эпидемиологической обстановки по КГЛ, связанное, главным образом, с благоприятными для развития клещей *H. marginatum* погодными-климатическими условиями зим (отсутствие низких температур, наличие снежного покрова), поздним наступлением жаркого и засушливого лета, что привело к увеличению периода активности клещей данного вида в эпидсезон. Отмечено вовлечение новых административных территорий в эпидемически активную зону природного очага КГЛ. Увеличилось число заболеваний с тяжелым клиническим течением (на 2,7%) и с наличием геморрагического синдрома (на 5,7%). Возросло количество лиц, обратившихся в лечебно-профилактические организации по поводу укусов клещами (на 2,9%).

На стационарных точках долговременного наблюдения за природным очагом КГЛ в 2016 г. на основных прокормителях сохранялись высокие индексы обилия преимагинальных фаз *H. marginatum* (до 109,2).

Наряду с благоприятными природными условиями для успешного существования всех фаз развития основного резервуара и переносчика вируса ККГЛ — иксодового клеща *H. marginatum*, отмечены недостатки при проведении акарицидных обработок сельскохозяйственных животных и природных биотопов (поздние сроки, низкий охват поголовья скота и подлежащих обработке территорий).

Таким образом, основными причинами обострения эпидемиологической обстановки по КГЛ в Российской Федерации в 2016 году стали: увеличение периода активности и численности клещей *H. marginatum* в эпидсезон в связи с благоприятными погодными-климатическими условиями; несоблюдение сроков проведения противоклещевых обработок крупного и мелкого рогатого скота всех форм собственности и природных биотопов, а также недостаточный охват поголовья и площадей.

С целью стабилизации эпидемиологической обстановки по КГЛ в Российской Федерации необходимо: своевременное проведение в ранневесенний период 2017 г. (март—апрель) акарицидных обработок скота и природных биотопов (пастбищ). Особое внимание уделить противоклещевым обработкам пастбищ с их сменой и обеспечением ввода обработанных от клещей сельскохозяйственных животных на освобожденные от клещей пастбища и приоритетной обработкой пастбищ в населенных пунктах, относящихся к зонам высокого риска заражения КГЛ (регистрация случаев заболевания людей, выявления вируса ККГЛ у клещей и мелких млекопитающих); проведение эпизоотологического обследования территории природного очага КГЛ в установленные сроки в соответствии с рекомендациями референс-центра по мониторингу за возбудителем КГЛ и контроль за заклещевленностью сельскохозяйственных животных; обеспечение необходимого количества и резерва эффективных противоклещевых препаратов для проведения акарицидных обработок; в течение всего эпидсезона проведение динамической оценки потенциала природного очага с целью прогнозирования эпидемиологической обстановки по КГЛ, включая энтомологическое обследование пастбищ с оценкой эффективности проводимых акарицидных обработок компетентными специалистами (энтомологами); подготовка специалистов по вопросам диагностики и лечения КГЛ; проведение широкомасштабной информации-

онно-разъяснительной работы с населением до начала эпидсезона и в течение всего эпидемического периода, осуществление контроля за инструктажами групп риска; при подготовке к эпидсезону должно быть четкое взаимодействие всех заинтересованных служб и ведомств по вопросам профилактики КГЛ.

Для снижения активности природного очага КГЛ и уровня заболеваемости людей необходимо совершенствовать тактику эпидемиологического надзора за данной инфекцией с применением современных научно-обоснованных подходов, одним из которых является разработка автоматизированной информационно-аналитической и прогнозно-моделирующей системы на основе ГИС (ArcGIS), позволяющей достичь высокой степени оперативности в получении, анализе, передаче информации и принятии управленческих решений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волынкина А.С., Котенев Е.С., Лисицкая Я.В., Малецкая О.В., Шапошникова Л.И., Куличенко А.Н. Обзор эпидемической ситуации по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 1: 44-47.
2. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Бейер А.П., Санникова И.В., Пасечников В.Д. и др. Крымская геморрагическая лихорадка в Евразии в XXI веке: эпидемиологические аспекты. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2012, 3: 42-53.
3. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Григорьев М.П. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2015 г. Ставрополь, 2016.
4. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П. Крымская геморрагическая лихорадка. М.: ГОУ ВУНМЦ, 2005.
5. Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Шапошникова Л.И., Котенев Е.С. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекциям в Крымском федеральном округе в 2014—2015 гг. Журн. микробиол. 2016, 2: 62-69.
6. Санникова И.В. Внутрибольничное инфицирование Крымской геморрагической лихорадкой. Журн. микробиол. 2005, 4 (приложение): 38-42.
7. Смирнова С.Е. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка (этиология, эпидемиология, лабораторная диагностика). М., АТиСО, 2007.
8. Leblebicioglu H., Ozaras R., Irmak H., Sencan I. Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey: current status and future challenges. Antivir. Res. 2016, Feb. 126: 21-34.
9. Waris Qidwai. Crimean-Congo haemorrhagic fever: An emerging public health care challenge in Pakistan. J. College of Physicians and Surgeons Pakistan. 2016, 26 (2): 81-82.

Поступила 08.03.17

Контактная информация: Василенко Надежда Филипповна, д.б.н., проф., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-83

О.Ю.Борисова^{1,2}, А.С.Пименова¹, А.В.Чаплин^{1,2}, Л.И.Кафарская², С.С.Афанасьев¹,
В.А.Алешкин¹, А.В.Алешкин¹, М.С.Афанасьев³, А.В.Караулов³

УСКОРЕННЫЙ СПОСОБ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ДИФТЕРИИ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМАЛЬНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЯ

¹Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского, ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, ³Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Цель. Разработка ускоренного способа генодиагностики дифтерии на основе изотермальной амплификации для выявления ДНК возбудителя. *Материалы и методы.* Исследование проводилось на типовых коллекционных штаммах из «ГКПМ-Оболensk», а также на 135 штаммах *S. diphtheriae*, выделенных в бактериологических лабораториях субъектов РФ и присланных в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Выделение штаммов проводили по МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13. Хромосомную ДНК выделяли стандартным методом кипячения, а также с помощью трех коммерческих наборов. Детекцию результатов амплификации осуществляли в горизонтальном электрофорезе в 1,5% агарозном геле. *Результаты.* Установлено, что разработанный способ генодиагностики позволяет выявлять ДНК токсигенных штаммов *S. diphtheriae* двух биоваров, а также ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *S. diphtheriae* биовара *mitis* с механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленными наличием делеции или мобильного генетического IS элемента в гене *tox*. Нетоксигенные токснесущие штаммы *S. diphtheriae* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием транспозона в гене *tox*, идентифицируются как нетоксигенные. Оценка аналитической чувствительности в сравнительных исследованиях при использовании трех коммерческих наборов для выделения ДНК показала, что с помощью набора «Рибо-преп» чувствительность достигала $4,5 \times 10^1$ ГЭ/мл. Показана высокая специфичность разработанного способа, которая оценивалась на 18 штаммах 16 других представителей рода *Corynebacterium* и 20 типовых штаммах микроорганизмов, выделенных из ротоглотки или вызывающих заболевания дыхательных путей. Апробация разработанного способа проведена в модельных экспериментах на иммитантах клинических образцов путем заражения одноразовых стерильных сухих тампонов последовательными разведениями бактериальной культуры (с параллельным высевом на плотные питательные среды) и составила 10^3 ГЭ/мл. *Заключение.* Разработанный способ ускоренной генодиагностики дифтерийной инфекции обладает высокой диагностической эффективностью, специфичностью и чувствительностью, позволяет выявлять 10^3 — $4,5 \times 10^1$ ГЭ/мл *S. diphtheriae* в клиническом материале с одновременной верификацией токсигенных и нетоксигенных штаммов.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 24—32

Ключевые слова: дифтерия, *S. diphtheriae*, изотермальная амплификация, диагностика

О. Ю. Борисова^{1,2}, А. С. Пименова¹, А. В. Чаплин^{1,2}, Л. И. Кафарская², С. С. Афанасьев¹,
В. А. Алешкин¹, А. В. Алешкин¹, М. С. Афанасьев³, А. В. Караулов³

AN ACCELERATED METHOD OF DIPHTHERIA GENE DIAGNOSTICS BASED ON ISOTHERMAL AMPLIFICATION TO DETECT DNA OF THE CAUSATIVE AGENT

¹Gabrichovsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pirogov Russian National Research Medical University, ³Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. Development of an accelerated method of gene diagnostics of diphtheria based on isothermal amplification for detection of DNA of the causative agent. *Materials and methods.* The study was carried out in typical collection strains from GKPM-Obolensk, as well as in 135 strains

of *C. diphtheriae* isolated from bacteriological laboratories of the regions of Russian Federation and sent to the Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology. Strain isolation was carried out in accordance with MI 4.2.698-98 and 4.2.3065-13. Chromosomal DNA was isolated by standard heating method, as well as using 3 commercial kits. Detection of the amplification results was carried out in horizontal electrophoresis in 1.5% agarose gel. **Results.** The developed method of gene diagnostics was established to allow detection of DNA of toxigenic *C. diphtheriae* strains of 2 biovars, as well as DNA of non-toxigenic tox-gene bearing strains (NTTB) of *C. diphtheriae* mitis biovar with mechanisms of lack of expression of diphtheria toxin gene due to the presence of deletion or mobile genetic IS element in the tox gene. Non-toxigenic tox-gene bearing *C. diphtheriae* strain with the mechanism of lack of diphtheria toxin gene expression due to the presence of transposon in the tox gene are identified as non-toxigenic. Evaluation of the analytical sensitivity in comparative studies using 3 commercial kits for FNA isolation has shown that sensitivity reached 4.5×10^1 GE/ml using Ribo-prep kit. High specificity of the developed method is shown, it was evaluated in 18 strains of 16 other members of the *Corynebacterium* genus and 20 typical strains of microorganisms isolated from oropharynx or causing infections of the respiratory tract. Approbation of the developed method was carried out in model experiments in imitators of clinical samples by infection of single-use sterile dry tampons by consecutive dilutions of the bacterial cultures (with parallel seeding into dense nutrient media) and was 10^3 GE/ml. **Conclusion.** The developed method of accelerated gene diagnostics of the diphtheria infection has a high diagnostic effectiveness, specificity and sensitivity, allows to detect $10^3 - 4.5 \times 10$ GE/ml *C. diphtheriae* in clinical material with simultaneous verification of toxigenic and non-toxigenic strains.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 24—32

Key words: diphtheria, *C. diphtheriae*, isothermal amplification, diagnostics

ВВЕДЕНИЕ

Основным методом лабораторной диагностики дифтерийной инфекции в Российской Федерации является бактериологическая диагностика, которая регламентирована двумя нормативно-методическими документами: санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и методическими указаниями МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Обследованию на дифтерию подлежат все больные с ангинами, хроническими тонзиллитами, паратонзиллярными и заглоточными абсцессами, а также все контактные лица в очагах дифтерии. Обследования проводятся также с профилактической целью при поступлении в лечебно-профилактические учреждения, санатории, закрытые специализированные учреждения, при переводе из одного закрытого специализированного учреждения в другое. Особую опасность представляют дифтерийные бактерионосители, которые имеют высокий уровень антитоксического иммунитета, но являются источниками инфекции для окружающих. Кроме того, в России существует скрытое дифтерийное бактерионосительство, что является потенциалом для распространения дифтерии, особенно среди непривитых против этой инфекции людей. Поэтому, согласно действующим нормативным документам, во всех этих случаях у пациента забирают патологический материал из зева и носа с помощью двух отдельных сухих тампонов с последующим посевом на одну чашку с плотной питательной средой и идентификацией возбудителя. При наличии другой локализации (кожа, наружный слуховой проход, гениталии, конъюнктивы глаз и др.) взятие патологического материала осуществляют с места локализации одним сухим тампоном, и обязательно материал забирается двумя сухими тампонами из зева и носа. Это объясняется тем, что воз-

будитель дифтерии наиболее часто локализуется на слизистых оболочках носоглотки и ротоглотки с последующим попаданием на кожу.

Система бактериологической диагностики в нашей стране разработана несколькими поколениями ученых и практических бактериологов. Огромный вклад в ее разработку внесли сотрудники МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского. Целью ее является выявление возбудителя дифтерии с помощью минимального количества диагностических тестов, необходимых и достаточных для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки. Разработанная схема бактериологической диагностики является достаточно эффективной и включает постановку пробы на токсигенность, которая позволяет выявить продукцию дифтерийного токсина у возбудителя. Однако самый ранний положительный ответ может быть выдан только на 3 сутки, а самый поздний отрицательный ответ — на пятые сутки. Кроме того, постановка большого числа идентификационных тестов также может иметь ряд недостатков. Так, результаты биохимической идентификации *S.diphtheriae* зависят от качества питательных сред и реагентов, условий их приготовления и хранения, определения рН среды, чистоты посуды, а также квалификации персонала и многое др. Поэтому применение высокочувствительных, специфичных, информативных и ускоренных молекулярно-генетических методов обнаружения возбудителя дифтерии является несомненно актуальным и перспективным в лабораторной диагностике дифтерийной инфекции, так как позволит идентифицировать возбудителя дифтерии в течение одного рабочего дня.

Цель исследования: разработка ускоренного способа генодиагностики дифтерии на основе изотермальной амплификации для выявления ДНК возбудителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работу включено 50 токсигенных и 70 нетоксигенных штаммов *S.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, а также 15 нетоксигенных токснесущих штаммов *S.diphtheriae* с тремя механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, выделенных с диагностической и профилактической целью в бактериологических лабораториях субъектов Российской Федерации и присланных в Референс-центр по дифтерии и коклюшу МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского. В исследование включены типовые штаммы из «ГКПМ-Оболенск». Выделение штаммов *S.diphtheriae* проводили согласно Методическим указаниям «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13. Исследуемый материал засевали на кровяно-теллуритовую среду (КТА) на основе 2% СПА («Микроген», Махачкала) с 10% ККРС (НПО «Лейтран», Москва) и 0,02% теллурида калия (ГНЦ ПМБ, Оболенск) и термостатировали 24 — 48 часов при 37°C. Выросшие колонии оценивали по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам согласно МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13, а также с использованием тест-системы «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород).

Хромосомную ДНК выделяли стандартным методом кипячения согласно Маниатис Т. из 24-часовой культуры *S.diphtheriae*, а также с помощью коммерческих наборов: «ДНК-сорБАМ» («АмплиСенс», Москва), «Рибо-преп» («АмплиСенс», Москва), «К-сорб-100» («Синтол», Москва). Детекцию результатов амплификации осуществляли в горизонтальном электрофорезе в 1,5% агарозном геле. Полученные после изотермальной амплификации ДНК-образцы смешивали с *6x*Mass Loading Dye Solution («Fermentas», Литва) и *Sybr*

Green, помещали в лунки агарозного геля и подключали к источнику электрического тока. Электрофорез проводили в режиме 160 V в течение 20 мин. Результат реакции выявляли с помощью УФ-трансиллюминатора и фотографировали. Для контроля качества электрофореза использовали маркер молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В основу разработанного способа генодиагностики дифтерии была взята молекулярно-генетическая технология изотермальной амплификации (LAMP) [7], позволяющая осуществлять амплификацию ДНК в условиях одной температуры. Важным этапом при разработке способа был подбор мишени для детекции, в качестве которой взят ген *tox*, кодирующий синтез дифтерийного токсина — основного фактора патогенности возбудителя дифтерии. При конструировании праймеров ориентировались на нуклеотидную последовательность, предложенную для изотермальной амплификации *S.diphtheriae* и опубликованную в международной базе данных генотипов NCBI/GenBank группой японских исследователей (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Corynebacterium+diphtheriae+Iwaki+2008>). На основании выбранной последовательности гена *tox* с помощью программ Primer Premier-V5 (Premier Bio Soft International) и алгоритма BLAST были подобраны пять олигонуклеотидных праймеров — ДТ-ВР-F1P, ДТ-ВР-В1P, ДТ-ВР-F3, ДТ-ВР-В3 и Loop. Далее нами экспериментально установлен состав реакционной смеси, достаточной для обеспечения высокой специфичности и эффективности проведения изотермальной амплификации. Изотермальную амплификацию проводили в режиме: 65°C — 60 мин и далее 80°C — 2 мин в программируемом микротермостате типа «Гном». Детекцию результатов осуществляли путем оценки профиля исследуемого ДНК-образца со специфическим профилем ДНК-образца контрольного токсигенного штамма *S.diphtheriae*. Если профиль исследуемого ДНК-образца аналогичен профилю ДНК-образца контрольного токсигенного штамма *S.diphtheriae*, то данные образцы регистрировали как содержащие ДНК токсигенного штамма *S.diphtheriae*, что свидетельствовало о наличии в патологическом материале от больного ДНК возбудителя дифтерии (рис. 1).

Апробацию способа ускоренной лабораторной диагностики дифтерии проведена на типовых коллекционных штаммах *S.diphtheriae*, полученных из «ГКПМ-Оболенск», а также на штаммах *S.diphtheriae*, выделенных с диагностической и профилактической целью в бактериологических лабораториях субъектов Российской Федерации и присланных в Референс-центр по дифтерии и коклюшу МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского. В работу включено 50 токсигенных и 70 нетоксигенных штаммов *S.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, а также 15 нетоксигенных токснесущих штаммов *S.diphtheriae* с тремя механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина. Оценка

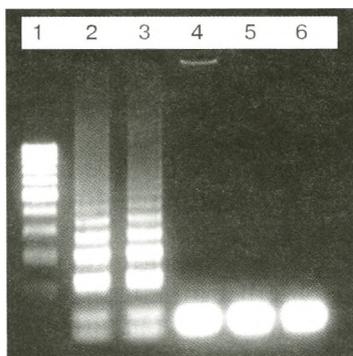


Рис. 1. Типичная электрофореграмма продуктов изотермальной амплификации — ДНК штаммов *S.diphtheriae*.

1 — маркер молекулярных масс 100 bp DNA Ladder Plus; 2 — ДНК токсигенного штамма *S.diphtheriae* биовара *gravis*; 3 — ДНК токсигенного штамма *S.diphtheriae* биовара *mitis*; 4 — ДНК нетоксигенного штамма *S.diphtheriae* биовара *gravis*; 5 — ДНК нетоксигенного штамма *S.diphtheriae* биовара *mitis*; 6 — отрицательный контроль.

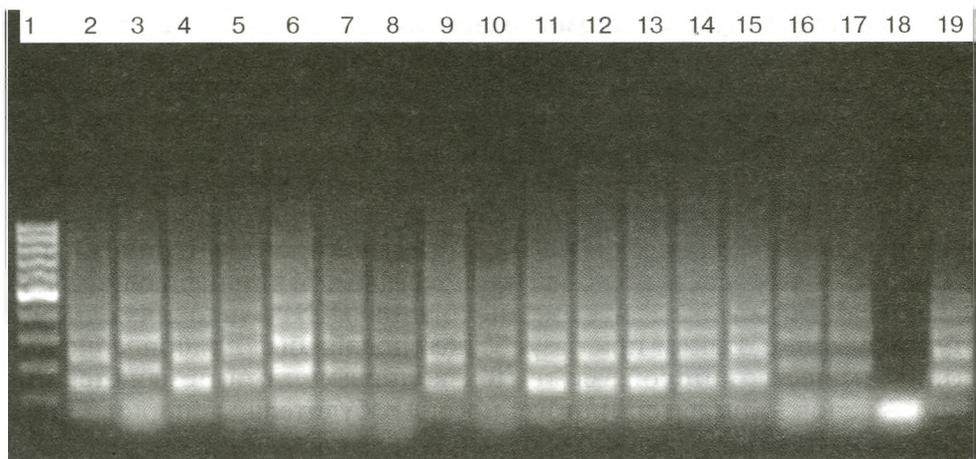


Рис. 2. Типичная электрофореграмма продуктов изотермальной амплификации — ДНК штаммов *C.diphtheriae*.

1 — маркер молекулярных масс 100 bp DNA Ladder Plus; 2 — 5 — ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 6 — 8 — ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 9 — 11 — ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием делеции в гене *tox*; 12 — 14 — ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием мобильного генетического IS элемента в гене *tox*; 15 — 17 — ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием транспозона в гене *tox*; 18 — отрицательный контроль; 19 — положительный контроль.

эффективности разработанного способа проводилась при параллельных бактериологических исследованиях. Установлено, что положительные сигналы регистрировали во всех образцах, содержащих ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров, а также в образцах, содержащих ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленными наличием делеции или мобильного генетического IS элемента в гене *tox*. И положительные сигналы не были обнаружены в образцах, содержащих ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием транспозона в гене *tox* (рис. 2). Во всех образцах, содержащих ДНК нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров, положительные сигналы отсутствовали.

Оценку аналитической чувствительности разработанного метода проводили при параллельных бактериологических исследованиях. Для этого готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* № 665. Далее 100 мкл приготовленной суспензии засеивали на плотную питательную среду КТА и из 100 мкл суспензии выделяли ДНК. Засеянные чашки инкубировали при 37°C. Учет выросших колоний производили через 24 и 48 часов роста. Для выделения ДНК использовали несколько коммерческих наборов: «ДНК-сорбАМ» («АмплиСенс», Москва), «Рибо-преп» («АмплиСенс», Москва), «К-сорб-100» («Синтол», Москва). Исследования показали, что при использовании набора «ДНК-сорбАМ» аналитическая чувствительность составила 10^4 ГЭ/мл, набора «К-сорб-100» — 10^3 ГЭ/мл и набора «Рибо-преп» — 10^2 ГЭ/мл. В связи с чем, для дальнейшей работы использовали набор «Рибо-преп», показавший наибольшую аналитическую чувствительность метода (рис. 3).

Оценка специфичности разработанного ускоренного метода лабораторной

диагностики дифтерийной инфекции проведена на штаммах других представителей рода *Corynebacterium*, которые ранее были выделены из различных микробиоценозов у пациентов и идентифицированы с помощью времяпролетного масс-спектрометра BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («BioMerieux», Франция) и секвенирования 16S rRNA. Список используемых 18 штаммов включал 16 представителей рода *Corynebacterium*: *C. xerosis*, *C. afermentas sub. lipophilum*, *C. tuberculostearicum*, *C. accolens*, *C. coyleae*, *C. amycolatum*, *C. ureicelrivorans*, *C. imitans*, *C. afermentas*, *C. paurometabolum*, *C. urealyticum*, *C. mucifaciens*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. massiliensis*. Исследование показало, что во всех образцах, содержащих ДНК всех изученных представителей рода *Corynebacterium*, положительные сигналы отсутствовали. Специфичность способа оценили на зашифрованных типовых штаммах других микроорганизмов — *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus oligofermentas*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus agalactiae*, *Moraxella catarrhalis*, *Rothia dentocariosa*, *Rothia mucilaginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*. Всего в исследование включено 42 штамма, которые также были идентифицированы с помощью времяпролетного масс-спектрометра BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», Франция) и секвенирования 16S rRNA. Исследование показало, что во всех образцах, содержащих ДНК других изученных микроорганизмов, положительные сигналы отсутствовали.

Проведена апробация ускоренного метода лабораторной диагностики дифтерийной инфекции в модельных экспериментах на иммитантах клинических образцов. С этой целью готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* № 665. Далее 100 мкл приготовленной суспензии заражали одноразовые стерильные тампоны, с которых производили смыв патологического материала в 500 мкл стерильного физиологического раствора и последующее выделение ДНК, и 100 мкл засеивали на плотную питательную среду КТА. Засеянные чашки инкубировали при 37°C, и учет выросших колоний производили через 24 и 48 часов роста. Выделение ДНК с тампонов производили с помощью набора «Рибо-преп». Проведенные исследования показали, что аналитическая чувствительность на иммитантах клинических образцов составила 10³ ГЭ/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

За рубежом первые статьи о применении молекулярно-генетических методов при обнаружении возбудителя дифтерии появились в 1990-х годах прошлого века. Pallen M.J. [8] впервые в 1991 году применил метод ПЦР для

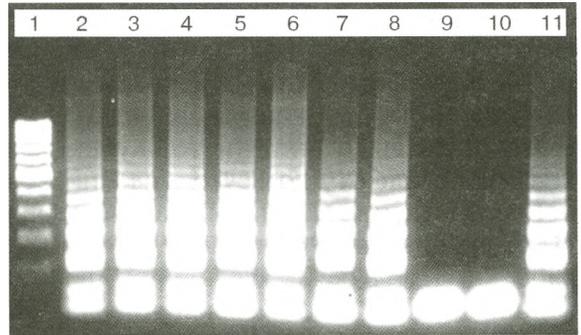


Рис. 3. Типичная электрофореграмма продуктов изотермальной амплификации — ДНК штаммов *C. diphtheriae*.

1 — маркер молекулярных масс 100 bp DNA Ladder Plus; 2 — 10⁸ ГЭ/мл; 3 — 10⁷ ГЭ/мл; 4 — 10⁶ ГЭ/мл; 5 — 10⁵ ГЭ/мл; 6 — 10⁴ ГЭ/мл; 7 — 10³ ГЭ/мл; 8 — 10² ГЭ/мл; 9 — 10¹ ГЭ/мл; 10 — отрицательный контроль; 11 — положительный контроль.

скрининга токсигенности у коринебактерий дифтерии. В последующие годы ПЦР в классическом варианте стала широко использоваться как отечественными, так и зарубежными исследователями для этих целей [1, 2, 4, 6]. Однако все эти работы были направлены на определение токсигенности у коринебактерий после выделения чистой культуры коринебактерий, что до применения ПЦР занимало от 2 до 4 суток, и не позволяли выявлять возбудителя дифтерии непосредственно в клиническом материале от больного. В 2000-х гг. развитие ПЦР-диагностики при дифтерийной инфекции пошло в направлении разработки ПЦР в режиме реального времени [3, 5, 10, 12]. Вместе с тем, в этих вариантах ПЦР также выявление гена, кодирующего дифтерийный токсин, осуществлялось с чистой культуры коринебактерий. Только в двух работах [9, 10] были предприняты попытки обнаружения гена дифтерийного токсина с помощью ПЦР в режиме реального времени на ограниченном числе иммигрантов и клинических образцов. Однако существенным недостатком применения ПЦР в режиме реального времени является высокая стоимость анализа за счет использования дорогостоящего оборудования. Другим направлением развития ПЦР-диагностики стало создание мультиплексных вариантов реакции, которые позволяют выявлять не только ген дифтерийного токсина у коринебактерий дифтерии и коринебактерий ульцеранс, но и дифференцировать эти микроорганизмы между собой [11]. Однако разработка мультиплексных ПЦР-систем имеет ряд трудностей, связанных с качеством проведения реакций и постановкой электрофореза с целью получения характерных паттерных профилей. В 2000 году была разработана амплификация в изотермальных условиях — петлеобразующая амплификация (LAMP) [7], которая в дальнейшем была модифицирована для большого числа возбудителей инфекционных заболеваний. В 2008 г. в международной базе данных NCBI/GenBank была опубликована нуклеотидная последовательность гена дифтерийного токсина размером 300 п.н., которую можно использовать при конструировании праймеров для изотермальной амплификации при выявлении коринебактерий дифтерии.

Учитывая эти данные, нами разработан ускоренный способ лабораторной диагностики дифтерийной инфекции на основе изотермальной амплификации, апробация которого проведена на типовых коллекционных штаммах, полученных из «ГКПМ-Оболensk», а также на 135 штаммах *S.diphtheriae*, выделенных с диагностической и профилактической целью в бактериологических лабораториях субъектов Российской Федерации и присланных в Референс-центр по дифтерии и коклюшу МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского. Все этапы разработки осуществлялись при параллельных бактериологических исследованиях. Установлено, что разработанный способ генодиагностики позволяет выявлять ДНК токсигенных штаммов *S.diphtheriae* двух биоваров, а также ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *S.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленными наличием делеции или мобильного генетического IS элемента в гене *tox*. Нетоксигенные токснесущие штаммы *S.diphtheriae* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием транспозона в гене *tox*, идентифицируются как нетоксигенные, а нетоксигенные токснесущие штаммы коринебактерий с механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленными наличием делеции и мобильного генетического элемента IS в гене *tox*, идентифицируются как токсигенные.

Оценку аналитической чувствительности проводили в сравнительных исследованиях при использовании трех коммерческих наборов для выделения

ДНК. При сопоставлении с данными бактериологического исследования аналитическая чувствительность разработанного способа генодиагностики с помощью набора «Рибо-преп» составила $4,5 \times 10^1$ ГЭ/мл. Специфичность способа оценивалась на 18 штаммах 16 других представителей рода *Corynebacterium* и 20 типовых штаммах микроорганизмов, выделенных из ротоглотки или вызывающих заболевания дыхательных путей. Ни в одном случае не были получены ложноположительные результаты.

Учитывая необходимость выявления возбудителя заболевания непосредственно в клиническом материале с тампона от больных коклюшем без этапа выделения «чистой» культуры с целью сокращения выдачи ответа, нами проведена апробация разработанного способа в модельных экспериментах на иммитантах клинических образцов путем заражения одноразовых стерильных сухих тампонов последовательными разведениями бактериальной культуры. Для этого готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* № 665, которые параллельно высевали на чашки с плотной питательной средой. Проведенные исследования показали, что аналитическая чувствительность на иммитантах клинических образцов составила 10^3 ГЭ/мл.

Разработанный способ ускоренной генодиагностики дифтерийной инфекции обладает высокой диагностической эффективностью, специфичностью и чувствительностью, позволяющей выявить 10^3 — $4,5 \times 10$ ГЭ/мл коринебактерий дифтерии в клиническом материале с одновременной верификацией токсигенных и нетоксигенных штаммов. На разработанный способ генодиагностики дифтерийной инфекции подана заявка на изобретение (регистрационный № 2016146369 от 25.11.2016 г.).

Работа выполнена в рамках Гос. НИР МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aravena-Román M., Bowman R., O'Neill G. Polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Pathology*. 1995, 27 (1): 71-73. PMID: 7603758.
2. Efstratiou A., Engler K. H., Dawes C. S. et al. Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic *Corynebacteria*. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 3173-3177.
3. Mancini F., Monaco M., Pataracchia M. et al. Identification and molecular discrimination of toxigenic and nontoxigenic diphtheria *Corynebacterium* strains by combined real-time polymerase chain reaction assays. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, 73 (2):111-120.
4. Mikhailovich V.M., Melnikov V.G., Mazurova I.K. et al. Application of PCR for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33 (11): 3061-3063.
5. Mothershed E.A., Cassiday P.K., Pierson K. et al. Development of a real-time fluorescence PCR assay for rapid detection of the diphtheria toxin gene. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40 (12): 4713-4719.
6. Nakao H., Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35 (7): 1651-1655.
7. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl. Acids Research*. 2000, 28 (12): 63.
8. Pallen M.J. Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* 1991, 44 (12): 1025-1026.
9. Pimenta F.P., Hirata R., Jr., Rosa A.C. et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. *J. Med. Microbiol.* 2008, 57 (11): 1438-1439.
10. Sing A., Berger A., Schneider-Brachert W. et al. Rapid detection and molecular differentiation of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49 (7): 2485-2489.

11. Torres L. de F., Ribeiro D., Hirata R., Jr. et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp. with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2013, 108 (3). pii: S0074-02762013000300272.
12. Zasada A.A, Formińska K., Wołkowicz T. et al. The utility of the PCR melting profile technique for typing *Corynebacterium diphtheriae* isolates. Lett Appl. Microbiol. 2014, 59 (3): 292-298.

Поступила 05.03.17

Контактная информация: Борисова Ольга Юрьевна, д.м.н.,
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (499)747-64-84

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

А.А.Калошин, А.В.Солдатенкова, Е.М.Зими́на, Н.А.Михайлова

ПОЛУЧЕНИЕ СЛИТЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ OprF- Δ OprI, Δ OprF- Δ OprI И OprF-aTox- Δ OprI PSEUDOMONAS AERUGINOSA

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

Цель. Получение слитых рекомбинантных белков *Pseudomonas aeruginosa*, обладающих защитными свойствами от экспериментальной синегнойной инфекции. *Материалы и методы.* В плаزمидах, предназначенных для экспрессии в клетках *Escherichia coli*, клонированы слитые последовательности генов oprF, oprI и делеционной формы toxA *P. aeruginosa*. Синтезированные рекомбинантные белки очищали в колонках с никель-сефарозой. При оценке защитных свойств препараты рекомбинантных белков вводили мышам внутривентрально двукратно с двухнедельным интервалом. При экспериментальном заражении живую вирулентную культуру *P. aeruginosa* штамма PA103 инъецировали животным внутривентрально через две недели после курса иммунизаций. *Результаты.* Получены три слитых рекомбинантных белка: 1. OprF- Δ OprI включал полноразмерную последовательность белка OprF и делеционный вариант белка OprI (с отсутствием первых 20 аминокислотных остатков); 2. Δ OprF- Δ OprI состоял из С-концевой области (192 — 342 аминокислотные остатки) OprF и делеционного варианта белка OprI; 3. OprF-aTox- Δ OprI включал полноразмерную последовательность белка OprF, последовательность нетоксичного варианта экзотоксина А (без 106 С-концевых аминокислотных остатков) и делеционный вариант белка OprI. Показано, что наилучшими защитными свойствами обладали слитые рекомбинантные белки OprF- Δ OprI и OprF-aTox- Δ OprI в иммунизирующих дозах 25 мкг и 50 мкг на животное соответственно для первого и второго белков. *Заключение.* Полученные результаты открывают перспективы для дальнейших исследований по созданию специфических иммунобиологических препаратов на основе слитых рекомбинантных белков синегнойной палочки.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 32—38

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, белок F наружной мембраны (OprF), белок I наружной мембраны (OprI), экзотоксин А, анатоксин, слитые рекомбинационные белки OprF- Δ OprI, Δ OprF- Δ OprI и OprF-aTox- Δ OprI

А.А.Kaloshin, А.В.Soldatenkova, Е.М.Zimina, N.A.Mikhailova

OBTAINING FUSED RECOMBINANT PROTEINS OprF- Δ OprI, Δ OprF- Δ OprI AND OprF-aTox- Δ OprI OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Obtaining fused recombinant proteins of *Pseudomonas aeruginosa* that have protective properties against experimental pseudomonas infection. *Materials and methods.* Fused sequences of *P. aeruginosa* genes oprF, oprI and deleted form of toxA were cloned in plasmids for the expres-

sion in *Escherichia coli*. The synthesized recombinant proteins were purified in Ni-sepharose columns. Recombinant proteins were administered to mice intraperitoneally twice with a 2 week interval to evaluate protective properties. Virulent culture of *P. aeruginosa* strain PA103 was injected into the animals intraperitoneally 2 weeks after the immunization course as experimental challenge. **Results.** 3 fused recombinant proteins were produced: 1. OprF- Δ OprI included full sequence of OprF protein and deletion variant of OprI (lacking first 20 amino acids); 2. Δ OprF- Δ OprI consisted of C-terminal region (192 — 342 amino acids) OprF and deletion variant of OprI protein; 3. OprF-aTox- Δ OprI included full sequence of OprF protein, sequence of nontoxic variant of exotoxin A (without 106 C-terminal amino acids) and deletion variant of OprI protein. Fused recombinant proteins OprF- Δ OprI and OprF-aTox- Δ OprI at immunization doses of 25 and 50 μ g for the first and second protein, respectively, were shown to have the best protective properties. **Conclusion.** The results obtained open perspectives for further studies to create specific immune biological preparations based on fused recombinant proteins of *P. aeruginosa*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 32—38

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, F protein of the outer membrane (OprF), I protein of the outer membrane (OprI), exotoxin A, anatoxin, fused recombinant proteins OprF- Δ OprI, Δ OprF- Δ OprI and OprF-aTox- Δ OprI

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее серьезных возбудителей оппортунистических инфекций является синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*). Этот микроорганизм характеризуется высокой способностью к быстрому развитию резистентности к антибиотикам, что делает неэффективными общепринятые методы лечения. Поэтому актуальным является разработка иммунобиологических препаратов для борьбы с синегнойными инфекциями. Создание вакцин на основе протективных антигенов возбудителя пока не увенчалось положительными результатами из-за технологических трудностей выделения целевых антигенов, которые преодолимы с использованием генно-инженерных методов [6, 8, 9].

Ранее показано, что рекомбинантный белок F наружной мембраны (OprF) *P. aeruginosa* и делеционная форма экзотоксина A (анатоксин) *P. aeruginosa* способствовали защите иммунизированных мышей от экспериментальной внутрибрюшинной синегнойной инфекции. При этом комплексное введение обоих белков приводило к увеличению защитных свойств [2]. Поэтому представляло интерес получение слитного рекомбинантного белка, включающего аминокислотные последовательности OprF и анатоксина — OprF-aTox, который также показал свою эффективность [7]. С целью увеличения протективных свойств и спектра антигенных детерминант исследована возможность включения в состав вакцинного препарата белка I наружной мембраны (OprI). Ген этого белка был слит с геном белка OprF в двух вариантах, с получением слитых рекомбинантных белков OprF-OprI и Δ OprF-OprI. Показано, что в результате добавления последовательности белка OprI происходило усиление защитных свойств [3]. Однако все слитые рекомбинантные белки (OprF-OprI, Δ OprF-OprI и OprF-aTox) оказались не однородны в очищенных препаратах, что обусловило актуальность усовершенствования их структур. Кроме того, представлялось целесообразным объединение трех основных протективных антигенов в одном слитом рекомбинантном белке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генно-инженерные конструкции для синтеза слитых рекомбинантных белков OprF- Δ OprI и Δ OprF- Δ OprI получены с использованием рекомбинантных плазмид pQE30-oprF-oprI и pQE30- Δ oprF-oprI [3], несущих слитые гены

orfF (полноразмерный и кодирующий только 192 — 342 аминокислотные остатки) и orfI. Для удаления первых 60 нуклеотидов гена orfI использовали ПЦР. Прямой праймер для ПЦР (5'-TCA GAT CTG CAG CCA CTC CAA AGA AAC C) содержал нуклеотидные последовательности, кодирующие с 21 по 27 аминокислоты белка OrfI и имел на 5'-конце дополнительный сайт рестрикции BglII (подчеркнут). Обратный праймер для ПЦР (5'-TCA GAT CTC TTG GCT TCA GCT TCT ACT TC) был комплементарен концу гена orfF и также содержал на 5'-конце дополнительный сайт рестрикции BglII (подчеркнут). Полученные амплификаты после очистки в агарозном геле обработали рестриктазой BglII и использовали в реакции лигирования с T4 ДНК-лигазой. Продуктами лигирования трансформировали клетки *Escherichia coli* штамма M15 (QIAGEN).

Генно-инженерная конструкция для синтеза слитого рекомбинантного белка OrfF-atox- Δ OrfI получена на основе рекомбинантной плазмиды pET28-orfF-atox, несущей слитые гены полноразмерного orfF и делеционного варианта toxA (atox) [4]. При ПЦР гена orfI использовали следующие праймеры: 5'-A ACC TCG AGC AGC AGC CAC TCC AAA GAA AC и 5'-TTC CTC GAG TTA CTT GCG GCT GGC TTT TTC C. Они содержали на своих 5'-концах дополнительные сайты рестрикции XhoI (подчеркнуты). Первый праймер включал с 59 по 80 нуклеотидные последовательности гена orfI и имел после сайта рестрикции дополнительный нуклеотид (C) для восстановления рамки считывания, а второй был комплементарен концу гена orfI. В качестве матрицы для получения гена orfI служила плазмидная конструкция, предназначенная для экспрессии рекомбинантного белка OrfI [1]. Размер делеционного варианта гена orfI составил 210 нуклеотидов. Амплификат и векторную рекомбинантную плазмиду pET28-orfF-atox обработали рестриктазой XhoI и после очистки в агарозном геле объединили в реакции лигирования с T4 ДНК-лигазой. Полученную лигазную смесь использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма BL21(DE3).

Все генно-инженерные манипуляции проводили в соответствии с общепринятыми методиками [10]. Отбор рекомбинантных клонов осуществляли по результатам рестриктного анализа и секвенирования. Секвенирование проводили с помощью капиллярного ДНК секвенатора (Applied Biosystems 310 DNA analyzer) с использованием BigDye Terminator v 3,1 Cycle Sequencing Kit в соответствии с рекомендациями фирмы производителя.

Синтез рекомбинантных белков с использованием созданных продуцентов осуществляли путем индукции экспрессии с помощью изопропил- β -Д-тиогалактопиранозида (ИПТГ). Белковые продукты анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли. Рекомбинантные белки очищали методом аффинной хроматографии с использованием Ni-сефарозы (GE Healthcare, Швеция) в 8 М буферном растворе мочевины. Белковые препараты переводили в физиологический раствор хлорида натрия с помощью диализа.

Содержание белков определяли в спектрофотометре Genesys 6 (Thermo-scientific, США) при длине волны 280 нм. При расчете концентрации белков использовали следующие коэффициенты экстинкции: 0,6 для OrfF- Δ OrfI и 0,5 для Δ OrfF- Δ OrfI, 0,89 для OrfF-atox и 0,96 для OrfF-atox-OrfI, рассчитанные в программе OMIGA.

Иммуноблоттинг проводили по общепринятой методике [10]. При анализе использовали следующие иммунные сыворотки крови кроликов: к рекомбинантному белку OrfF [5], к рекомбинантному белку OrfI [1] и к ре-

комбинантному анатоксину [4]. Для предотвращения неспецифического взаимодействия поликлональной сыворотки крови с белками *E. coli* сыворотку обрабатывали бактериальным лизатом [10].

Для проведения иммунизации животных рекомбинантные белки сорбировали в течение суток при температуре 4 — 7°C на гидроксиде алюминия (гель гидроксида алюминия, НПО «Микроген») в соотношении 1:1. Препарат вводили мышам массой 18 — 20 г внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. Использовали двукратную с двухнедельным интервалом схему иммунизации.

Через две недели после второй иммунизации животных заражали внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл различными дозами живой вирулентной культуры *P. aeruginosa* (штамм PA103), выращенной на агаризованной среде Хоттингера. Подсчет погибших и выживших особей проводили в течение семи дней с последующим определением ЛД₅₀, которую вычисляли по формуле Кербера в модификации Ашмарина—Воробьева: $LD_{50} = 10^{(lgA - lg2 \times (B_1/C_1 + B_2/C_2 + B_3/C_3 + B_4/C_4 + B_5/C_5 - 0,5))}$, где А — максимальная инфекционная доза в опыте, В — количество животных, павших в группе, С — первоначальное количество животных в группе.

Все работы с животными проводили в соответствии с положениями «Правила проведения работ и использованием экспериментальных животных».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения рекомбинантных белков, содержащих слитые последовательности белка OprF (в полноразмерной и укороченной формах) и белка OprI с отсутствием первых двадцати аминокислот, проведены делеции в плазмидных конструкциях pQE30-oprF-oprI (4,7 kb) и pQE30-ΔoprF-oprI (4,3 kb), которые использовались для синтеза слитых рекомбинантных белков OprF-OprI (47,9 кДа) и ΔOprF-OprI (31,6 кДа) [6]. Делеции проводили с помощью ПЦР, амплифицируя в линейном виде плазмиды pQE30-oprF-oprI и pQE30-ΔoprF-oprI, у которых отсутствовали триплеты, кодирующие первые двадцать аминокислот белка OprI. Амплификаты (размером около 4,7 kb и 4,3 kb) после обработки рестриктазой BglII (содержались в последовательностях, используемых для ПЦР праймерах) замкнули на кольцевые формы в реакции лигирования. В результате экспрессии полученных модифицированных конструкций (pQE30-oprF-ΔoprI и pQE30-ΔoprF-ΔoprI) в клетках *E. coli* штамма M15 наблюдали синтез слитых рекомбинантных белков OprF-ΔOprI и ΔOprF-ΔOprI с массой около 50 и 30 кДа соответственно. Расчетные молекулярные массы данных белков соответствовали 46,8 и 30,5 кДа.

Для создания слитого рекомбинантного белка OprF-aTox-ΔOprI, включающего в своем составе аминокислотные последовательности основных протективных антигенов *P. aeruginosa*, использовали плазмидную конструкцию pET28-oprF-atox (8 kb), предназначенную для синтеза рекомбинантного белка OprF-aTox (103,6 кДа) [7]. В эту плазмиду встроили амплифицированный делеционный вариант гена oprI по сайту рестрикции XhoI, который был расположен после гена atox. В результате экспрессии полученной плазмидной конструкции pET28-oprF-atox-ΔoprI в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) происходил синтез рекомбинантного белка OprF-aTox-ΔOprI с массой около 110 кДа.

Рекомбинантные белки хроматографически очищали в колонках с никель-сефарозой, поскольку они имели на N-конце дополнительную 6-гистидиновую аминокислотную последовательность. Слитые рекомбинантные белки OprF-ΔOprI и ΔOprF-ΔOprI проявили высокую специфичность в иммуноблот-

тинге по отношению к кроличьим сывороткам, иммунным к отдельным рекомбинантным белкам *OrgF* и *OrgI*. Слитый рекомбинантный белок *OrgF-aTox-ΔOrgI* был специфичен в иммуноблоттинге при взаимодействии с кроличьими антисыворотками к отдельным рекомбинантным белкам *OrgF*, *OrgI* и анатоксину.

Защитные свойства очищенных гибридных белков оценены при экспериментальной синегнойной инфекции. При иммунизации рекомбинантными белками *OrgF-ΔOrgI* и *ΔOrgF-ΔOrgI* использовали дозы 25 и 50 мкг, а при иммунизации рекомбинантным белком *OrgF-aTox-ΔOrgI* использовали дозы 50 и 100 мкг. В качестве препарата сравнения при исследовании рекомбинантного *OrgF-aTox-ΔOrgI* использовали рекомбинантный белок *OrgF-aTox*, который вводили в дозах 50 и 100 мкг по аналогичной схеме.

После курса двукратной иммунизации животных заражали различными дозами с двукратным шагом (от 6,25 до 100 млн микробных клеток м.к.) живой вирулентной культурой *P. aeruginosa*. ЛД₅₀ для мышей, иммунизированных рекомбинантным белком *OrgF-ΔOrgI*, составила 50 млн м.к. при дозе 50 мкг и 53,59 млн м.к. при дозе 25 мкг. ЛД₅₀ в группах мышей, иммунизированных рекомбинантным белком *ΔOrgF-ΔOrgI* в тех же дозах, составила 46,65 и 43,53 млн м.к. соответственно. Значения ЛД₅₀ в группах мышей, иммунизированных рекомбинантным белком *OrgF-aTox-ΔOrgI*, составили 53,59 и 35,36 млн м.к. для доз введения 50 и 100 мкг соответственно. В то же время, аналогичные значения для групп мышей, иммунизированных рекомбинантным белком *OrgF-aTox*, составляли 40,61 и 32,99 млн м.к. В качестве контроля выступала группа неиммунизированных животных той же партии, которым водили от 3,125 до 50 млн

Исследование защитных свойств рекомбинантных белков *P. aeruginosa*

Группа животных	Доза заражения, млн м.к.	Количество мышей, павших/выживших	ЛД ₅₀ , млн м.к.	ИЭ*
Иммунизированные <i>OrgF-aTox</i> (50 мкг на мышь)	100	8/2	40,61	2,64
	50	5/5		
	25	3/7		
	12,5	2/8		
Иммунизированные <i>OrgF-aTox</i> (100 мкг на мышь)	100	10/0	32,99	2,14
	50	6/4		
	25	3/7		
	12,5	2/8		
Иммунизированные <i>OrgF-aTox-ΔOrgI</i> (50 мкг на мышь)	100	7/3	53,59	3,48
	50	4/6		
	25	2/8		
	12,5	1/9		
Иммунизированные <i>OrgF-aTox-ΔOrgI</i> (100 мкг на мышь)	100	8/2	35,36	2,30
	50	5/5		
	25	6/4		
	12,5	1/9		
Иммунизированные <i>OrgF-ΔOrgI</i> (50 мкг на мышь)	100	5/5	50,00	3,25
	50	4/6		
	25	4/6		
	12,5	2/8		
Иммунизированные <i>OrgF-ΔOrgI</i> (25 мкг на мышь)	100	7/3	53,59	3,48
	50	5/5		
	25	1/9		
	12,5	1/9		
Иммунизированные <i>ΔOrgF-ΔOrgI</i> (50 мкг на мышь)	100	8/2	46,65	3,03
	50	5/5		
	25	2/8		
	12,5	1/9		
Иммунизированные <i>ΔOrgF-ΔOrgI</i> (25 мкг на мышь)	100	10/0	43,53	2,83
	50	4/6		
	25	3/7		
	12,5	0/10		
Интактные мыши (контрольные)	50	10/0	15,39	—
	25	7/3		
	12,5	3/7		
	6,25	2/8		
		3,125	0/10	

Примечание. *ИЭ — индекс эффективности защитных свойств.

м.к. синегнойной культуры и ЛД₅₀ в которой соответствовала 15,39 млн м.к. (табл.)

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее получены и исследованы гибридные (слитые) рекомбинантные белки наружной мембраны *P. aeruginosa*: OprF-OprI и ΔOprF-OprI. Первый рекомбинантный белок включал полноразмерную последовательность, а второй С-концевую область (192 — 342 аминокислотные остатки) белка OprF, которые были слиты с полноразмерной последовательностью белка OprI [3]. В результате двукратной иммунизации установлено, что слитый рекомбинантный белок обладал более выраженным защитным эффектом в сравнении с использованием отдельного рекомбинантного белка OprF. Второй слитый рекомбинантный белок — ΔOprF-OprI, полученный с использованием делеционного варианта гена oprF, не показал достоверного преимущества по сравнению с рекомбинантным белком OprF. Хроматографически очищенные рекомбинантные белки OprF-OprI и ΔOprF-OprI состояли из двух фракций различной молекулярной массы. Молекулярная масса тяжелых фракций составляла около 50 кДа для белка OprF-OprI и около 30 кДа для белка ΔOprF-OprI, что соответствовало расчетным данным для слитых рекомбинантных белков. Молекулярная масса легких фракций соответствовала 40 кДа и 20 кДа. Тяжелые фракции реагировали с антисыворотками к обоим рекомбинантным белкам (OprF и OprI), в то время как легкие только с антисывороткой к рекомбинантному белку OprF. Разница в размерах фракций у обоих рекомбинантных белков составила 10 кДа, что соответствовало размеру рекомбинантного белка OprI. Предположительно, образование легких фракций происходило из-за отщепления аминокислотных последовательностей белка OprI в клетке-продуcente. Вероятно, в районе первых аминокислотных остатков последовательности белка OprI расположен сайт расщепления полипептидной цепи. Поэтому в рекомбинантных плазмидных конструкциях pQE30-oprF-oprI и pQE30-ΔoprF-oprI, предназначенных для экспрессии в бактериальных клетках *E. coli* штамма M15, проведена делеция нуклеотидной последовательности, кодирующей начальные аминокислотные остатки белка OprI. В результате удалось получить слитые рекомбинантные белки OprF-ΔOprI и ΔOprF-ΔOprI, уровень синтеза которых, визуально, оказался в несколько раз выше, чем у штаммов-продуцентов белков OprF-OprI и ΔOprF-OprI. При этом не происходило накопления в клетках более легких фракций, а рекомбинантные продукты проявили специфичность как с сывороткой к OprF, так и с сывороткой OprI.

Основой при создании конструкции, предназначенной для синтеза рекомбинантного белка, состоящего из слитых последовательностей основных протективных антигенов *P. aeruginosa*, стимулирующих иммунные реакции против поверхностных белков OprF и OprI, а также экзотоксина А, служила рекомбинантная плаزمида pET28b-oprF-atox [7]. Эта плазмида содержала полноразмерный ген oprF *P. aeruginosa* (1050 н.п.), встроенный по сайту рестрикции HindIII. После гена oprF по сайтам рестрикции HindIII и XhoI был встроен делеционный вариант гена toxA (ген, кодирующий экзотоксин А *P. aeruginosa*) — atox. Ген atox, размером 1593 н.п., кодировал полноразмерные первый и второй домены экзотоксина А и только часть третьего цитотоксического домена. Эти слитые последовательности генов oprF и atox находились под контролем регуляторных участков для экспрессии в бактериальных клетках *E. coli* штамма BL21(DE3). В конце последовательности гена atox отсутствовал стоп-

кодон, что давало возможность для встраивания следующего гена, который представлял собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок OpgI *P. aeruginosa*, по сайту рестрикции XhoI. При этом проводили встраивание не полноразмерного гена, а последовательности с отсутствующими нуклеотидами, кодирующих первые двадцать аминокислот. В результате был получен слитый рекомбинантный белок OpgF-aTox-ΔOpgI, специфически реагирующий в иммуноблоттинге с антителами к отдельным рекомбинантным белкам OpgF, opgI и анатоксину.

При подборе иммунизирующих доз для оценки защитных свойств в настоящем исследовании использовали дозы 25 и 50 мкг для слитых рекомбинантных белков OpgF-ΔOpgI и ΔOpgF-ΔOpgI. Для рекомбинантного белка OpgF-ΔOpgI, вводимого в дозе 25 мкг, индекс эффективности защитных свойств (соотношение значения ЛД₅₀ в опытной группе к значению ЛД₅₀ в контрольной группе) соответствовал 3,48, для варианта ΔOpgF-ΔOpgI — 3,03.

При исследовании слитого рекомбинантного белка OpgF-aTox-ΔOpgI использовали дозы 50 и 100 мкг. Наиболее эффективной для этого рекомбинантного белка можно считать дозу 50 мкг, при которой индекс эффективности соответствовал индексу эффективности слитого рекомбинантного белка OpgF-ΔOpgI — 3,48. Использование более высокой дозы в 100 мкг вызывало снижение индекса эффективности до 2,3.

Полученные предварительные результаты открывают перспективы для дальнейших исследований по созданию специфических иммунобиологических препаратов на основе слитых рекомбинантных белков синегнойной палочки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гатыпова Е.В., Злыгостев С.А., Калошин А.А., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантного белка I наружной мембраны (OpgI) *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его антигенных свойств. Журн. микробиол. 2008, 6: 50-53.
2. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств комплекса рекомбинантного белка F наружной мембраны и рекомбинантного анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2016, 71 (1): 5-10.
3. Калошин А.А., Михайлова Н.А., Леонова Е.И. Получение гибридного белка OpgF-OpgI *Pseudomonas aeruginosa*. Журн. микробиол. 2012, 3: 35-43.
4. Калошин А.А., Исаков М.А., Михайлова Н.А., Вергиев Ю.В. Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 154 (9): 330-335.
5. Калошин А.А., Гатыпова Е.В., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств. Биотехнология. 2011, 2: 74-84.
6. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А. и др. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015, 17 (3): 170-186.
7. Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А., Зимина Е.М. и др. Получение рекомбинантного слитого белка OpgF-aTox *Pseudomonas aeruginosa*, обладающего защитными свойствами. Биопрепараты. 2016, 16 (2): 96-100.
8. Chatterjee M., Anju C.P., Biswas L. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. Int. J. Med. Microbiol. 2016, 306 (1): 48-58.
9. Doring G., Pier G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine. 2008, 26 (8): 1011-1024.
10. Sambrook J.F., Russell D.W. Molecular Cloning. 2001.

Поступила 22.05.17

Контактная информация: Калошин А.А.,
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА МАКСИМАЛЬНОЙ ЭНТРОПИИ (MAXENT) ДЛЯ ЗОНИРОВАНИЯ ТЕРРИТОРИИ ПО РИСКУ ЗАРАЖЕНИЯ ГЛПС НА ПРИМЕРЕ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной, Нижний Новгород; ²Ставропольский противочумный институт

Цель. Зонирование территории Нижегородской области по риску заражения ГЛПС с использованием метода Maxent. *Материалы и методы.* Материалами являлись данные Центра гигиены и эпидемиологии по Нижегородской области по каждому случаю заражения ГЛПС за 2010 — 2016 гг.; данные по условиям окружающей среды (Bioclim); данные по вегетационной активности (MODIS). Обработка проводилась в пакетах ArcGIS 10.2.2 и Maxent 3.3.3к. *Результаты.* Получена и валидирована модель для оценки потенциального риска заражения ГЛПС на территории Нижегородской области. *Заключение.* Полученные результаты не противоречат фактически наблюдаемой пространственной локализации случаев заражения ГЛПС (точность предсказания составляет более 75%), выявляют связь между пространственной локализацией случаев заражения ГЛПС и сочетания факторов среды и позволяют формировать прогнозы изменения границ потенциально опасных участков при изменении факторов среды.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 39—45

Ключевые слова: ГЛПС, Maxent, пространственное моделирование, Bioclim, NDVI, ГИС

L.A.Solntsev¹, V.M.Dubyansky²

EXPERIENCE OF USING MAXIMAL ENTROPY METHOD (MAXENT) FOR ZONING OF THE TERRITORY BY HFRS RISK USING NIZHNY NOVGOROD REGION AS AN EXAMPLE

¹Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod; ²Stavropol Institute of Plague Control, Russia

Aim. Zoning of the territory of Nizhny Novgorod region by risk of HFRS infection using Maxent method. *Materials and methods.* Data from Centre of Hygiene and Epidemiology in Nizhny Novgorod region for each case of the HFRS for 2010 — 2016, data on environment (Bioclim), data on vegetation activity (MODIS) were used. ArcGIS 10.2.2 and Maxent 3.3.3k packages were used. *Results.* Model for evaluation of potential risk of HFRS in Nizhny Novgorod was developed and validated. *Conclusion.* The data obtained do not contradict the observed spatial localization of the cases of HFRS infection (prediction accuracy over 75%), detected connection between spatial localization of HFRS cases and combination of environment factors and allow to predict changes in borders of potentially dangerous segments after environmental changes.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 39—45

Key words: HFRS, Maxent, spatial modelling, Bioclim, NDVI, GIS

ВВЕДЕНИЕ

При изучении закономерностей пространственного распределения случаев природно-очаговых заболеваний первоочередной задачей является выявление границ очагов. Очаг во многом определяется экологической нишей, которую занимают организмы — носители возбудителя. Знание о простран-

ственных границах природных очагов позволяет более качественно проводить профилактические мероприятия, направленные на снижение риска заражения.

Одной из актуальных природно-очаговых инфекций для территории Российской Федерации и, в частности, Нижегородской области является геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС). Надзор за этой инфекцией и ее регистрация регламентируются [2]. Данный документ определяет мышевидных грызунов как единственный источник заражения ГЛПС и указывает связь между локализацией случаев заражения и ареалом переносчика.

Сама численность переносчиков определяется условиями окружающей среды, формирующей фундаментальную и реализованную экологические ниши [1]. Поэтому, используя данные по факторам окружающей среды и ретроспективные данные локализации случаев заражения человека, можно сделать попытку выделить на изучаемой территории участки, наиболее благоприятные по сочетанию условий для заражения ГЛПС (по сути наиболее благоприятные для обитания грызунов-носителей). Такой опосредованный путь диктуется тем, что сбор зоологического материала, как правило, ведется с низкой степенью детализации. Данные усредняются до административного района области. Границы очагов редко совпадают с административными границами, и один очаг может располагаться на территории нескольких районов. Учет случаев заражения ведется с точностью до населенного пункта (по возможности) и является более детальным с пространственной точки зрения. При этом следует учитывать, что часть случаев имеет систематическую ошибку места локализации, поскольку в материалах регистрации случаев ГЛПС указывается предполагаемое место заражения. Формально задача формулируется так: полагая, что сочетания условий окружающей среды в окрестностях населенного пункта, где был зарегистрирован случай заражения, является оптимальными для обитания переносчика инфекции, нужно на всей исследуемой территории определить участки со схожими условиями среды. Степень такой схожести желательно получать в виде некой безразмерной величины (расчетной вероятности) и иметь возможность провести статистические тесты качества расчетов.

Целью исследования являлось зонирование территории Нижегородской области по потенциальному риску заражения человека ГЛПС. Основной задачей — создание вероятностной модели пространственного распределения риска заражения в зависимости от сочетания условий среды.

Аналогичные задачи уже достаточно давно решаются в экологии с использованием так называемых моделей распределения видов (SDM, species distribution models).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модели распределения видов — широкий класс моделей, которые позволяют установить связь между фактом встречи вида в какой-либо точке пространства и сочетанием условий окружающей среды в данной точке [7]. В работе [5] приведен большой обзор моделей и примеров их использования. Исходными данными для моделей является информация о точках встречи изучаемого вида. Если данные содержат информацию о присутствии/отсутствии вида, то, как правило, используются статистические модели общего назначения [3, 9]. Для случаев, когда есть данные только о присутствии вида, наиболее применимым методом является Maxent. В работе [6] приведены

ссылки на работы, где данный метод применялся как самостоятельно, так и в сравнении с другими методами.

Метод максимальной энтропии (Maxent), предложенный в работах [12, 13], является SDM, специально разработанной для случаев, когда известны точки присутствия вида, но нет точных данных о его отсутствии на определенной территории [6, 10, 14, 15]. Для моделирования помимо координат точек присутствия вида используется набор прямоугольных решеток, полностью покрывающих исследуемую территорию, каждая из которых описывает тот или иной фактор среды. Значение каждой ячейки решетки представляет собой величину фактора на территории, ограниченной ячейкой. Например, для фактора «годовое количество осадков» значение ячейки будет представлять собой количество осадков (в мм), которое выпадает на территории, ограниченной ячейкой, за год. Чем меньше размер ячейки, тем более детально описывается фактор среды. Все такие решетки должны иметь одинаковый пространственный охват (описывать одну и ту же территорию) и одинаковый размер ячеек. Накладывая на такую решетку (решетки) точки с координатами встречи с видом мы получаем значения набора параметров окружающей среды для точек встречи. Результатом моделирования является пространственная решетка, где для каждой ячейки рассчитана вероятность встречи вида. Интерпретируя терминологию модели в рамках нашего исследования, «точка встречи» будет являться локализацией случая заражения ГЛПС, а «вероятность встречи» — числовой оценкой того, насколько в данной ячейке сочетание условий среды будут благоприятны для риска заражения.

Для оценки модели используется ROC (receiver operating characteristic) — анализ, показывающий соотношение чувствительности модели к специфичности. В случае Maxent в качестве меры чувствительности выступает величина, представляющая собой долю ячеек с известным наличием вида, для которых модель предсказала отсутствие его в данной ячейке [13]. Этот показатель называется «омиссия». Для количественной оценки ROC анализа используется критерий AUC (area under curve).

Можно обозначить следующие диапазоны критерия AUC: 1 — 0.9 — отлично, 0.9 — 0.8 — хорошо, 0.8 — 0.7 — допустимо, 0.5 — 0.7 — плохо, 0 — 0.5 — недопустимо (модель дает менее точный прогноз, чем случайное предсказание)

Следует отметить, что модель Maxent не позволяет решить все проблемы, связанные с пространственным моделированием. Так, критический анализ данной модели и сопоставление ее с моделью логистической регрессии даны в работе [8]. В работе [11] помимо детального анализа самой модели рассмотрены вопросы, связанные с характером исходных данных, выбором параметров для моделирования, интерпретацией получаемых результатов.

Использованы данные Центра гигиены и эпидемиологии по Нижегородской области по каждому случаю заражения ГЛПС, указанному с точностью до населенного пункта на территории Нижегородской области, за 2010 — 2016 гг. Для получения пространственных координат населенных пунктов, в которых были зарегистрированы больные, проведена процедура геокодирования с использованием сервиса Nominatim (<http://nominatim.openstreetmap.org>). В качестве топоосновы использовались материалы OpenStreetMap (<https://www.openstreetmap.org>). Каждый случай заражения представляли в виде точки на карте с координатами, соответствующим координатам населенного пункта, где произошло заражение.

Данные по условиям окружающей среды были получены из банка данных

Biolclim (<http://www.worldclim.org/bioclim>). Для учета состояния растительности (и типа землепользования) были использованы спутниковые данные MODIS (MOD13A3, <https://modis-land.gsfc.nasa.gov/vi.html>), представляющие собой многолетние ежемесячно усредненные данные по значению вегетационного индекса NDVI (Normalized Difference Vegetation Index — Нормализованный относительный индекс растительности [4]).

В качестве обучающей выборки использованы данные по случаям заражения людей за 2010 — 2015 гг. В качестве проверочной выборки послужили данные за 2016 г.

Для предварительной подготовки данных по условиям окружающей среды (обрезки по границе территории, приведение всех растров к единому размеру пикселя в 1 км^2 , конвертирование в формат asc) использовалась программа ArcGIS 10.2.2. Моделирование проводилось в программе MaxEnt 3.3.3к (<https://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным результатам, модель можно оценить как хорошую (AUC=0.854) (рис.). Проверка полученной модели на данных 2016 года показала ее достаточно высокую прогностическую способность (AUC=0.76). Моделирование проводили в 2 этапа. Все результаты доступны для скачивания по следующим ссылкам:

1. Этап 1. Моделирование с использованием всех факторов окружающей среды и с использованием методов для рандомизации для оценки устойчивости (<https://mail.nniem.ru/owncloud/s/f48cEtd8vaf5uAQ>).

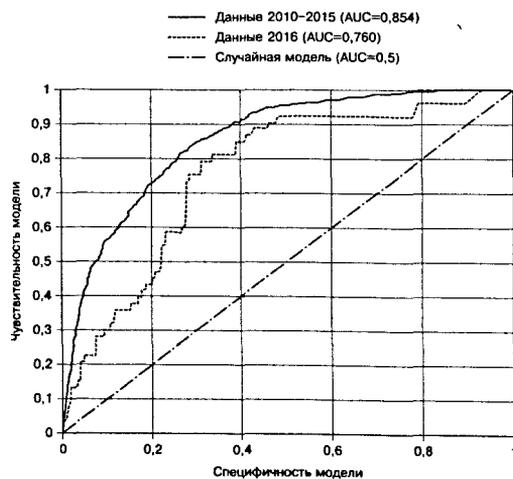
2. Этап 2. Моделирование с использованием обучающей и тестовой выборки (<https://mail.nniem.ru/owncloud/s/bf9cOIJGxiovhM0>).

Модель выдает значение в безразмерной величине на шкале от 0 до 1. Для удобства дальнейшей работы все значения полученной решетки были разбиты на классы. Выбор границ классов был основан на анализе характера гистограммы распределения полученных данных. Распределение характеризовалось большим количеством ячеек в диапазоне значений от 0 до 0.1, примерно равным числом значений ячеек в диапазоне 0.2 — 0.7 и небольшим числом значений в диапазоне 0.7 — 1.

Таким образом, использование метода равных частот на основе квартилей привело бы к необоснованному отнесению всех ячеек с значениями от 0.5 и выше к 4 классу (класс наибольшего риска) (рис.).

Исходя из этого, был применен метод равных интервалов и определены следующие границы классов для перехода от количественных к качественным показателям: 0 — 0.2 — зона очень низкого риска, 0.2 — 0.4 — зона низкого риска, 0.4 — 0.6 — зона среднего риска, 0.6 — 0.8 — зона высокого риска, 0.8 — 1 — зона очень высокого риска.

Проведенные с использованием модели расчеты показывают, что тер-



Результаты ROC анализа полученной модели для тренировочных и тестовых данных.

ритория Нижегородской области не однородна по риску заражения ГЛПС. Можно выделить участки очень высокого риска: восточная часть Борского района вдоль р. Волга, Кстовский район и его граница с Нижним Новгородом, северная часть Богородского района, центральные части Семеновского, Уренского и Тоншаевского районов, территории Краснобаковского, Варнавинского и Ветлужского района вдоль реки Ветлуга.

К зонам высокого риска можно отнести восточную часть Кстовского района вдоль р. Волга, Лысковский район, восточную часть Ковернинского района и западную часть Сокольского района. Сама территория Нижнего Новгорода была исключена из анализа по причине того, что данный населенный пункт, являясь крупной городской агломерацией, обладает резко отличающимися от остальной области условиями среды.

Особое внимание следует обратить на зоны, локализованные на границе Вачского и Навашинского районов, севере Володарского района, западной части Тонкинского района. Данные участки относятся к территориям высокого потенциального риска, но при этом до сих пор случаев заражения ГЛПС там зарегистрировано не было. Причиной могло послужить недостаточное пространственное разрешение части данных. Примерно 1/3 имеющихся данных по случаям заражения ГЛПС имеет пространственную привязку до уровня административного района. Такие данные не могут быть использованы в процессе моделирования Следовательно, мы можем предположить, что на данных территориях имели место случаи заражения ГЛПС, но данная информация была утрачена в процесс регистрации. Мы полагаем, что на данные зоны следует обратить особое внимание в процессе санитарно-эпидемиологического надзора.

Стоит отметить, что характер исходных данных (а именно их привязанность к населенным пунктам) достаточно сильно влияет на результат моделирования. Фактически модель определяет те населенные пункты, сочетания условий среды в окрестностях которых наиболее благоприятны для риска заражения. Под «благоприятностью» в данном случае следует понимать сочетание условий в данной точке пространства, схожее с таковым в точке пространства, где было фактически зарегистрирован случай заражения ГЛПС.

Процедура моделирования проводилась в 2 этапа. На первом этапе использовались все переменные из набора BioClim (19 переменных) и 9 переменных из набора NDVI. Поскольку метод расчета NDVI в зимние месяцы не позволяет качественно раз-

Вклад переменных по результатам второго этапа моделирования

Переменная	Описание	Вклад, %
ndvi_04	Уровень вегетационной активности апреля	25,4
bio_2	Размах среднесуточной температуры	15,1
ndvi_10	Уровень вегетационной активности октября	14,6
ndvi_08	Уровень вегетационной активности августа	14,6
ndvi_07	Уровень вегетационной активности июля	9,2
bio_9	Средняя температура самого засушливого квартала	5,2
ndvi_09	Уровень вегетационной активности сентября	4,2
ndvi_05	Уровень вегетационной активности мая	2,9
bio_18	Количество осадков самого теплого квартала	2,2
bio_4	Сезонность колебаний температуры	1,9
ndvi_06	Уровень вегетационной активности июня	1,3
bio_19	Количество осадков самого холодного квартала	1,3
bio_6	Минимальная температура самого холодного месяца	0,9
bio_15	Сезонность уровня осадков	0,6
bio_8	Средняя температура самого влажного квартала	0,5
bio_5	Максимальная температура самого теплого месяца	0,1

личить типы растительности, а по большей части, просто дифференцирует водную поверхность, открытую поверхность и поверхность, занятую лесом, это временной период был исключен из моделирования.

В процессе моделирования алгоритм Maxent также определяет условную «важность» каждой переменной для итоговой модели. Суммарный вклад всех переменных принимается за 100%. После первого этапа были выбраны переменные, вклад которых составлял более 1%. Для второго этапа моделирования были использованы только они. В табл. приведены вклады каждой переменной по результатам второго этапа.

Мы ранжировали процентный вклад каждого фактора и условно считали наиболее важными из них те, значения которых превышали медиану (2,55%). Согласно полученным результатам, факторами, значения которых определяют итоговую вероятность, являются вегетационная активность в апреле, июле—августе и сентябре—октябре, размах среднесуточной температуры, средняя температура самого засушливого квартала. Таким образом, определяющими являются факторы, которые непосредственно влияют на процесс формирования кормовой базы мышевидных грызунов — переносчиков возбудителя ГЛПС.

Полученная в результате моделирования карта зон риска заражения ГЛПС на территории Нижегородской области не противоречит данным, получаемым при районировании территории Нижегородской области по числу случаев ГЛПС (суммарно по районам). Выделенные в результате моделирования участки высокого и очень высокого риска располагаются в районах, где фиксируется самое большое число случаев заражения. При этом карта зон позволяет более детально обозначить границы потенциально опасных территорий, не привязываясь к административному делению, что невозможно сделать при использовании данных исключительно на уровне административных районов.

Особый интерес представляют участки, определенные как зоны высокого или очень высокого риска, на территории которых нет населенных пунктов, где были зарегистрированы случаи заражения ГЛПС. На них следует обратить внимание при планировании и проведении мероприятий, связанных с профилактикой ГЛПС в природном очаге. Также выделены участки, которые определены как зоны высокого или очень высокого риска, локализованные на административной границе области. Можно предположить, что в данном случае мы наблюдаем распространение зоны повышенного риска за границы Нижегородской области. В данном случае для повышения эффективности профилактических мероприятий необходимо проводить изучение и зонирование территории Нижегородской области в сочетании с аналогичными исследованиями на территориях ее ближайших соседей.

Таким образом, мы получили модель, позволяющую разделить исследуемую территорию по степени риска заражения человека ГЛПС с высокой ($AUC=0.854$) степенью достоверности и значимой прогностической ценностью ($AUC=0.76$). Использование модели позволяет получить новые, более детальные с пространственной точки зрения данные о границах потенциально опасных в аспекте ГЛПС участков области. В особенности, это касается тех территорий, где ранее не отмечались случаи заражения ГЛПС.

В перспективе модель может быть использована для прогнозирования изменения границ зон риска заражения ГЛПС при изменении условий среды

(увеличение среднемесячной температуры, смена режима увлажнения, смена характера растительности). Появляется возможность разрабатывать превентивные мероприятия по контролю за природно-очаговыми инфекциями, опираясь на общепринятые климатические модели. Подобный подход может быть полезен при моделировании распространения других инфекций, переносчиком возбудителей которых являются клещи и комары.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джиллер П. Структура сообществ и экологическая ниша. М., Мир, 1988.
2. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2614-10 «Профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом», утвержд. Постановлением Главного санитарного врача от 26 апреля 2010 г., № 38.
3. Corsi F., de Leeuw J., Skidmore A. Modeling species distribution with GIS. *In: Boitani L., Fuller T. (Eds.). Research techniques in animal ecology. New York, Columbia University Press, 2000, p. 389-434.*
4. Crippen R. E. Calculating the Vegetation Index Faster. *Remote Sensing of Environment. 1990, 34: 71-73.*
5. Elith J., Leathwick J.R. Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics. 2009, 40: 677-697.*
6. Elith J., Phillips S. J., Hastie T. et al. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions. 2011, 17: 43-57.*
7. Franklin J. Mapping species distributions: spatial inference and prediction. Cambridge University Press, 2009.
8. Gastón A., García-Viñas J.I. Modelling species distributions with penalized logistic regressions: A comparison with maximum entropy models. *Ecol. Model. 2011, 222 (13): 2037-2041.*
9. Guisan A., Zimmerman N.E. Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecol. Model. 2000, 135: 147-186.*
10. Liu H.-N., Gao L.-D., Chowell G. et al. Time-specific ecologic niche models forecast the risk of haemorrhagic fever with renal syndrome in Dongting Lake District, China, 2005–2010. *PLOS ONE. 2014, 9 (9): e106839.*
11. Merow C., Smith M.J., Silander J.A. A practical guide to Maxent for modeling species' distributions: what it does, and why inputs and settings matter. *Ecography. 2013, 36 (10): 1058-1069.*
12. Phillips S.J., Anderson R.P., Schapire R.E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Mod. 2006, 190: 231-259.*
13. Phillips S.J., Dudík M. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography. 2008, 31: 161-175.*
14. Wei L., Qian Q., Wang Z.Q. et al. Using geographic information system-based ecologic niche models to forecast the risk of hantavirus infection in Shandong Province, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg. Mar. 2011, 84 (3): 497-503.*
15. Zeimes C.B., Olsson G.E., Ahlm C. Modelling zoonotic diseases in humans: comparison of methods for hantavirus in Sweden. *Int. J. Health Geogr. 2012, 11: 39.*

Поступила 05.03.17

Контактная информация: Солнцев Леонид Аркадьевич, к.б.н.,
603950, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71, р.т. (831)469-79-01

Н.А.Новикова¹, Т.А.Сашина¹, Л.А.Солнцев¹, Н.В.Епифанова¹,
А.Ю.Кашников¹, Л.В.Погодина², И.Н.Окунь², О.Н.Княгина²

ПРОЯВЛЕНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В НИЖНЕМ НОВГОРОДЕ В ПРЕДВАКЦИНАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

¹Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной, ²Управление Роспотребнадзора по Нижегородской области, Нижний Новгород

Цель. Изучение проявлений эпидемического процесса ротавирусной инфекции в Нижнем Новгороде в предвакцинальный период для оценки возможного влияния на уровень заболеваемости инфекцией начавшегося на территории РФ применения ротавирусной вакцины. *Материалы и методы.* Проанализированы сведения о заболеваемости ротавирусной инфекцией в Нижнем Новгороде за двенадцатилетний период (2005 — 2016 гг.), ее возрастное и сезонное распределение. Проведено генотипирование ротавирусов с использованием мультиплексной ПЦР и частичного секвенирования генов VP4 и VP7. *Результаты.* Показано, что заболеваемость РВИ в Нижнем Новгороде в условиях отсутствия применения средств специфической профилактики находится на среднем уровне, многолетняя динамика заболеваемости отражает динамику общероссийского показателя. Сезон 2015 — 2016 гг. характеризовался интенсификацией эпидемического процесса в возрастных группах организованных детей 3 — 6 и 7 — 14 лет и взрослых. Сезонная надбавка включала декабрь-май, сезонные максимумы заболеваемости в разных возрастных группах приходились на разные месяцы. Генетическая структура нижегородской популяции РВ-А в это время была представлена 10 типами с доминированием G9P[8] (44,4%). *Заключение.* Рост заболеваемости РВИ в Нижнем Новгороде в 2005 — 2016 гг. и изменения в возрастных и сезонных проявлениях инфекции проходили в условиях смены доминирующего генотипа РВ-А (G4P[8] на G9P[8]).

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 46—52

Ключевые слова: ротавирусная инфекция, эпидемический процесс, ротавирусы группы А, генотипирование

Н.А.Новикова¹, Т.А.Сашина¹, Л.А.Солнцев¹, Н.В.Епифанова¹,
А.Ю.Кашников¹, Л.В.Погодина², И.Н.Окунь², О.Н.Княгина²

MANIFESTATIONS OF EPIDEMIC PROCESS OF ROTAVIRUS INFECTION IN NIZHNY NOVGOROD IN PRE-VACCINATION PERIOD

¹Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Administration of Rosпотребнадзор in Nizhny Novgorod Region, Nizhny Novgorod, Russia

Aim. Study the manifestations of epidemic process of rotavirus infection in Nizhny Novgorod in pre-vaccination period to evaluate the possible effect on morbidity for the rotavirus vaccine application introduction. *Materials and methods.* Rotavirus morbidity data were analyzed for the 12-year period (2005 — 2016), as well as its age and season distribution. Rotavirus genotyping was carried out using multiplex PCR and partial sequencing of VP4 and VP7 genes. *Results.* RVI morbidity in Nizhny Novgorod was shown to be at a moderate level when specific prophylaxis was not applied, multi-year dynamics for morbidity reflects the all-Russian state. 2015 — 2016 were characterized by intensification of the epidemic process in age groups of organized children (3 — 6 and 7 — 14) and adults. Season increase included December–May, seasonal morbidity maximums in different age groups took place during different months. Genetic structure of Nizhny Novgorod population PV-A during this time was presented by 10 types with G9P[8] (44,4%) dominating. *Conclusion.* Growth of RVI morbidity in Nizhny Novgorod in 2015 — 2016 and changes in age and season manifestations of the infection took place under the condition of change of the dominating genotype PV-A (G4P[8] to G9P[8]).

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 46—52

Key words: rotavirus infection, epidemic process, group A rotaviruses, genotyping

ВВЕДЕНИЕ

Основным этиологическим агентом тяжелого, требующего госпитализации, гастроэнтерита у младенцев и детей младшего возраста, в развивающихся странах нередко приводящего к летальной дегидратации, являются ротавирусы группы А (РВ-А, сем. Reoviridae, п/сем. Sedoreovirinae, род Rotavirus). Значимость РВ-А в инфекционной кишечной патологии и наносимый экономический ущерб определили необходимость разработки ротавирусных вакцин. В настоящее время в мире разработаны пять живых вакцин, предназначенных для перорального применения. Две из них представлены на мировом рынке — RotaTeq (RV5 — пентавалентная вакцина, включающая реассортанты бычьего ротавируса и ротавируса человека со специфичностью G1, G2, G3, G4, P1[8], Merck Sharp & Dohme corp., США) и Rotarix (RV1 — моновалентная вакцина на основе штамма ротавируса человека G1P[8], GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Бельгия). Три лицензированы регионально — Rotavac (RV9 — моновалентная вакцина на основе штамма 116E, природного реассортанта ротавируса человека и бычьего ротавируса, генотип G9P[11], Bharat Biotech International Limited, Индия), Rotavin-M1 (G1P[8], POLYVAC, Вьетнам) и производимая в Китае вакцина, содержащая реассортанты бараньего ротавируса и ротавируса человека (G10P[12]+G1, G2, G3, G4, Lanzhou Biologicals/Xinkexian Biological Technology) [12, 14].

В апреле 2009 года ВОЗ предоставила рекомендации для глобального внедрения вакцин в национальные программы иммунизации в развивающихся странах по всему миру. Было начато их применение в ряде стран Латинской Америки, Австралии, Азии, Африки и Европы. На декабрь 2016 года вакцинация против ротавирусной инфекции (РВИ) включена в национальные календари прививок в 87 странах [19]. Широкое внедрение вакцинации против РВИ в разных странах не только привело к снижению бремени инфекции, но и определило необходимость изучения типовой структуры ротавирусных популяций до и после введения вакцинации [16, 17].

Россия характеризуется как территория с умеренной активностью циркуляции РВ-А. Показатели заболеваемости РВИ в последние годы колеблются пределах 65,0 — 86,7 на 100 тысяч совокупного населения. Болеют в основном дети в возрасте 1 — 2 года. При этом существуют регионы с необычайно высоким уровнем заболеваемости, связанной с госпитализацией детей в возрасте до 12 месяцев [5].

В октябре 2012 года в нашей стране зарегистрирована вакцина RotaTeq, и в 2014 году вакцинация против ротавирусной инфекции по эпидемическим показаниям введена в национальный календарь прививок [11]. В ряде субъектов РФ, являющихся территориями риска по РВИ, вакцинация детей первого года жизни против ротавирусной инфекции включена в региональный календарь прививок и реализуется в рамках пилотных проектов [10].

Для решения вопроса о целесообразности широкого внедрения вакцинопрофилактики требуется детальное изучение территориальных эпидемиологических особенностей инфекции и установление типовой структуры популяции ротавирусов в довакцинальный период. В Нижнем Новгороде в 2014 — 2016 гг. вакцинированы 294 ребенка, и охват вакцинацией будет расширяться. В связи с этим, назрела необходимость установления базовых парамет-

ров проявлений эпидемического процесса РВИ и анализа типовой структуры нижегородской популяции ротавирусов на современном этапе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ многолетних данных заболеваемости острой кишечной инфекцией (ОКИ) и ротавирусной инфекцией проводили на основе данных формы № 2 Федерального статистического наблюдения «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за период с 2005 по 2016 гг. в Нижнем Новгороде и РФ.

Сезонность РВИ оценивали по датам начала заболевания госпитализированных в Нижнем Новгороде детей с использованием относительного показателя (% от общего количества положительных проб).

Материалом для изучения типовой структуры нижегородской популяции ротавируса служили образцы фекалий 7190 детей в возрасте до 17 лет, госпитализированных с ОКИ в инфекционный стационар города Нижнего Новгорода в изучаемый период времени. Обнаружение РНК ротавируса проводили методами электрофореза в ПААГ и ОТ-ПЦР, как описано ранее [3, 4].

Все образцы фекалий, содержащие РНК ротавируса, использовали для определения G- и [P]-типа методом мультиплексной ПЦР с помощью набора типоспецифических праймеров для идентификации генотипов G1-G4, G9 и P[4], P[6], P[9], предложенных ранее [3, 4, 8]. Праймеры синтезировали в ООО «Синтол» (Москва). Устанавливали первичную структуру фрагментов кДНК генов VP7 и VP4 в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора Beckman Coulter SEQ8000 и набора реагентов DTCS Quick Start Kit («Beckman Coulter», США), согласно рекомендациям производителя.

Нуклеотидные последовательности фрагментов кДНК анализировали с использованием веб-инструмента для генотипирования ротавирусов A RotaC [<http://rotac.regatools.be/>] и интернет-ресурса BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>] для идентификации близкородственных штаммов ротавирусов человека. Выборки нуклеотидных последовательностей анализировали с помощью программ BEAUti 1.8.2 и BEAST 1.8.2 [15]. На основе полученных наборов данных в программе TreeAnnotator 1.8.2 строили филогенетическое дерево и визуализировали его в программе FigTree 1.4.2. Идентификационные номера GenBank штаммов показаны на филогенетическом дереве. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ

На территории Нижнего Новгорода ежегодно регистрируется до 4 — 5 тысяч случаев острых кишечных инфекций, где доля ОКИ установленной этиологии (ОКИ+) составляет в среднем 25,0% (23,0 — 31,0% в разные годы). В структуре ОКИ+ основное место занимает ротавирусная инфекция, доля которой по многолетним данным колеблется в пределах 62,5 — 72,9% (в среднем 67,0%).

По среднемноголетним данным (2005 — 2016 гг.) показатель регистрируемой заболеваемости РВИ в Нижнем Новгороде составил $57,0 \pm 3,5$ на 100 тыс. населения. Анализ динамики данных показал, что с 2005 г. на территории Нижнего Новгорода наблюдается выраженная тенденция роста заболеваемости РВИ ($R^2=0,8561$). За анализируемый период времени показатель заболеваемости совокупного населения вырос в 16,0 раз. Многолетняя динамика заболеваемости отражает таковую в целом по России.

В динамике заболеваемости РВИ можно выделить три периода: 2005 — 2009 гг. — период роста заболеваемости, 2009 — 2014 гг. — период стабилизации заболеваемости на уровне 57,8 — 75,9 (72,7±3,5) на 100 тыс. населения, 2015 — 2016 гг. — период наметившегося роста заболеваемости РВИ (Тпр.=+17,6). В 2016 г. частота обнаружения РВ-А у детей, госпитализированных с ОКИ, составила 29,0%, а показатель достиг значения 86,5 на 100 тыс. населения, что соотносится с общероссийским показателем (83,3) и свидетельствует о среднем уровне заболеваемости РВИ в Нижнем Новгороде.

По среднемноголетним данным в Нижнем Новгороде в изучаемый период времени РВИ болело население всех возрастных групп, среди которого на долю детей в возрасте до 14 лет пришлось 98,5%. Среднемноголетний показатель заболеваемости детей (537,3±18,4) превысил показатель заболеваемости взрослого населения более, чем в 50 раз. Распределение заболевших по возрастным группам было следующим: до 1 года — 20%, 1 — 2 года — 51%, 3 — 6 лет — 23 %, 7 — 14 лет — 4%, старше 15 лет — 2%. Активность эпидемического процесса РВИ на территории Нижнего Новгорода, как и на других территориях страны, поддерживалась неорганизованными детьми в возрасте до двух лет. Среднемноголетний показатель заболеваемости детей до года составил 1404,3±87,2, в группе 1 — 2 года — 1853,7±73,4 на 100 тыс. детей данных возрастных групп.

Динамика заболеваемости РВИ в этих возрастных группах до 2016 года отражала общую тенденцию роста показателя по совокупному населению. Однако в 2016 году было зарегистрировано статистически значимое снижение числа заболевших детей в возрасте до 1 года ($p=0,009$) и 1 — 2 года ($p=0,008$). В это время крайне неблагоприятная ситуация по заболеваемости РВИ сложилась в возрастных группах 3 — 6 лет (при этом увеличение было связано в определяющей мере с организованными детьми) и 7 — 14 лет, где число заболевших детей статистически значимо увеличилось ($p=0,005$; $p=0,008$), а показатель заболеваемости вырос в 1,2 и 1,8 раза соответственно. Также, более чем в 3 раза, в 2015 и 2016 гг. увеличилось число заболевших взрослых.

Анализ типовой для Нижнего Новгорода помесечной динамики заболеваемости РВИ совокупного населения за период 2005 — 2015 гг. показал наличие сезонных проявлений РВИ, характерных для северных широт с умеренным климатом. Случаи инфекции регистрировались круглогодично, с наименьшими значениями в августе. Число случаев заболеваний, превышающее верхний предел круглогодичной заболеваемости, регистрировалось с января по май, месяцами максимальной заболеваемости были март и апрель. Активизация эпидемического процесса РВИ в холодные месяцы была характерной для всех возрастных групп населения.

По сравнению с предыдущим периодом сезон 2015 — 2016 гг. имел свои особенности — начало подъема заболеваемости и пиковые месяцы различались в разных возрастных группах детей. Начало сезонного подъема заболеваемости РВИ пришлось на декабрь и было связано с организованными детьми 3 — 6 лет. В январе к ним присоединились дети в возрасте 1 — 2 года, а затем, приблизительно через 2 недели, дети первого года жизни. Сезонные максимумы заболеваемости РВИ в этих возрастных группах также пришлось на апрель. Помесечное распределение случаев РВИ в возрастной группе детей 7 — 14 лет имело два пика. Первый пик пришелся на январь, в феврале число случаев госпитализации с РВИ упало, но резко возросло в марте. Подобная динамика наблюдалась и в возрастной группе детей 3 — 6 лет, что по, всей вероятности, может быть связано с разобщением организованных детей в период зимних

каникул. Максимум регистрации РВИ среди школьников пришелся на апрель и май.

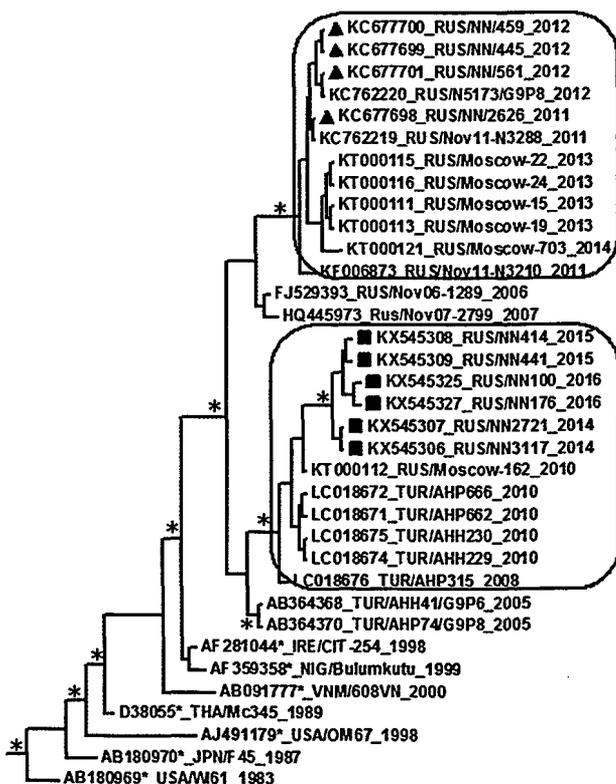
Ранее нами было показано, что в период 1997 — 2005 гг. на территории Нижнего Новгорода на фоне циркуляции РВ-А восьми типов доминировал G1P[8] (77,0%) [9]. В 2005 — 2012 гг. популяция ротавируса также была представлена 8 типами вируса, но уже с доминированием G4P[8] (64,5%) [4]. Анализ типового состава нижегородской популяции ротавируса в 2012 — 2016 гг. показал циркуляцию РВ-А десяти генотипов: G4P[8] — 47,4%; G9P[8] — 26,0%; G1P[8] — 15,5%; G2P[4] — 4,8%; GxP[8] — 4,5%; G3P[9] — 1,8%; G1P[9], G4P[9], G6P[9], G9P[9] — в сумме 1,8%. При этом следует отметить, что до 2015 года доля G4P[8] в популяции составляла 57,0%. В сезон 2015 — 2016 гг. доминирующим стал генотип G9P[8] (44,4%), доля G4P[8] снизилась до 27,9%, на третьем месте находился G1P[8] — 14,3%, G2P[4] — 3,5%, другие генотипы составили 9,9%, G3P[8] не обнаружен.

Первые случаи РВИ, вызванной ротавирусом генотипа G9P[8] на территории Нижнего Новгорода, были зафиксированы весной 2011 года. В сезон 2011 — 2012 гг. доля генотипа G9P[8] в популяции ротавируса составила 30,0% [3]. В сезон 2013 — 2014 гг. этот вариант вируса обнаруживался в единичных случаях, но в 2014 — 2015 гг. РВ G9P[8] вновь стали выявляться чаще, достигнув в начале сезона 2016 — 2017 гг. 70% в долевом распределении генотипов.

Филогенетический анализ, проведенный на основе гена VP7, показал, что штаммы генотипа G9P[8], выявленные в Нижнем Новгороде в 2011 — 2012 гг., группировались внутри сублинии G9-III_d с европейскими и другими российскими РВ-А (Москва, 2013 г.; Новосибирск, 2011 — 2012 гг.). Варианты РВ-А G9P[8], активно циркулировавшие в 2014 — 2016 гг., образовали отдельный кластер в пределах данной линии с ротавирусами, циркулировавшими в 2008 — 2010 гг. в Турции (рис.).

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе проведено изучение проявлений эпидемического процесса РВИ в период 2005 — 2016 гг. на территории Нижнего Новгорода в сопоставлении с данными об изменениях в типовой структуре популяции ротавируса. Показано,



Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена VP7 штаммов ротавируса генотипа G9P[8].

* Группы с апостериорной вероятностью узла выше 0,95, NN — Нижний Новгород; названия стран указаны по трехбуквенному коду ISO-3166-1.

что доля РВ-А в структуре ОКИ установленной этиологии колебалась в пределах 62,5 — 72,9% (в среднем 67%). По данному показателю наблюдается существенный разброс на разных территориях РФ. Так, в Москве доля РВИ в структуре ОКИ+ колебалась в разные годы от 53,2 до 82,6% (2004 — 2014 гг.) [13], в Оренбургской области достигала 44% и имела тенденцию к росту (2007 — 2011 гг.) [2], в Ачинске Красноярского края в 2015 г. составила 88% [6].

Следует отметить, что на фоне неравномерного распределения заболеваемости РВИ по территориям РФ во многих субъектах в последние годы также наблюдается рост числа зарегистрированных случаев РВИ [1]. Существует мнение, что рост заболеваемости связан с улучшением качества диагностики [18]. Очевидно, что пристальное внимание к инфекции, разработка нормативно-методических документов и внедрение в практику современных высокочувствительных и стандартизированных диагностических тест-систем внесли свой вклад в увеличение регистрируемых показателей заболеваемости РВИ на первых этапах совершенствования эпидемиологического надзора за инфекцией, в том числе и на территории Нижнего Новгорода (период 2005 — 2009 гг.). Затем, после периода стабилизации (2010 — 2014 гг.) заболеваемости на среднероссийском уровне вновь наметился ее рост. Поскольку в последние годы в Нижнем Новгороде не произошло каких-либо существенных изменений в качестве лабораторной диагностики, мы предположили, что одной из возможных причин роста заболеваемости РВИ является типовая перестройка в популяции возбудителя.

В период 2015 — 2016 гг. в нижегородской популяции произошло перераспределение типов РВ-А — доминирующее положение заняли штаммы генотипа G9P[8], второе и третье место соответственно пришлось на G4P[8] и G1P[8]. Доминирующий вариант РВ-А G9P[8] проявил генетическое родство со штаммами из Турции и филогенетически отличался от общеевропейского варианта сезона 2011 — 2012 гг.

Смена доминирующего типа ротавируса на территории Нижнего Новгорода сопровождалась ростом заболеваемости РВИ организованных детей, посещающих дошкольные учреждения и школу, и взрослого населения, а также увеличением продолжительности периода сезонного подъема заболеваемости. Антиген VP7-G9 является новым для Нижнего Новгорода, и население не имеет к нему иммунитета. Это позволило вирусу распространяться не только среди детей первых лет жизни, но и среди неиммунных старших детей и взрослых, что и привело к росту заболеваемости РВИ в 2015 — 2016 гг. Можно предположить, что активность циркуляции ротавируса G9P[8] на территории Нижнего Новгорода и других территориях РФ будет сохраняться.

В России ротавирус генотипа G9P[8] в период 2011 — 2013 гг. был выявлен в восьми городах России, общая доля за два сезона составила 4,9 % [18]. В апреле—мае 2013 года доля G9P[8] среди ротавирусов, выявленных у госпитализированных детей в Москве, повысилась до 30% [7]. Идентификация на конкретных территориях РФ РВ-А G9P[8] типа имеет научно-практическое значение в плане оценки эффективности применения лицензированной на территории России вакцины, в составе которой отсутствует антиген G9.

Таким образом, при анализе проявлений эпидемического процесса РВИ в Нижнем Новгороде (2005 — 2016 гг.) в условиях отсутствия вакцинного давления показано три периода его развития, один из которых (предвакцинальный, 2015 — 2016 гг.) характеризовался ростом заболеваемости и изменениями в возрастных и сезонных проявлениях инфекции, которые проходили в условиях смены доминирующего генотипа РВ-А (G4P[8] на G9P[8]).

ЛИТЕРАТУРА

1. Брико Н.И., Миндлина А.Я., Полибин Р.В. Универсальность изменений в проявлениях эпидемического процесса антропонозных инфекций за последние десятилетия. Журн. микробиол. 2015, 5: 17-21.
2. Денисюк Н.Б., Каган Ю.Д. Ротавирусные гастроэнтериты у детей города Оренбурга на этапе подъема заболеваемости. Медицинский альманах. 2012, 3 (22): 64-66.
3. Епифанова Н.В., Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А. Характеристика ротавируса генотипа G9, выявленного в Нижнем Новгороде в 2011-2012 годах. Медицинский алфавит. Эпидемиология и гигиена. 2013, 4: 23-26.
4. Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А., Морозова О.В., Фомина С.Г., Луковникова Л.Б., Кашников А.Ю. Спектр генотипов ротавирусов, циркулировавших на территории Нижнего Новгорода в 2005-2012 годы. Доминирование генотипа G4P[8]. Медицинский альманах. 2014, 2 (32): 52-57.
5. Лялина Л.В., Данилова М.А., Глушкевич В.А., Федулова А.Г., Афанасьева А.Н. Заболеваемость ротавирусной инфекцией в различных регионах Российской Федерации в довакцинальный период. Якутский медицинский журнал. 2015, 4: 57-60.
6. Мартынова Г.П., Южакова А.Г., Соловьева И.А., Третьяков А.П. Ротавирусная инфекция у детей в Красноярском крае: первые шаги к снижению заболеваемости. Фарматека. 2016, 11 (324): 45-50.
7. Мескина Е.Р., Ушакова А.Ю., Файзулоев Е.Б., Бахтояров Г.Н., Киселева В.В. Сравнительная характеристика гастроэнтерита, вызванного ротавирусами генотипов G4P[8] и G9P[8] у детей, госпитализированных в стационар г. Москвы (эпидсезон 2012-2013 гг.). Инфекционные болезни. 2017, 15 (1): 23-28.
8. Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Федорова О.Ф. G[P] генотипирование ротавирусов с использованием полимеразной цепной реакции. Методические рекомендации. Утверждены Роспотребнадзором, № 0100/44446-07-34. Нижний Новгород, 2007.
9. Новикова Н.А., Федорова О.Ф., Епифанова Н.В., Чупрова А.Б. G[P]-типы ротавируса группы А и их распространение в Нижнем Новгороде и Дзержинске в 1997-2005 гг. Вопросы вирусологии. 2007, 3: 19-23.
10. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 году: Государственный доклад. М., Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2016.
11. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2014 г. № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям». Система ГАРАНТ. URL: <http://base.garant.ru/70647158/#ixzz4CsLKcLWp> (дата обращения 07.04.2017).
12. Ротавирусные вакцины. Документ по позиции ВОЗ — январь 2013 года. Еженедельный эпидемиологический бюллетень № 5, 2013, 88: 49-64. URL: http://www.portal.pmnch.org/immunization/documents/WHO_PP_Rotavirus_2013_RU.pdf (дата обращения 07.04.2017).
13. Филатов Н.Н., Линок А.В., Файзулоев Е.Б. Некоторые особенности проявлений эпидемического процесса при острых кишечных инфекциях в Москве. Журн. микробиол. 2016, 1: 17-21.
14. Bhandari N., Sharma P., Taneja S. et al. Rotavirus Vaccine Development Group. A dose-escalation safety and immunogenicity study of live attenuated oral rotavirus vaccine 116E in infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J. Infect. Dis. 2009, 200 (3): 421-429.
15. Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol. Biol. Evol. 2012, 29 (8): 1969-1973.
16. Kirkwood C.D., Roczo-Farkas S. Australian Rotavirus Surveillance Group. Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2014. Commun. Dis. Intell. Q Rep. 2015, 39 (3): E337-346.
17. Patton J.T. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. Discov Med. 2012, 13 (68): 85-97.
18. Veselova O. A., Podkolzin A.T., Petukhov D. N., Kuleshov K.V., Shipulin G. A. Rotavirus Group A Surveillance and Genotype Distribution in Russian Federation in Seasons 2012-2013. Int. J. Clin. Med. 2014, 7: 407-413.
19. WHO/IVB Database. URL: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/data/en/ (дата обращения 07.04.2017).

Поступила 25.04.17

Контактная информация: Новикова Надежда Алексеевна, д.б.н., проф., 603950, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71, р.т. (831)469-79-12

А.В.Алешкин¹, О.Ю.Борисова^{1,2}, Н.Т.Гадуа¹, С.С.Бочкарева¹, В.А.Чернова³,
И.П.Требунских⁴, Б.А.Ефимов², Л.И.Кафарская², С.С.Афанасьев¹,
В.А.Алешкин¹, М.С.Афанасьев⁵, А.Б.Борисова^{1,2}, А.В.Караулов⁵

МИКРОБИОЦЕНОЗ КОЖИ У БОЛЬНЫХ БРОМГИДРОЗОМ

¹Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского, ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, ³Национальный медико-хирургический центр «Детский консультативно-диагностический центр им. Н.И.Пирогова», ⁴Центр гигиены и эпидемиологии в Москве, ⁵Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Цель. Оценка состава микроорганизмов, входящих в микробиоценоз кожи подмышечных впадин, у больных бромгидрозом. *Материалы и методы.* Обследованы 23 пациента (11 — 17 лет), находящиеся под наблюдением в ДКДЦ им. Н.И. Пирогова «Национальный медико-хирургический центр». Идентификацию осуществляли с помощью биохимических тест-систем BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», Франция) и секвенирования гена 16SrRNA с последующим сопоставлением с EMBL/NCBI. *Результаты.* У большинства пациентов с бромгидрозом (52,2% и 43,5%) была средняя и высокая степень обсемененности микробиоты кожи. Идентифицировано 137 штаммов, относящихся к 5 родам микроорганизмов — *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Candida* и *Bacillus* spp. В микробиоценозах преобладали (89,1%) штаммы рода *Corynebacterium* (8 видов) и рода *Staphylococcus* (5 видов). Среди *Corynebacterium* доминировали штаммы *C.tuberculoostearicum*, а среди *Staphylococcus* — *S.hominis*. *Заключение.* В большинстве случаев (82,6%) у больных микробиоценоз кожи подмышечных впадин представлен консорциумами из микроорганизмов с преобладанием микроорганизмов *Corynebacterium* и *Staphylococcus*.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 53—58

Ключевые слова: микробиота кожи, бромгидроз, обсемененность микроорганизмами, подмышечные впадины

А.В.Алешкин¹, О.Ю.Борисова^{1,2}, Н.Т.Гадуа¹, С.С.Бочкарева¹, В.А.Чернова³,
И.П.Требунских⁴, Б.А.Ефимов², Л.И.Кафарская², С.С.Афанасьев¹,
В.А.Алешкин¹, М.С.Афанасьев⁵, А.Б.Борисова^{1,2}, А.В.Караулов⁵

MICROBIOCENOSIS OF SKIN IN BROMHIDROSIS PATIENTS

¹Gabrichesky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pirogov Russian National Research Medical University, ³National Medical Surgery Centre «Pirogov Children Consultant Diagnostic Centre», ⁴Centre of Hygiene and Epidemiology in Moscow, ⁵Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. Evaluate the composition of microorganisms of skin microbiocenosis of axilla in bromhidrosis patients. *Materials and methods.* 23 patients were examined (11 — 17 years) under the observation at Pirogov CCDC of the National Medical-Surgery Centre. Identification was carried out using biochemical test-systems BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», France) and 16SrRNA gene sequencing with consequent juxtaposition with EMBL/NCBI. Medium and high degree of skin seeding with microbiota was present in most of the patients with bromhidrosis (52.2 and 43.5%). 137 strains belonging to 5 genera of microorganisms were identified — *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Candida* and *Bacillus* spp. *Corynebacterium* genus strains (8 species) and *Staphylococcus* genus (5 species) prevailed in microbiocenosis (89.1%). *C. tuberculoostearicum* strains dominated among *Corynebacterium*, and *S. hominis* — *Staphylococcus*. *Conclusion.* In most of the cases (82.6%) in patients microbiocenosis of skin of axilla was presented by consortiums of microorganisms with prevalence of *Corynebacterium* and *Staphylococcus* microorganisms.

Key words: skin microbiota, bromhidrosis, microorganism seeding, axilla

ВВЕДЕНИЕ

Потовые железы является особым видом желез, специализирующихся на выработке и выделении необходимого количества пота, защита кожи, поддержка водного и солевого баланса. Потовые железы выглядят как трубчатые железы со свернутыми в клубочки концами и состоят из конечной части и протока, который выводит пот на наружный слой кожи. Различают два вида желез: эккриновые и апокриновые, различающиеся по функциональности и строению, последние из которых находятся в подмышечных впадинах.

Запах пота является важным компонентом индивидуального запаха тела. Различают нейтрально пахнущий пот (номидроз), запах которого едва ощутим, пот с резким запахом — осмидроз и зловонный пот — бромгидроз. Часто у людей с незначительным и умеренным потоотделением возникает проблема особенно неприятного запаха (бромгидроз) в подмышечных областях.

Микробиоценоз кожи подмышечных впадин является уникальным, так как сочетает в себе наличие микробного сообщества в нише, характеризующейся определенными физиологическими свойствами — определенный температурный режим, влажность, наличие волосяных фолликулов, сальных желез, экринов, апокринов, солей, белков, стеринов, сложных эфиров стерина, сложных эфиров воска, различных липидов, жирных кислот и т.д. [4, 5, 8 — 10]. Запах возникает, когда микроорганизмы, живущие на поверхности кожи, расщепляют пот на плохо пахнущие кислоты.

В связи с этим, целью исследования является оценка состава культивируемых микроорганизмов, входящих в микробиоценоз кожи подмышечных впадин, у больных бромгидрозом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 23 пациента с диагнозом «бромгидроз», находящихся под наблюдением в Детском консультативно-диагностическом центре им. Н.И.Пирогова «Национальный медико-хирургический центр». Из них 5 девочек и 18 мальчиков в возрасте 11 — 17 лет.

Взятие материала с кожи подмышечных впадин осуществляли с помощью стерильных одноразовых сухих коммерческих тампонов («Сорап», Италия) и доставляли в течение 2 часов, соблюдая температурный режим. Для стандартизации количественной оценки роста микроорганизмов клинический материал с тампона засеивали по Голду тампоном на 0,5 чашки с 20% агаром с кровью крупного рогатого скота («Лейтран», Москва), в качестве агаровой основы использовали ГРМ-агар (ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посев осуществляли плотными непрерывными штрихами (сектор А) и рассевом калибровочной петлей 10 мкл на сектора I, II и III. Оценку микробного роста проводили в зависимости от количества выросших колоний в перерасчете в КОЕ/мл. Для оценки качественного состава микробиоты кожи подмышечных впадин клинический материал также засеивали на несколько питательных сред: кровяно-теллуриновый агар (на основе ГРМ-агара, ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10% крови крупного рогатого скота («Лейтран», Москва), желточно-солевой агар (на основе солевого агара) и агар Сабура («HiMedia», Индия), среду Эндо и энтерококкагар (ГНЦ ПМБ, Оболенск). Все посевы

также культивировали по стандартной методике при температуре 37°C в течении 24 — 48 часов.

Идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Биохимическую идентификацию выделенных микроорганизмов осуществляли с помощью коммерческих биохимических тест-систем Стафитест-24 («PLIVA-Lachema Diagnostica», Чехия), для дрожжевых грибов — Candida-тест («PLIVA-Lachema Diagnostica», Чехия), Pastorexтmstrep — сенсibilизированный латекс для дифференциации Streptococcus групп А, В, С, D, F, G («Bio-Rad»), оптохиновый тест, тест с желчью, определение каталазной и гемолитической активности. Также для видовой идентификации микроорганизмов использовали масс-спектрометрический метод с помощью времяпролетного масс-спектрометра BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», Франция) и секвенирование гена 16SrRNA, согласно [1, 4, 7 — 9].

Хромосомальную ДНК выделяли методом кипячения согласно (Маниатис Т., 1984 г.) из 24-часовой культуры микроорганизмов, выращенной на кровяном агаре. Далее одну микробиологическую петлю культуры суспендировали в 150 мкл деионизированной воды и инкубировали 20 минут при 95°C, после чего центрифугировали при 12 000 об/мин. Выявление фрагментов гена 16SrRNA осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции в соответствии с [8, 9]. Амплификацию фрагментов нуклеотидных последовательностей проводили в термоциклере «С-1000 Touch» (Bio-Rad, США). Детекцию результатов амплификации осуществляли путем постановки горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле при 160 V в течение 40 мин с последующим сравнением электрофоретической подвижности специфических светящихся фрагментов амплифицированных продуктов с подвижностью фрагментов маркера молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва). Секвенирование фрагментов ДНК выделенных штаммов осуществляли согласно общепринятому методу Сенджера в компании «Евроген» (Москва). Результаты секвенирования обрабатывались с помощью программного обеспечения BLAST и ChromasLite (для формата хроматограммы), секвенированные последовательности сопоставляли с международной on-line базой данных EMBL/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основе эмпирических исследований была проведена полуколичественная оценка микробного роста в зависимости от количества выросших колоний при прямом посеве биоматериала, в перерасчете в КОЕ/мл/г. Полуколичественная оценка микробного роста показала, что в большинстве случаев у пациентов с бромгидрозом (12, 52,2%) и (10, 43,5%) была средняя и высокая степень обсемененности микробиоты кожи подмышечных впадин, и только у одного пациента (4,3%) — низкая степень обсемененности (4 lg КОЕ/мл). Причем более выраженная обсемененность кожи была у мальчиков, по сравнению с девочками.

Нами впервые с помощью масс-спектрометрического метода и секвенирования гена 16SrRNA охарактеризован микробиоценоз кожи подмышечных впадин у больных с бромгидрозом. При культуральной диагностике в аэробных условиях обнаружен рост широкого спектра факультативно-анаэробных микроорганизмов, выделено и идентифицировано 137 штаммов, относящихся к 5 родам микроорганизмов. Из них большинство 68 (49,6%) штаммов принадлежали к роду Corynebacterium, 54 (39,5%) штамма — к роду Staphylococcus, 7

(5,2%) штаммов — к роду *Moraxella*, 5 (3,6%) штаммов — к роду *Micrococcus* и в единичном количестве выделены *Candida* и микроорганизмы рода *Bacillus* spp. (1, 0,7%) и 2, 1,4%) штамма соответственно). Следовательно, в микробиоценозе кожи подмышечных впадин у больных с бромгидрозом преобладают грамположительные микроорганизмы.

На следующем этапе нами проведена видовая идентификация выделенных микроорганизмов. В данном микробиоценозе наиболее многочисленной и разнообразной по составу была группа микроорганизмов рода *Corynebacterium*. Идентифицировано 68 штаммов, относящихся к 8 видам микроорганизмов этого рода. Состав выделенных коринебактерий распределился следующим образом: *C. tuberculostearicum* — 30 (44,1%) штаммов, *C. afermentas* subsp. *lipophilum* — 10 (14,7%) штаммов, *C. ureicelerivorans* — 9 (13,2%) штаммов, *C. mucifaciens* — 8 (11,8%) штаммов, *C. afermentas* subsp. *afermentas* — 7 (10,3%) штаммов, *C. coyleae* — 2 (2,9%) штамма, *C. afermentas* — 1 (1,5%) штамм и *C. massiliensis* — 1 (1,5%) штамм. Следовательно, в микробиоценозе кожи подмышечных впадин у больных с бромгидрозом наиболее многочисленной и разнообразной оказалась группа коринеформных микроорганизмов, среди которых преобладали штаммы *C. tuberculostearicum*.

Второй по распространенности в этом микробиоценозе была группа микроорганизмов рода *Staphylococcus*. Нами идентифицировано 46 штаммов, относящихся к 5 видам микроорганизмов: *S. hominis* — 39 (72,2%) штаммов, *Staphylococcus epidermidis* — 8 (14,8%) штаммов, *S. aureus* — 5 (9,2%) штаммов, *S. haemolyticus* — 1 (1,9%) штамм и *S. capitis* — 1 (1,9%) штамм. Следовательно, среди выделенных стафилококков у больных с бромгидрозом в микробиоценозе кожи подмышечных впадин преобладали штаммы *Staphylococcus hominis*.

Среди минорных групп выделенных микроорганизмов обнаружено 7 (5,1%) штаммов *Moraxella* spp., 5 (3,6%) штаммов *Micrococcus luteus*, 1 (0,7%) штамм *Candida albicans* и 2 (1,4%) штамма, которые по данным секвенирования 16SrRNA, относились к роду *Bacillus* spp.

Анализ высеваемости микроорганизмов в пробах с разными титрами микробной обсемененности показал, что в пробе с низкой микробной обсемененностью (4 lg КОЕ/мл) было идентифицировано 8 штаммов микроорганизмов 6 видов, в пробах со средней микробной обсемененностью (5 — 6 lg КОЕ/мл) — 62 штамма, принадлежащих к 13 видам, и в пробах со высокой микробной обсемененностью (7 — 8 lg КОЕ/мл) — 67 штаммов 11 видов.

При низкой микробной обсемененности были идентифицированы *C. ureicelerivorans*, *C. afermentas* subsp. *lipophilum*, *C. afermentas*, *C. tuberculostearicum*, *S. hominis* и *S. epidermidis*; при средней степени обсемененности — *C. ureicelerivorans*, *C. afermentas* subsp. *lipophilum*, *C. tuberculostearicum*, *C. mucifaciens*, *C. coyleae*, *C. massiliensis*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. capitis*, *Moraxella* spp., *M. luteus*, *Bacillus* spp.; при высокой степени обсемененности — *C. ureicelerivorans*, *C. afermentas* subsp. *lipophilum*, *C. tuberculostearicum*, *C. mucifaciens*, *C. afermentas* subsp. *afermentas*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *Moraxella* spp., *M. luteus*, *Candida albicans*. Интересным оказалось то, что с увеличением степени микробной обсемененности у больных с бромгидрозом в микробиоценозе увеличиваются титр штаммов *C. afermentas* subsp. *lipophilum*, *C. tuberculostearicum* и *S. hominis*. Следовательно, с увеличением обсемененности увеличивается титр и спектр видового разнообразия выделенных микроорганизмов, а также появляются микроорганизмы, обладающие более выраженной липофильностью.

Анализ микробного состава показал, что у в большинстве случаев (82,6%) у больных микробиоценоз кожи подмышечных впадин представлен консорциумами из микроорганизмов, состоящими из 2 — 7 микроорганизмов, и в четырех (17,4%) случаях — монокультурой. В монокультуре во всех случаях выделялись штаммы *S.hominis*. Кроме того, в большинстве (52,2%) случаев встречались ассоциации из 5 и 6 микроорганизмов, далее встречались ассоциации из 4 микроорганизмов (17,4%) и в одинаковом проценте случаев ассоциации из 2, 3 и 7 микроорганизмов. По составу изученных ассоциаций оказалось, что в ассоциациях, состоящих из 4, 5, 6 микроорганизмов, преобладали штаммы *C.tuberculostearicum* и *S.hominis*, в то время как в ассоциациях, включающих 7 микроорганизмов, отмечалось более выраженное видовое разнообразие выделенных микроорганизмов, но с равномерной частотой выделения.

На теле человека насчитывается примерно 3 — 4 миллиона потовых желез двух типов. Экринные — распределяются по всей поверхности тела равномерно и функционируют с раннего детства, обеспечивают терморегуляцию, за счет выделения пота и его испарения с поверхности кожи. Апокринные — в основном располагаются в подмышках, в паху и на половых органах. Эти железы развиваются в период полового созревания и выделяют феромоны — химические вещества, имеющие запах. Обычно пот, выделяемый эккринными железами, не имеет запаха. Неприятный запах тела может появиться, если большое количество пота долгое время находится на коже, где его начинают расщеплять бактерии. Пот эккринных желез также приобретает неприятный запах, если человек употребляет определенные продукты и напитки, например, чеснок, специи и алкоголь, а также некоторые лекарства, например, антидепрессанты. Однако чаще всего виновниками неприятного запаха являются апокринные железы, так как выделяемый ими пот богат белком, который легко расщепляется бактериями.

Бромгидроз обычно появляется в период полового созревания из-за усиленного производства гормонов андрогенов. Эти гормоны активизируются только в период пубертации. Вот почему маленькие дети практически не пахнут, как бы сильно они ни вспотели. В момент полового созревания начинают активно работать апокринные железы, которые в составе своего секрета содержат вещество индоксил — индивидуальный запаховый маркер. Как и секрет сальных желез, тоже активных в этом возрасте, индоксил служит легкой добычей бактерий, присутствующих в верхнем роговом слое кожи. Если человек редко моется и меняет белье, то происходит бурный процесс окисления жирных кислот, биологических веществ пота и разложения их бактериями. В сочетании с гипергидрозом (или просто непрерывным ношением тех же кроссовок, синтетических носков, маек, рубашек) плохой уход за кожей чреват бромгидрозом. Бромгидроз, встречающийся чаще у молодых мужчин, связан с присутствием в составе их пота некоторых аминокислот (тирозин, лейцин) и жирных кислот, которые после переработки их кожными бактериями вызывают особенно неприятный запах. У молодых девушек изменение запаха пота может быть связано с нарушением менструального цикла. Также бромгидроз характерен для больных с хроническими заболеваниями почек (уремия, хронический нефрит и др.), сопровождающимися хронической почечной недостаточностью, подагрой, сахарным диабетом.

В связи с этим, нами проведено обследование подростков, которые наиболее подвержены развитию бромгидроза, и изучен микробиоценоз кожи подмышечных впадин у данной возрастной группы. Всего идентифицировано

137 штаммов, относящихся к 17 видам микроорганизмов. Полуколичественная оценка микробного роста показала, что в большинстве случаев у пациентов с бромгидрозом отмечалась средняя и высокая степень обсемененности микробиоты кожи подмышечных впадин, которая была более выраженная у мальчиков, по сравнению с девочками. В микробиоценозах преобладали штаммы рода *Corynebacterium* и рода *Staphylococcus*, которые составили 89,1% всей популяции выделенных микроорганизмов. Среди микроорганизмов рода *Corynebacterium* идентифицировано 68 штаммов 8 видов, среди которых доминирующими были штаммы липофильных коринебактерий — *C.tuberculoostearicum*, *C.affermentis* subsp. *lipophilum* и *C.ureicelerivorans*. Интересным является факт, что с усилением выраженности патологического состояния уменьшается видовое разнообразие выделенных коринебактерий — идентифицировано всего 7,9% видов коринебактерий из 101 опубликованного в настоящее время вида микроорганизмов рода *Corynebacterium* [1 — 3, 5, 8]. Среди стафилококков идентифицировано 5 видов с доминированием штаммов *S.hominis*. Было установлено, что с увеличением микробной обсемененности этого биотопа отмечается увеличение титра и разнообразия выделенных микроорганизмов. Кроме того, показано, что в большинстве случаев (82,6%) у больных микробиоценоз кожи подмышечных впадин представлен консорциумами из микроорганизмов, среди которых преобладали штаммы *C.tuberculoostearicum* и *S.hominis*, и в четырех (17,4%) случаях — монокультурой в виде *S.hominis*. Поэтому можно предположить, что появление неприятного запаха обусловлено колонизацией данного биотопа консорциумами микроорганизмов, в которых преобладают бактерии, обладающие повышенными липофильными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alatoon A., Cazanave C.J., Cunningham S.C. et al. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. JCM. 2013, 23: 160-163.
2. Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. JCM. 2012, 50 (10): 3152-3158.
3. Callewaert C., Kerckhof F.M., Granitsiotis M.S. et al. Characterization of *Staphylococcus* and *Corynebacterium* clusters in the human axillary region. Plos. 2013, 8 (8): e70538.
4. Chen Y.E., Tsao H. The skin microbiome: current perspectives and future challenges. J. Amer. Acad. Dermatol. 2013, 69 (1): 143-155.
5. Cogen A. L., Nizet V., Gallo R.L. Skin microbiota: a source of disease or defence? Br. J. Dermatol. 2008, 158 (3): 442-455.
6. Hinic V., Lang C., Weisser M. et al. *Corynebacterium tuberculoostearicum*: a potentially misidentified and multiresistant *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens. JCM. 2012, 50 (8): 2561-2567.
7. Khamis A., Raoult D., Scola B. Comparison between *rpoB* and 16SrRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. J. Clinical Microbiology. 2005, 43 (4): 1934-1936.
8. Mathieu A., Delmont T.O., Vogel T.M. et al. Life on human surfaces: skin metagenomics. Plos. 2013, 8 (6): e65288.
9. Mathieu A., Vogel T.M., Simonet P. The future of skin metagenomics. Res. Microbiol. 2014, 167: 69-76.
10. Schommer N.N., Gallo R.L. Structure and function of the human skin microbiome. Trend Microbiol. 2013, 21 (12): 660-668.

Поступила 13.06.17

Контактная информация: Борисова Ольга Юрьевна, д.м.н.,
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (499)747-64-84

М.П.Неустроев¹, А.Н.Мурашев², Д.А.Бондаренко², А.М.Степанова¹, Н.П.Тарабукина¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА САХАБАКТИСУБТИЛ НА КРЫСАХ

¹Якутский НИИ сельского хозяйства, Якутск; ²Филиал института биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Пушино

Цель. Определить безопасность и потенциальные токсические эффекты препарата Сахабактисубтил при его многократном внутрижелудочном введении крысам CD. **Материалы и методы.** Самцам и самкам крыс CD (Sprague-Dawley) разных экспериментальных групп внутрижелудочно однократно (группе 3 двукратно по 8 мл за введение с промежутком в 6 часов) на протяжении 14 дней ежедневно вводили различные дозы препарата или физраствор — контрольным животным. В течение 14 дней введения препарата и 14 дней отмены введения у всех животных определяли: массу тела, потребление корма, клинические признаки нарушения здоровья. На 15 и 29 дни исследования животные были подвергнуты эвтаназии и некропии с забором органов для последующего гистологического анализа. При некропии регистрировали массу внутренних органов, забирали образцы крови для изучения гематологических и биохимических показателей. **Результаты.** В ходе исследования гибели животных и признаков токсичности от введения тестируемого препарата на всем протяжении исследования не выявлено. Статистически значимых различий между группами по приросту массы тела, гематологическими и биохимическими показателями выявлено не было. **Заключение.** Препарат Сахабактисубтил является безопасным при многократном внутрижелудочном введении крысам CD.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 59—64

Ключевые слова: пробиотик, Сахабактисубтил, крысы Sprague-Dawley (CD), токсичность, доклинические испытания

М.П.Неустроев¹, А.Н.Мурашев², Д.А.Бондаренко², А.М.Степанова¹, Н.П.Тарабукина¹

STUDY OF TOXICITY OF SAKHABACTISUBTIL IN RATS

¹Research Institute of Agriculture, Yakutsk ; ²Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Research Institute of Bioorganic Chemistry, Puschino, Russia

Aim. Determine safety and potential toxic effects of Sakhabactisubtil during its multifold intra-gastric administration to CD rats. **Materials and methods.** Male and female CD rats (Sprague-Dawley) of various experimental groups received various doses of the preparation or saline (control group) once per day (twice for group 3 in 8 ml at 6 hours interval) intra-gastrically for 14 days. Body mass, forage use, clinical signs were determined for 14 days of the preparation administration and 14 days after cancellation in all the animals. The animals were euthanized and necropsy was carried out at days 15 and 29 of the study with extraction of organs for subsequent histological analysis. Mass of internal organs was registered during necropsy, blood samples were taken for study of hematologic and biochemical parameter evaluation. **Results.** Animal death and signs of toxicity were not detected during the study from administration of the tested preparation for the entire period. Statistically significant differences between groups by body mass growth, hematologic and biochemical parameters were not detected. **Conclusion.** Sakhabactisubtil is safe during multifold intra-gastric administration to CD rats.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 59—64

Key words: probiotic, Sakhabactisubtil, Sprague-Dawley rats, toxicity, preclinical studies

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире наблюдается интерес к пробиотикам, которые входят в состав продуктов функционального питания, а также используются в качестве про-

филактических и лечебных препаратов. Препараты на основе спорообразующих аэробных бактерий, обладающие устойчивостью, высокой антагонистической, иммуномодулирующей и ферментативной активностью, способностью к адгезии на слизистой оболочке кишечника, испытываются и используются в животноводстве, ветеринарной [1, 6, 9 — 11, 13] и медицинской [2, 3, 7, 8, 12, 15] практике.

В настоящее время Якутским НИИ сельского хозяйства разработано и утверждено в Россельхознадзоре МСХ РФ лекарственное средство — пробиотик Сахабактисубтил. Препарат обладает антагонистическим активностью в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов (бактерии, вирусы и грибы), способностью стимулировать полезную микрофлору и иммунобиологическую реактивность, индуцировать синтез интерферона, продуцировать ряд ферментов. По результатам НИР получены 34 патента РФ на изобретение [4, 5, 14].

Нами установлено отсутствие токсичности препарата Сахабактисубтил при однократном внутрижелудочном применении у мышей CD-1, что позволяет проводить дальнейшие доклинические испытания [4].

Исходя из вышеизложенного цель работы — исследовать токсичность препарата Сахабактисубтил при многократном внутрижелудочном введении крысам CD. Данное исследование входит в комплекс доклинических исследований, необходимых для обоснования клинических испытаний медицинских лекарственных средств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат Сахабактисубтил изготовлен из штаммов бактерий *B. subtilis* ТНП-3 и *B. subtilis* ТНП-5, депонированных во Всероссийском государственном научно-контрольном институте ветеринарных препаратов (Москва). Препарат состоит из равных соотношений суспензий культур штаммов, концентрация 5×10^9 КОЕ/мл.

Исследования выполнялись в соответствии с нормативными актами Российской Федерации, регламентирующими сферу доклинических исследований: ГОСТ Р 53434-2009 «Принцип надлежащей лабораторной практики (GLP)» и Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 года № 708н, а также в соответствии с международными руководствами «OECD ENV/MC/CHMP(98)17, 1997 и ICH guideline S6 (R1) — preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, EMA/CHMP/731268/1998 committee for medicinal products for human use (CHMP), June 2011.

Работа проведена в лаборатории биологических испытаний Филиала института биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова (Пушино).

Лабораторные животные (самцы и самки) линии Sprague-Dawley получены из НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН» в возрасте 6 недель, живая масса $444,4 \pm 10,7$ г. (самцы) и $223,9 \pm 4,8$ г. (самки).

Количество самок 30, самцов 30 голов, группы по 20 животных (10 самок, 10 самцов). Самцам и самкам крыс CD разных экспериментальных групп внутрижелудочно однократно (группе 3 двукратно по 8 мл за введение промежутком в 6 часов) на протяжении 14 дней ежедневно вводили различные дозы препарата или физраствор — контрольным животным. В течение 14 дней введения препарата и 14 дней отмены введения у всех животных определяли: массу тела, потребление корма, клинические признаки нарушения здоровья.

Схема проведения опыта

Номер группы	Группы	Количество животных				Доза (КОЕ <i>B.subtilis</i> /животное)	Объем, введения, мл
		Эвтаназия на 15 день		Эвтаназия на 29 день			
		М	Ф	М	Ф		
1	Контроль	5	5	5	5	0	4
2	Сахабактисубтил (доза 1)	5	5	5	5	20x10 ⁹	4
3	Сахабактисубтил (доза 2)	5	5	5	5	80x10 ⁹	16

Примечание. М — самцы, Ф — самки.

На 15 и 29 дни исследования животные были подвергнуты эвтаназии и некропсии с забором органов для последующего гистологического анализа. (табл.).

Измерения гематологических показателей проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Mythic 18 VET (Woodley veterinary diagnostics, Швейцария).

В сыворотке крови определяли биохимические показатели: аланинаминотрансферазу, аспаратаминотрансферазу, щелочную фосфатазу, креатинин, общий белок, кальций, хлориды, фосфаты, глюкозу, альбумин, мочевины, общий билирубин, холестерин, триглицериды, глобулин. Измерения проводили на биохимическом анализаторе Сапфир-400 (Токуо Воки LTD).

В конце исследования всех животных подвергали эвтаназии с помещением в СО₂ камеру с последующим обескровливанием.

Данные веса тела и потребления корма были проанализированы двухфакторным дисперсионным анализом ANOVA с последующим тестом Newman-Keuls или Duncan. Данные гематологии, биохимии и веса органов были проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом Newman-Keuls или непараметрического критерия Kruskal-Wallis с тестом Dunn в зависимости от типа распределения количественных данных. Статистический анализ проводили с программой Statistica ver. 7.1. Различия определяли при P<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследование гибели животных зафиксировано не было. Признаков интоксикации организма, связанных с токсическим действием препарата, на всем протяжении исследования не выявлено.

Статистически значимых различий между животными, получившими тестируемый препарат, и контрольными животными по показателям массы тела и прироста массы тела ни у самцов, ни у самок выявлено не было.

У самцов крыс CD, получивших внутрижелудочно Сахабактисубтил в дозах 20x10⁹ и 80x10⁹ КОЕ *B.subtilis*/животное в течение 14 дней, не выявлено достоверных отличий в значениях гематологических показателей относительно контрольной группы сразу после отмены введения.

Спустя две недели после отмены введения в группе Сахабактисубтил — доза 2 (80x10⁹ КОЕ *B.subtilis*/животное) отмечалось небольшое снижение среднего объема эритроцита (55,6±1,2 фл) относительно контрольного уровня (58,0±1,0 фл). В группе самцов Сахабактисубтил — доза 1 (20x10⁹ КОЕ *B.subtilis*/животное) отмечалось снижение доли сегментоядерных нейтрофилов (3,2±0,8%) с тенденцией к снижению их абсолютного количества (0,51±0,23 Г/л) относительно контрольного уровня (6,2±1,3%, 0,80±0,14 Г/л). Аналогич-

ная картина прослеживалась в группе Сахабактисубтил — доза 2 (80×10^9 КОЕ *B.subtilis*/животное).

У самок крыс CD сразу после отмены введения Сахабактисубтила в обеих дозах отклонений в тромбоцитарных и эритроцитарных показателях не выявлено. В лейкограмме у самок в группах Сахабактисубтил — доза 1 (20×10^9 КОЕ *B.subtilis*/животное) и Сахабактисубтил — доза 2 (80×10^9 КОЕ *B.subtilis*/животное), в противоположность самцам, наблюдалось увеличение доли ($4,6 \pm 0,9\%$, $6,6 \pm 1,9\%$) и абсолютного содержания сегментоядерных нейтрофилов ($0,50 \pm 0,06$ Г/л, $0,68 \pm 0,21$ Г/л) относительно контрольных значений ($3,0 \pm 1,2\%$, $0,34 \pm 0,13$ Г/л) и тенденция к снижению содержания лимфоцитов. Аналогичное картина сохранялась у самок спустя 2 недели после отмены введения, причем в группе Сахабактисубтил — доза 1 (20×10^9 КОЕ *B.subtilis*/животное) отличие было достоверно, в группе Сахабактисубтил — доза 2 (80×10^9 КОЕ *B.subtilis*/животное) отмечалась только тенденция.

Поскольку выявленные изменения в лейкограмме у самцов и самок имели противоположную направленность, они, по всей видимости, случайны и не связаны с действием препарата, а обусловлены индивидуальной вариабельностью показателей и малыми выборками животных.

На 15 и 29 день исследования у самцов в группе, получавшей тестируемый препарат в двух дозах, средние значения изучаемых биохимических параметров статистически не отличались между группами.

У самок на 29 день исследования наблюдалось некоторое снижение уровня мочевины в группе, получавшей Сахабактисубтил — доза 1 (20×10^9 КОЕ *B.subtilis*/животное), по сравнению с группой, получавшей Сахабактисубтил — доза 2 (80×10^9 КОЕ *B.subtilis*/животное), однако статистически значимых отличий в значениях этого параметра от контрольной группы обнаружено не было.

Статистически значимых различий по массе органов между животными, получавшими тестируемый препарат, и контрольными животными, получавшими физиологический раствор, по массе органов ни у самцов, ни у самок выявлено не было.

При плановой некропсии животных в ходе визуального осмотра внешне-го состояния тела, внутренних поверхностей и проходов, полости черепа, грудной, брюшной и тазовой полости с находящимися в них органами и тканями, шеи с органами и тканями, каркаса и скелетно-мышечной системы, а также мест введения препарата патологические изменения зафиксированы не были.

В соответствии с планом исследования проведен микроскопический анализ сердца, легких, головного мозга, печени, почек, надпочечников, яичников, семенников, тимуса, селезенки, брыжеечных лимфоузлов, желудка, двенадцатиперстной, тощей, подвздошной, слепой и ободочной кишки. В процессе проведения микроскопического анализа в перечисленных органах, за исключением брыжеечных лимфоузлов, отклонений от нормы и повреждений выявлено не было.

Со стороны брыжеечных лимфоузлов у одного самца, получавшего тестируемый препарат в дозе 20×10^9 , и у двух самок, получавших препарат в дозе 80×10^9 КОЕ *B.subtilis*/животное, наблюдалось умеренное расширение мозговых синусов и повышение количества макрофагов в них, что указывает на активизацию ретикулоэндотелиальной системы. В данном случае причиной активизации этой системы, вероятнее всего, явилась повышенная индивидуальная чувствительность организма у отдельных животных к тестируемому

препарату, и это способствовало более выраженному проявлению барьерной и фагоцитарной функции со стороны ретикулоэндотелиальной системы.

Отсутствие токсичности препарата Сахабактисубтил, состоящего из штаммов бактерий *B.subtilis* ТНП-3 и *B.subtilis* ТНП-5, ранее установлено у беспородных мышей при разработке лекарственного средства — пробиотика для ветеринарного применения [14]. В настоящее время препарат утвержден Россельхознадзором и широко используется в ветеринарной практике для профилактики и лечения желудочно-кишечных болезней. Доклинические испытания на мышах CD-1 показали отсутствие токсичности при однократном внутрижелудочном применении [4]. В результате предыдущих исследований максимальной толерантная доза препарата Сахабактисубтил при его однократном внутрижелудочном введении мышам CD-1 и крысам CD достигнута не была, ввиду отсутствия смертности или какого-либо токсического эффекта в максимально допущенных для введения объемах.

Результаты исследований показали, что тестируемый оригинальный препарат Сахабактисубтил из штаммов бактерий *B.subtilis* ТНП-3 и *B.subtilis* ТНП-5 в исследуемых дозах является безопасным и не оказывает потенциально токсического эффекта при многократном внутрижелудочном введении крысам CD. Полученные данные могут быть учтены при разработке лекарственного препарата для медицинского применения из штаммов *B.subtilis* ТНП-3 и *B.subtilis* ТНП-5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова Т.А., Ленкова Т.Н., Ильина Л.А., Йылдырым Е.А., Никонов И.Н., Филиппова В.А., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Грозина А.А., Манукян В.А., Фисинин В.И., Егоров И.А. Влияние пробиотиков на основе *Saccharomyces* sp. и *Bacillus subtilis* на бактериальное сообщество слепых отростков кишечника и продуктивность цыплят-бройлеров. *Сельскохозяйственная биология*. 2016, 51 (6): 891-902.
2. Леванова Г.Ф., Лазовская А.Л., Кашников С.Ю. Плазмидный анализ бактерий рода *Bacillus*, используемых в конструировании пробиотиков. *Журн. микробиол.* 2007, 5: 77-79.
3. Михайлова Н.М., Блинкова Л.П., Гатауллин А.Г. Биологические основы изолятов *Bacillus subtilis*. *Журн. микробиол.* 2007, 4: 41-46.
4. Неустроев М.П., Тарабукина Н.П., Степанова А.М., Мурашев А.М. Изучение токсичности пробиотика из штаммов *Bacillus subtilis* на белых мышах. Новые материалы и технологии в условиях Арктики. Ставрополь. 2015, с. 118-122.
5. Неустроев М.П., Тарабукина Н.П., Степанова А.М., Парникова С.И., Петрова С.Г., Жирков А.Д., Романова У.Н., Иванова Л.И. Бактерицидное действие штаммов бактерий *Bacillus subtilis* к возбудителям лептоспироза. *Российская сельскохозяйственная наука*. 2015, 4: 63-65.
6. Панин А.Н., Малик Н.И., Илаев О.С. Пробиотики в животноводстве — состояние и перспективы. *Ветеринария*. 2012, 3: 3-8.
7. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безвредность. *Химическая и биологическая безопасность*. 2007, 32-33 (2-3): 20-40.
8. Псахис И.Б., Маковская Т.Е. Современные возможности и перспективы использования пробиотиков группы самоэлиминирующихся антагонистов в терапии инфекционных заболеваний. *Здоровье ребенка*. 2014, 14 (56): 134-138.
9. Alizadeh M., Rodriguez-Lecompte J.C., Yitbarek A.C. et al. Effect of yeast-derived products on systemic innate immune response of broiler chickens following a lipopolysaccharide challenge. *Poultry Sci.* 2016, 95 (10): 2266-2273.
10. Barboza-Corona J.E., Fuente-Salcido N., Flva-Murillo N. et al. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolated associated to bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 2009, 138: 179-183.
11. Czerwinski J., Hojberg O., Smulikowka S. et al. Influence of dietary peas and organic acids

- and probiotic supplementation on performance and caecal microbial ecology of broiler chickens. *Brit. Poultry Sci.* 2010, 51 (2): 258-269.
12. Hong H.A., Huang J.M., Khaneja R. et al. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 105: 510-520.
 13. Rajput I.R., Hussain A., Zhang X. et al. *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 modulate TLRs mediated signaling to induce immunity by chicken BMDCg. *J. Cell. Biochem.* 2014, 115 (1): 189-198.
 14. Tarabukina N.P., Neustroev M.P., Fedorova M.P., Parnicova S.I. Broad spectrum probiotic (*Sachabactisubtil*) recovered from Yakutia permatsoost soil. *Veterinary World-Open Access. Per. Rev. J.* 2011, 5: 222-224.
 15. Urdaci M.C., Bressollier P., Pinchuki I. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *J. Clin. Gastroenterol.* 2004, 38: 86-90.

Поступила 15.03.17

Контактная информация: Неустроев Михаил Петрович, д-р вет. наук,
677001, Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, 23, кор. 1, р.т. (411)221-00-95

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Т.Ю.Загоскина¹, Е.Ю.Марков¹, Е.А.Чапоргина¹, Ю.О.Попова¹,
Т.М.Долгова¹, О.В.Гаврилова¹, Т.С.Тайкова¹, А.В.Никитина²,
В.Г.Помелова², Н.С.Осин³, С.В.Балахонов¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТВЕРДОФАЗНЫХ МЕТОДОВ ИММУНОДЕТЕКЦИИ БОТУЛИНИЧЕСКОГО ТОКСИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНОГО С ДИАГНОЗОМ «БОТУЛИЗМ»

¹Иркутский научно-исследовательский противочумный институт; ²ГосНИИ биологического приборостроения; ³ЗАО «Иммуноскрин», Москва

Цель. Сравнение эффективности твердофазных методов иммунодетекции ботулинического токсина в сыворотке крови больного с диагнозом «ботулизм»: дот-иммуноанализа с использованием специфических противоботулинических антител (АТ), меченных наночастицами коллоидного серебра, фосфоресцентного анализа (ФОСФАН) с использованием стрептавидина, меченного платинокопропорфирином (PtКП) и полистирольными наночастицами, содержащими хелатный комплекс ионов европия с нафтоилтрифторацетонатом (НЧ-Еу). *Материалы и методы.* В работе использовали меченные наночастицами серебра IgG, выделенные из коммерческой диагностической поливалентной сыворотки против ботулотоксинов типов А, В, С, Е, F производства НПО «Аллерген» (Ставрополь) активностью 5000 — 10 000 МЕ, и конъюгированные с биотином коммерческие моноклональные антитела к ботулотоксину А, поликлональные моноспецифические АТ к ботулотоксину В и ботулотоксину Е и поливалентный иммуноглобулин к ботулотоксинам А, В, С, Е, F. Детекцию ботулотоксина в клиническом материале осуществляли в дот-иммуноанализе на нитроцеллюлозной мембране и методом ФОСФАН в экспериментальной тест-системе с применением двух детекторных систем на основе стрептавидина: PtКП и НЧ-Еу. *Результаты.* В сыворотке крови больного ботулизмом обнаружен ботулотоксин с использованием обоих разработанных методов иммунодетекции. Метод ФОСФАН позволил идентифицировать серотип В ботулотоксина, что совпало с полученным результатом в реакции биологической нейтрализации ботулотоксина. Чувствительность ФОСФАН с системой детекции на основе люминесцентных наночастиц НЧ-Еу была выше, чем с метчиком PtКП. *Заключение.* Разработанные методы (ФОСФАН и дот-иммуноанализ) отличаются высокой специфичностью и чувствительностью и могут быть рекомендованы для экспресс-детекции ботулинического токсина в клиническом материале.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 64—70

Ключевые слова: ботулинический токсин, мультиплексный фосфоресцентный анализ (ФОСФАН), дот-иммуноанализ, наночастицы серебра, люминесцентные наночастицы, хелат европия (Еу), Pt копропорфирин

T. Yu. Zagoskina¹, E. Yu. Markov¹, E. A. Chaporgina¹, Yu. O. Popova¹,
T. M. Dolgova¹, O. V. Gavrilova¹, T. S. Taikova¹, A. V. Nikitina²,
V. G. Pomelova², N. S. Osin³, S. V. Balakhonov¹

COMPARATIVE ANALYSIS OF EFFECTIVENESS OF SOLID-PHASE METHODS OF IMMUNE DETECTION OF BOTULINIC TOXIN IN BLOOD SERA OF A PATIENT WITH BOTULISM DIAGNOSIS

¹Irkutsk Research Institute for Plague Control; ²State Research Institute of Biological Equipment Manufacturing; ³Immunoscrin, Moscow, Russia

Aim. Comparison of effectiveness of solid phase methods of immune detection of botulinic toxin in blood sera of a patient with botulism diagnosis: dot-immune assay using specific anti-botulinic antibodies (AT) labeled with nanoparticles of colloid silver, phosphorescent analysis (PHOSPHAN) using streptavidin label with platinum coproporphyrin (PtCP) and polystyrene nanoparticles, containing chelate complex of europium ions with naphthoyl trifluoroacetone (NA-Eu). *Materials and methods.* Silver nanoparticle labeled IgG isolated from a commercial diagnostic polyvalent sera against type A, B, C, E, F botulotoxins manufactured by SPA Allergen (Stavropol) with 5000 — 10000 IU activity and biotin conjugated commercial monoclonal antibodies against botulotoxin A, polyclonal mono-specific AB against botulotoxin B and E and polyvalent immunoglobulin against botulotoxin A, B, C, E, F. Detection of botulotoxin in clinical material was carried out in dot-immunoassay on nitrocellulose membrane by PHOSPHAN method in an experimental test system using 2 detector systems based on streptavidin: PtCP and NA-Eu. *Results.* Botulotoxin was detected in blood sera of the botulism patient using both of the developed immune detection methods. PHOSPHAN method allowed to identify serotype B botulotoxin, that corresponded with the results obtained in botulotoxin biological neutralization reaction. Sensitivity of PHOSPHAN with NA-Eu luminescent nanoparticle based detection system was higher than with PtCP label. *Conclusion.* The developed methods (PHOSPHAN and dot-immunoassay) differ by high specificity and sensitivity and may be recommended for express detection of botulinic toxin in clinical material.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 64—70

Key words: botulinic toxin, multiplex fluorescent assay (PHOSPHAN), dot immunoassay, silver nanoparticles, luminescent nanoparticles, europium chelate (Eu), Pt coproporphyrin

ВВЕДЕНИЕ

Ботулизм — тяжелая токсикоинфекция, обусловленная преимущественным поражением ЦНС экзотоксинами спорообразующих анаэробных бактерий *Clostridium botulinum*. Ботулинические нейротоксины подразделяются на серотипы А, В, С, D, Е, F и G. Несмотря на довольно высокое сходство первичной структуры их молекул [12] внутриклеточные белки-мишени разных типов токсинов, характеристики действия и эффективность значительно различаются [5]. Все они чрезвычайно токсичны, ингибируют высвобождение ацетилхолина в нервно-мышечном соединении, что приводит к параличу мышц. Наиболее патогенны для человека токсины серотипов А, В, Е и F [1]. Все типы токсинов *C. botulinum* обуславливают одинаковую картину заболевания, но токсин каждого типа иммунохимически специфичен и нейтрализуется только соответствующим антитоксином.

Ботулотоксины (БТ) — яды биологического происхождения II группы патогенности — с высокой вероятностью также могут быть использованы в качестве поражающих агентов при совершении актов биологического и химического терроризма.

Заражение людей происходит преимущественно в результате употребления в пищу продуктов, содержащих ботулотоксины, и самих возбудителей

S. botulinum. Течение и исходы заболевания определяются выраженностью клинических симптомов и своевременностью проведения специфической терапии. При запаздывании лечения ботулизм протекает, как правило, тяжело, летальность варьирует от 20 до 70% [4, 7].

Индикацию БТ в Российской Федерации традиционно проводят согласно единой схеме анализа: постановкой реакций пассивной гемагглютинации (РПГА), чувствительность которой невысока, сертифицированные эритроцитарные диагностикумы в настоящее время пока отсутствуют; биологической нейтрализации токсина (РБНТ) на мышцах с использованием диагностических противоботулинических поли- и моновалентных сывороток серотипов А, В, С, Е, F и биопробы (БП). Ориентировочный ответ в БП и РБНТ выдается лишь на 2 сутки, окончательный — через 4 — 8 сут. К сожалению, не всегда имеется возможность проведения работ с лабораторными животными. При подозрении на ботулизм, когда необходимо немедленное лечение, биоанализ может быть недостаточно оперативным методом диагностики. Успех лечения больных антитоксином сильно зависит от времени его введения: если токсин попал в нервные окончания и исчез из кровотока, то такое лечение будет неэффективным.

Поэтому с целью ускорения процедуры определения и идентификации ботулотоксинов, а также отказа от использования лабораторных животных для рутинного скрининга клинического материала и пищевых продуктов предпринимаются попытки разработки надежных высокочувствительных экспрессных и информативных методов обнаружения ботулотоксинов *in vitro*.

За рубежом «золотым» стандартом детекции БТ в пищевых продуктах и клиническом материале является тест на летальность для мышей — высокочувствительная, но дорогостоящая и требующая большого расхода времени процедура [10].

В последние годы, в том числе и 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. Технически подобные подходы представлены большим разнообразием иммунохроматографических, иммунофильтрационных 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 — коллоидное золото) и дисперсные красители. Кроме того, достижение высоких показателей чувствительности и специфичности, а также сокращение времени и стоимости анализа достигается путем использования мультиплексных методов для одновременного обнаружения нескольких патогенов и систем детекции на основе люминесцентных наночастиц [6, 8].

Цель исследования — сравнительное изучение эффективности твердофазных методов иммунодетекции ботулинического токсина в сыворотке крови больного: дот-иммуноанализа с наночастицами серебра в качестве маркера специфических антител и фосфоресцентного анализа (ФОСФАН).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника специфических антител для проведения дот-иммуноанализа (ДИА) 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 IgG комбинированным методом с использованием каприловой кислоты и сульфата аммония [11].

Постановку фосфоресцентного анализа (ФОСФАН) проводили в экспериментальной тест-системе «Ботулотокс-ФОСФАН». В ее составе используются моноклональные антитела (МАТ) к ботулотоксину А (БТА) (ООО «Импакт», Москва), поликлональные моноспецифические АТ к ботулотоксину В (БТВ) и ботулотоксину Е (БТЕ) и поливалентный иммуноглобулин к БТА, В, С, Е, F (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва). Ключевой элемент этой тест-системы — иммуночип (биосенсор), представляющий собой стандартный 96-луночный полистироловый микропланшет, на дне лунок которого напечатаны специфические АТ в виде 16 микрозон диаметром 0,5 мм каждая, по 4 микрозоны на каждый иммуноглобулин. Дизайн иммуночипа обеспечивает возможность группоспецифической индикации пяти БТ (А, В, С, Е, F) и позволяет типировать БТА, БТВ и БТЕ [6]. Иммуноанализ по технологии ФОСФАН выполняли в лунках планшета, в которые вносили конъюгированные с биотином противоботулинические АТ и исследуемый клинический материал. После соответствующей инкубации реагентов и промывки лунок планшета вносили детекторные системы: 1 — на основе стрептавидина, конъюгированного с платинакопропорфирином (PtКП), 2 — полистирольных наночастиц, покрытых стрептавидином и содержащих инкорпорированный внутри частицы хелат европия (НЧ-Eu) [9]. Люминесценцию обоих маркеров возбуждали на длине волны 365 нм и регистрировали на биочип-анализаторе ИФИ-03 «Диагем» (№ ФСР 2012/13913 от 8 августа 2013 г., ЗАО «Имуноскрин») в режиме временного разрешения на длине волны 653 нм (для PtКП) и 615 нм (для НЧ-Eu). Порог детекции определяли как минимальную концентрацию БТ, при которой интенсивность люминесценции пробы не менее чем в два раза превышала сигнал отрицательного контроля из состава тест-системы.

Для получения наночастиц серебра с диаметром частиц 9 — 12 нм, наиболее подходящих для использования в качестве диагностикума в до-иммуноанализе, смешивали равные объемы водных растворов боргидрида натрия и азотнокислого серебра [3]. С помощью флокуляционного теста определяли количество IgG, способных стабилизировать золь серебра. Рассчитанное количество специфических АТ вносили в золь, перемешивали на магнитной мешалке 20 мин, затем полученный комплекс (диагностикум) стабилизировали добавлением равного объема фосфатного буфера, содержащего бычий сывороточный альбумин (БСА), нормальную кроличью сыворотку (НКС) и водный раствор полиэтиленгликоля-20 000 (ПЭГ). Далее в диагностикум добавляли NaCl и азид натрия и дополнительно перемешивали в течение 10 мин на магнитной мешалке.

Постановку ДИА осуществляли в «сэндвич» варианте [2]. При этом нитроцеллюлозные мембраны с размером пор 0,2 — 0,45 мкм нагружали противоботулиническими поливалентными IgG, выдерживая их в растворе антител в течение 20 мин. Далее подложку высушивали на воздухе, наносили исследуемый материал в объеме 1 мкл и после дополнительного блокирования свободных участков на мембране раствором БСА погружали в приготовленный диагностикум. После часовой экспозиции и последующей промывки мембран физиологическим раствором и дистиллированной водой образовавшийся иммунный комплекс (БТ=IgG) выявляли водным раствором проявителя, состоящего из лимонной кислоты, метола и азотнокислого серебра. Учет результатов — визуальный: места нанесения проб, содержащих ботулотоксин, окрашивались в виде пятен в темно-серый цвет. В отрицательных контролях и

образцах, не содержащих ботулинические токсины, окрашенные пятна не формировались, мембрана оставалась белой.

Исследуемым материалом служила сыворотка крови больного с установленным диагнозом «ботулизм», положительная в биопrobe (БП) и РБНТ (определен ботулотоксин серотипа В), в качестве отрицательного контроля использовали сыворотки крови больного острой кишечной инфекцией (ОКИ) и здорового человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного эксперимента установлено следующее. При исследовании клинических образцов методом иммуноанализа по технологии ФОСФАН с использованием системы детекции на основе полистирольных наночастиц, содержащих инкорпорированный хелат европия, положительный результат получен с сывороткой крови больного ботулизмом, при этом сработали микрозоны с поливалентными противоботулиническими АТ и микрозона с поликлональным моноспецифическим антителом к БТВ. Положительный сигнал в зоне с поливалентным IgG свидетельствовал о возможном наличии в исследуемом образце любого из пяти БТ (А, В, С, Е, F). Определение серотипа БТВ полностью совпало с полученным результатом в РБНТ, в которой также был установлен серотип В. Сравнение величины сигнала от этого образца с калибровочным графиком зависимости интенсивности фосфоресценции от концентрации БТВ [6] позволило количественно оценить содержание БТВ в сыворотке крови больного ботулизмом на уровне примерно 100 пг/мл. Образцы крови больного ОКИ и здорового человека были отрицательными, т. е. фосфоресценция этих проб менее чем в 2 раза превышала сигнал от отрицательного контроля из тест-системы «Ботулотокс-ФОСФАН». Установлено также, что порог детекции ботулотоксинов в системе с использованием фосфоресцентных наночастиц НЧ-Eu был ниже, чем в системе на основе РтКП, в которой исследуемая сыворотка крови больного ботулизмом была отрицательной (сигналы фосфоресценции не превышали значений отрицательного контроля, полученных с сыворотками крови больного ОКИ и здорового человека). Более высокая чувствительность иммуноанализа с использованием НЧ-Eu обусловлена высокой излучательной способностью наночастиц, содержащих до 2000 молекул фосфоресцентной метки, что позволило повысить чувствительность детекции ботулотоксина примерно на порядок по сравнению с использованием фосфоресцентного метчика РтКП [6]. Продолжительность анализа на иммуночипе с использованием фосфоресцентных маркеров составила около 3 ч, хотя имеются данные о возможности сокращения этого времени примерно до 90 мин без потери чувствительности [6].

В ходе постановки дот-иммуноанализа в сыворотке крови больного ботулизмом обнаружен ботулинический токсин, проявляющийся на мембране в месте нанесения пробы в виде темно-серых пятен. Общее время постановки анализа составило около 2 ч, объем исследуемого образца — 1 — 2 мкл. В отрицательном контроле (сыворотка крови больного ОКИ и здорового человека) ботулотоксин не обнаруживался. Результаты, полученные в ДИА, полностью совпадали с результатами биопробы и реакции биологической нейтрализации токсина на мышах, подтверждая высокую чувствительность (на уровне БП и РБНТ, составляющей, судя по данным литературы [1], несколько десятков пикограммов токсина на 1 мл) и специфичность разработанной тест-системы для ДИА.

Преимуществом иммуноанализа по технологии ФОСФАН с использованием детекторной системы на основе полистирольных наночастиц, содержащих инкорпорированный внутри частицы хелат европия, является возможность группоспецифического обнаружения пяти серотипов ботулинического токсина с одновременной типоспецифической идентификацией трех токсинов. Другое важное преимущество состоит в высокой производительности иммуноанализа, которая обеспечивается микропланшетным форматом иммуночипа, а также возможности визуального контроля чувствительности и специфичности иммунореакции при анализе цветовой изображения на экране компьютера [8]. Оборудование и реагенты (тест-системы) на основе технологии ФОСФАН рекомендуются для оснащения стационарных диагностических центров, оперирующих большим числом проб биологического материала.

Преимуществом тест-системы для дот-иммуноанализа на основе коммерческих поливалентных противоботулинических антител, меченных наночастицами серебра, являются простота в приготовлении, независимость от дорогостоящего приборного обеспечения, демонстративность результатов (визуальная оценка), высокие чувствительность, специфичность, экспрессность, экономичность и доступность применения в слабо оснащенных лабораториях, а также в условиях работы специализированных противоэпидемических бригад в режиме ЧС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аббасова С.Г., Руденко Н.В., Гороховатский А.Ю., Капралова М.В., Виноградова И.Д., Вертиев Ю.В., Несмеянов В.А., Гришин Е.В. Моноклональные антитела к ботулиническому нейротоксинам типов А, В, Е и F. *Биоорг. химия*. 2011, 37 (3): 344-353.
2. 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.
3. Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Носырева Л.И., Бодрых О.Б., Марков Е.Ю., Вейде А.А., Долгова Т.М., Тайкова Т.С., Балахонов С.В. Конструирование тест-системы для скрининга пищевых продуктов и клинического материала на ботулотоксин в дот-иммуноанализе. *Журн. инф. патол.* 2009, 16 (3): 20-23.
4. Зубик Т.М. Ботулизм. В: *Инфекционные болезни*. Ю.В.Лобзин (ред.). СПб, Спецлит, 2001, с. 147-156.
5. Куренков А.Л., Артеменко А.Р., Никитин С.С., Орлова О.Р. Современные представления о механизмах действия ботулинического токсина типа А. *Врач*. 2009, 7: 8-12.
6. Никитина А.В., Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Парамонов Д.В., Кострюкова Т.С., Осин Н.С. Иммуночипы для одновременного обнаружения пяти ботулотоксинов методом фосфоресцентного анализа (ФОСФАН). *Пробл. особо опасных инф.* 2016, 4: 64-68. doi: 10.21055/0370-1069-2016-4-64-68.
7. Никифоров В.Н., Никифоров В.В. Ботулизм. Л., Медицина, 1985.
8. Осин Н.С., Помелова В.Г., Соколов А.С., Быченкова Т.А., Бекман Н.И., Шарафудинова Т.Ю., Аслиян С.К., Ивановская Н.П., Ларичева С.Ю., Канаева Т.А. Фосфоресцентный микроанализ как новая технологическая платформа для молекулярной диагностики. *Вестник РАМН*. 2007, 12: 3-10.
9. Парамонов Д.В., Кострюкова Т.С., Быченкова Т.А., Помелова В.Г., Осин Н.С. Биоспецифичные наночастицы для мультиплексного фосфоресцентного анализа (ФОСФАН). *Биоорг. химия*. 2016, 42 (6): 722-731. doi: 10.7868/S0132342316060099.
10. Lindström M., Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19 (2): 298-314.

11. 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.
12. Montal M. Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu. Rev. Biochem.* 2010; 79: 591-617.

Поступила 10.04.17

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

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Е.В.Анганова^{1,2}, А.В.Ветохина^{1,3}, Л.А.Распопина^{1,4}, Е.Л.Кичигина¹, Е.Д.Савилов^{1,2}

СОСТОЯНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

¹Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования — филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования; ²Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск; ³Иркутская областная клиническая больница; ⁴Иркутская областная инфекционная больница

Микроорганизмы *Klebsiella pneumoniae* входят в группу наиболее распространенных клинически значимых патогенов с высоким уровнем антибактериальной устойчивости (ESKAPE). Скорость формирования антибиотикорезистентности штаммами *K. pneumoniae* резко увеличилась и достигла пандемического масштаба. Одним из основных клинически значимых механизмов их антимикробной резистентности является продукция β -лактамаз, группы которых различны в зависимости от региона, страны и стационара. В настоящее время значительная часть нозокомиальных *K. pneumoniae* устойчива к защищенным пенициллинам, цефалоспорином III — IV поколений. Серьезной угрозой системе здравоохранения является рост устойчивости клебсиелл к карбапенемам. В первую очередь, это KPC-, OXA-, NDM-, VIM-, IMP-продуцирующие *K. pneumoniae*. Быстрое распространение в мире карбапенемрезистентных клебсиелл свидетельствует о необходимости международного сотрудничества в рамках контроля за антибиотикорезистентностью. Отмечается увеличение частоты приобретенной резистентности *K. pneumoniae* к не- β -лактамным антибиотикам (фторхинолонам, аминогликозидам). Регистрируются изоляты *K. pneumoniae*, устойчивые к тигециклину, колистину. В целом, проблема антибиотикоустойчивости возбудителей инфекционных заболеваний человека, в т. ч. *K. pneumoniae*, продолжает обостряться. Это серьезнейшая угроза для мирового общественного здравоохранения, которая требует действий во всех государственных секторах.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 70—77

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, β -лактамазы расширенного спектра, группы антимикробных препаратов

Е.В.Анганова^{1,2}, А.В.Ветохина^{1,3}, Л.А.Распопина^{1,4}, Е.Л.Кичигина¹, Е.Д.Савилов^{1,2}

STATE OF ANTIBIOTICS RESISTANCE OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

¹Irkutsk State Medical Academy of Post-Graduate Education — Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education; ²Scientific Centre of Problems of Family Health and Human Reproduction, Irkutsk; ³Irkutsk Regional Clinical Hospital; ⁴Irkutsk Regional Infectious Hospital, Russia

Klebsiella pneumoniae microorganisms belong to a group of the most prevalent clinically significant pathogens with a high level of antibacterial resistance (ESKAPE). The speed of formation of antibiotics-resistance by *K. pneumoniae* strains has sharply increased and reached pandemic scale. One of the main clinically significant mechanisms of antimicrobial resistance is β -lactamase production, the groups being active depending on the region, country and hospital. Currently, a significant part of nosocomial *K. pneumoniae* is resistant to penicillins, III-IV generation cephalosporins. The growth of resistance of klebsiellae to carbapenems is a serious threat to the health-care system. First of all, KPC-, OXA-, NDM-, VIM-, IMP-producing *K. pneumoniae*. Wide spread of carbapenem-resistant klebsiellae gives evidence on the necessity of international collaboration within the framework of antibiotics resistance control. An increase of frequency of obtained resistance of *K. pneumoniae* to non- β -lactame antibiotics (fluoroquinolones, aminoglycosides) is noted. Isolates of *K. pneumoniae* resistant to tygecyclin, colistin are registered. In general, the problem of antibiotics resistance of causative agents of human diseases including *K. pneumoniae* continues to intensify. This is a serious threat to world public health that requires action in all sectors of the state.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 70—77

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotics resistance, extended spectrum β -lactamases, groups of antimicrobial preparations

В последние десятилетия отмечается значительный рост заболеваний, вызываемых условно патогенными микроорганизмами, в т.ч. *Klebsiella pneumoniae*. Этот микроорганизм ассоциирован с широким спектром инфекционных заболеваний человека: инфекции мочевыводящих и дыхательных путей, септицемии, инфекции кожи и мягких тканей и др. [3, 5, 8, 34]. Бактерии семейства Enterobacteriaceae, среди которых преобладают *K. pneumoniae*, являются наиболее частыми возбудителями нозокомиальных инфекций [12, 13].

В связи с этим, особенно остро стоит проблема устойчивости данных возбудителей к антимикробным препаратам (АМП) [43]. Микроорганизмы *K. pneumoniae* входят в группу наиболее распространенных патогенов с высоким уровнем устойчивости, которую IDSA — Infectious Diseases Society of America обозначило как «ESKAPE-патогены» (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*). Возбудители ESKAPE являются наиболее важными причинами кризиса антибиотикорезистентности [17]. Именно поэтому *K. pneumoniae* отнесены ВОЗ к группе возбудителей с «критически высоким уровнем приоритетности» [47].

Одним из основных клинически значимых механизмов антимикробной резистентности *K. pneumoniae* является выработка β -лактамаз расширенного спектра (ESBL — Extended spectrum beta-lactamases). Распространенность продуцентов ESBL среди нозокомиальных *K. pneumoniae*, по данным разных авторов, варьирует от 45,2% [6] до 81,4% [11] и даже до 90,6% [13]. Изоляты *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, связанной с производством ESBL, выявляют не только у госпитализированных, но также и у амбулаторных пациентов, что способствует распространению ESBL среди здоровых людей и в окружающей среде [10].

В настоящее время имеет место высокий уровень резистентности нозокомиальных *K. pneumoniae* к ингибиторзащищенным АМП, в частности, к амоксициллину/клавуланату, устойчивость к которому в разных стационарах России составляет от 72,8% [9] до 95% (согласно критериям EUCAST — European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [5]. Нозокомиальные *K. pneumoniae* в подавляющем большинстве случаев (77,2 — 99,3%) устойчивы

к цефалоспорином III поколения (цефтриаксону, цефотаксиму, цефтазидиму) [5, 9]. В последние годы отмечается стремительное распространение ESBL CTX-M-типа (составляющих около 65% всех β -лактамаз), особенностью которых является более высокая способность гидролизовать цефалоспорин IV поколения — цефепим [4, 10, 18], резистентность к которому составляет около 70% [9], достигая 92,8% (по критериям EUCAST) и 93,2% (по критериям CLSI — Clinical laboratory standards institute) [5].

Быстрое распространение ESBL привело к выраженному снижению роли большинства β -лактамов в лечении тяжелых госпитальных инфекций, возрастанию роли и частоты применения препаратов «последней линии» — карбапенемов. Следствием этого стало формирование и распространение резистентности к указанным АМП [1, 20]. По данным ECDC (European Center for Disease Prevention and Control), в некоторых европейских странах резистентность *K. pneumoniae* к карбапенемам возросла с 4,6% в 2010 г. до 8,3% в 2013 г. В США за 2009 — 2010 гг. в 13% случаев инфекций кровотока и катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей, вызванных *Klebsiella*, возбудитель был устойчив к карбапенемам. Экспертами CDC (Centres for Diseases Control) США распространение энтеробактерий, устойчивых к карбапенемам, рассматривается как одна из наиболее серьезных угроз системе здравоохранения [16, 26]. По данным многоцентрового эпидемиологического исследования в 2011 — 2012 гг. в России нечувствительность к меропенему, имипенему и эртапенему проявляли 2,8%; 8,4% и 14,0% изолятов *K. pneumoniae* соответственно [13]. Согласно исследованиям Б.Р. Гельфанд [5], за период 2007 — 2014 гг. выявлена тенденция увеличения устойчивости нозокомиальных штаммов клебсиелл к карбапенемам: имепенему — с 3,4% до 19,9%, меропенему — с 17,9% до 36,4%.

На сегодняшний день для *K. pneumoniae* актуальными считаются следующие карбапенемазы: КРС (*Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*) (молекулярный класс А), группа ферментов ОХА — типа (*Oxacillin-hydrolyzing β -lactamase*) (молекулярный класс D) и группа ферментов NDM — типа (*New Delhimetallo- β -lactomase*) (молекулярный класс B) [1, 5, 28]. Реже выявляют карбапенемазы VIM (*Verona Imipenemase*) и IMP (*Imipenemase*) (класс B).

VIM-продуцирующие *K. pneumoniae* эндемичны для определенных географических территорий, в частности, для Греции. Впервые они были обнаружены в 2002 г. в отделениях интенсивной терапии (ОИТ) трех больниц в Афинах [27]. В настоящее время доля устойчивых (из числа выделенных) штаммов здесь достигает 62,3% [15]. Спорадические изоляты и небольшие вспышки VIM-продуцирующих *K. pneumoniae* были и в некоторых других странах, причем в ряде случаев был доказан занос этих штаммов из Греции. Так, имеются сообщения о результатах исследования, проведенного в Финляндии: у 25 пациентов, совершивших поездку за пределы Финляндии (преимущественно в Грецию) в 2008-2011 гг., выявили карбапенемазо-продуцирующие энтеробактерии, в т.ч. *K. pneumoniae* [38].

IMP-продуцирующие *K. pneumoniae* впервые были выявлены в 1990-х годах в Японии, затем они распространились в Европе [22]. На сегодняшний день группа генов blaIMP-типа относительно широко распространена, тем не менее, по данным В.А. Агеевец [1], она остается единственной из наиболее значимых, которая пока не обнаружена на территории России.

Ферменты расширенного спектра ОХА гидролизуют цефалоспорины III и IV поколений, азтреонам, карбапенемы, устойчивы к ингибиторам (клавулановая кислота и тазобактам) [9]. Наиболее распространены ОХА-48-продуцирующие *K. pneumoniae*. Гидролитическая активность ОХА-48 у клеб-

сиелл в отношении имипенема примерно в 10 раз выше по сравнению с ОХА-лактамазами у ацинетобактерий [44]. Штамм *K. pneumoniae* с β -лактамазой ОХА-48 с высоким уровнем карбапенемазной активности впервые был выявлен в 2001 г. в Турции [41]. В Европе ОХА-48-позитивный мультирезистентный штамм *K. pneumoniae* впервые выделен во Франции. У данного изолята был обнаружен ген БЛРС (*bla*CTX-M-15), что свидетельствует о комбинированном механизме резистентности к карбапенемам [23]. В России крупная вспышка нозокомиальных инфекций, обусловленных ОХА-продуцирующими *K. pneumoniae*, впервые была зарегистрирована в Институте нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко в 2010 — 2011 гг. В 2012 г. появилось сообщение о выделении штамма *K. pneumoniae*, продуцирующего карбапенемазу ОХА-типа, в одном из стационаров Санкт-Петербурга [1]. По данным многоцентрового эпидемиологического исследования, проведенного в 25 стационарах 18 городов России, в 2011 — 2012 гг. продукция карбапенемазу ОХА-48 выявлена у 3,7% нозокомиальных *K. pneumoniae* [13].

КРС- β -лактамаза подавляет активность АМП широкого спектра, таких как пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и азтреонам. Инфекции, вызванные карбапенемрезистентными *K. pneumoniae*, продуцирующими КРС, распространены в ОИТ, представляют большую клиническую проблему и служат причиной высоких показателей смертности [19, 20, 39]. Первая вспышка КРС-продуцентов *K. pneumoniae* произошла в начале XXI в. в США [44]. Позднее продуцентов КРС стали выявлять в Латинской Америке, Израиле, Китае, Греции [7]. Расширению географии КРС-продуцирующих *K. pneumoniae* способствует клональное распространение [32]. Выявление изолятов *K. pneumoniae*, несущих ген *bla*NDM-1 клональных групп продуцентов КРС карбапенемазу (ST258, ST15 и ST273), позволяет предположить множественность случаев заноса этих бактерий на территорию Российской Федерации [1].

Подобно другим металло- β -лактамазам, NDM-1 эффективно гидролизует множество β -лактамов, включая пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы (за исключением азтреонама). Фермент NDM впервые описан у штамма *K. pneumoniae*, выделенного у больного в одной из клиник Нью-Дели (Индия) [47]. В последующем бактерии с NDM обнаружили более, чем в 40 странах всех континентов [29, 46]. В 2017 г. в США зафиксирован первый в мире случай смерти от *K. pneumoniae*, устойчивой к 26 антибиотикам, доступным в США. Исследование показало, что штамм содержит NDM-1.

В канадской провинции Альберта в 2010 — 2013 гг. было выделено 9 культур *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазу, которые оказались нечувствительными к подавляющему большинству АМП. Анализ, проведенный G. Peigano et al. [40], показал, что *K. pneumoniae*, образующие карбапенемазу NDM-1, регулярно заносятся на указанную территорию из Индии.

Эпидемиология продуцентов NDM-1 является предметом пристального внимания ученых всего мира [21, 48]. Причиной этому является быстрое распространение продуцентов NDM-1, в том числе представителей *Enterobacteriaceae*, а также тяжелые последствия инфекций, вызванных этими возбудителями [1, 21, 45, 48].

К карбапенемрезистентности также может привести производство ESBL в сочетании со снижением проницаемости внешней мембраны из-за потери или изменения поринов. Среди карбапенемов наиболее подвержен указанному механизму эртапенем. Так, отсутствие или уменьшение экспрессии двух основных поринов (*OmpK35* и *OmpK36*) у *K. pneumoniae* в сочетании с различными β -лактамазами приводит к ее устойчивости к данному препарату [25].

В последние годы отмечается значительное увеличение частоты встречаемости *K. pneumoniae*, резистентных к АМП других классов [33]. Гены, кодирующие ESBL, обычно располагаются на плазидах вместе с генами, кодирующими резистентность к фторхинолонам, аминогликозидам, триметоприм-сульфаметоксазолу, тетрациклинам, хлорамфениколу. Установлено широкое распространение *K. pneumoniae*, устойчивых к аминогликозидам (амикацину — 30%, нетилмицину — 33%) и фторхинолонам (57%) в ОИТ у детей раннего возраста [6]. В реанимационных и хирургических отделениях количество *K. pneumoniae*, устойчивых к гентамицину и тобрамицину, составляет 50,0 — 75,0%; ципрофлоксацину — 48,3% [9]. По данным Б.Р. Гельфанд [5], имеет место увеличение нечувствительности нозокомиальных штаммов клебсиелл к амикацину с 50,0% в 2007 — 2010 гг. до 88,3% в 2011 — 2014 гг. В европейских странах к фторхинолонам и аминогликозидам резистентны около 20% *K. pneumoniae* из числа выделенных штаммов [15]. В США 16,8% от всех изолированных *K. pneumoniae* резистентны к ципрофлоксацину. Согласно данным корейских исследователей, резистентность этого микроорганизма к ципрофлоксацину за последние годы возросла с 17,7 до 26,5% [30].

Среди новых препаратов, появившихся в клинической практике в последние годы, особое место занимает тигециклин — представитель глицилциклинов, обладающий активностью в отношении резистентных микроорганизмов, в т.ч. продуцирующих ESBL. Эпидемиологическое наблюдение за динамикой антибиотикорезистентности к тигециклину, проводимое в США и странах Европы в 2004 — 2007 гг., показало, что в течение трех лет после внедрения этого препарата в клиническую практику применение тигециклина не сопровождалось распространением резистентности к нему среди бактериальных возбудителей, в т.ч. *K. pneumoniae* [24, 37]. В.А. Агеев [1] показал, что высокорезистентные штаммы *K. pneumoniae*, у которых были выявлены высокие значения минимальной подавляющей концентрации для цефалоспоринов, карбапенемов, аминогликозидов, азтреонама, сохраняли чувствительность к тигециклину. Проводятся исследования по использованию комбинаций тигециклина с другими АМП, в частности, меропенемом, имипенемом, для воздействия на карбапенемрезистентные микроорганизмы [35]. Тем не менее, у некоторых штаммов *K. pneumoniae* может отмечаться приобретенная резистентность к тигециклину, обусловленная гиперпродукцией гена неспецифического активного выведения *AcrAB*, определяющего устойчивость ко многим АМП [9, 42]. По данным разных авторов, в России количество нозокомиальных *K. pneumoniae*, резистентных к тигециклину, существенно варьирует: от 13,0% [9] и 16,1% [13] до 20% [7]. В США к тигециклину резистентны 2,6% (из числа изолированных) штаммов *K. pneumoniae* [43].

Эксперты отмечают, что одним из последних рубежей борьбы с тяжелыми нозокомиальными инфекциями, в т.ч. обусловленными *K. pneumoniae*, является колистин, относящийся к классу полимиксинов, которые ВОЗ относит к критически важным АМП. Тем не менее, несмотря на то, что резистентность к полимиксинам пока остается большой редкостью, в последнее время появились публикации об устойчивости к колистину. Согласно данным о состоянии антибиотикорезистентности, представленных ECDC в 2014 г., в целом по странам Евросоюза резистентность к колистину у *K. pneumoniae* достигает уровня 5% [31]. В 2015 г. в Китае обнаружили ген устойчивости к колистину (*MCR-1*) у нескольких десятков штаммов *Escherichia coli* из образцов, полученных на свиноферме, а также из сырой свинины и курицы в местных магазинах и из образцов, взятых у пациентов медицинских клиник. В последнем случае ген был выявлен и у штамма *K. pneumoniae*, который, по всей вероятности,

получил MCR-1 от кишечной палочки путем горизонтального переноса [36]. В последующем бактерии, имеющие подобный механизм, были обнаружены в Нидерландах, Лаосе, Малайзии, Португалии, Дании, Британии. Как считают эксперты, ген MCR-1 может повторить судьбу других глобально распространенных механизмов устойчивости, таких как NDM-1 [36].

Таким образом, микроорганизмы *K. pneumoniae* входят в группу наиболее распространенных клинически значимых патогенов. В последние годы скорость формирования клембиеллами антибиотикорезистентности к основным группам антимикробных препаратов существенно увеличилась и достигла пандемического масштаба. Ключевым механизмом резистентности является продукция β -лактамаз, группы которых различны в зависимости от региона, страны и стационара. Проблема антибиотикоустойчивости возбудителей инфекционных заболеваний человека, в т. ч. *K. pneumoniae*, продолжает обостряться и является серьезнейшей угрозой для мирового общественного здравоохранения, требует действий во всех государственных секторах [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеевец В.А. Молекулярная характеристика продуцентов карбапенемаз семейства Enterobacteriaceae, выделенных в Санкт-Петербурге. Автореф. дис. канд. биол. наук. Санкт-Петербург, 2016.
2. Анганова Е.В., Духанина А.В., Савилов Е.Д. Бактерии рода *Klebsiella* в этиологической структуре бактериальных ОКИ, оценка их патогенности на уровне фенотипа и генотипа. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011, 6 (61): 62-65.
3. Анганова Е.В. Условно-патогенные энтеробактерии: доминирующие популяции, биологически свойства, медико-экологическая значимость. Автореф. дис. д-ра биол. наук. Иркутск, 2012.
4. Богомолова Н.С., Большаков Л.В., Орешкина Т.Д., Кузнецова С.М. Динамика приобретенной резистентности к бета-лактамам антибиотикам основных грамотрицательных возбудителей инфекций в реконструктивной хирургии в 2004-2008 гг. Антибиотики и химиотерапия. 2010, 1-2: 21-29.
5. Гельфанд Б.Р., Белоцерковский Б.З., Милукова И.А., Проценко Д.Н., Гельфанд Е.Б., Попов Т.В. Значение энтеробактерий в этиологии нозокомиальных инфекций у больных в критических состояниях. Современные возможности антимикробной терапии. Анналы хирургии. 2015, 4: 12-26.
6. Ильина В.Н., Субботовская А.И., В.С. Козырева, Д.С. Сергеевичев, А.Н. Шилова Чувствительность энтеробактерий, выделенных в кардиохирургическом стационаре, к антимикробным препаратам. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2013, 3: 40-44.
7. Крыжановская О. А. Чувствительность к антибиотикам и механизмы устойчивости к карбапенемам *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 2016.
8. Литвинова Т.И. Фармакоэкономические аспекты антибактериальной терапии абсцедирующей пневмонии. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Благовещенск, 2007.
9. Маркелова Н.Н. Полиантибиотикорезистентность некоторых грамотрицательных бактерий и возможности ее преодоления с помощью эфирных масел. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Пенза, 2016.
10. Покудина И.О., Коваленко К.А. Распространенность и вклад в антибиотикоустойчивость β -лактамаз у амбулаторных изолятов *Klebsiella pneumoniae*. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016, 12 (2): 295-298.
11. Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Кречкова О.И., Сухорукова М.В., Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В., Козлов Р.С., Туркутюков В.Б., Нехаева Г.И., Бочкарев Д.Н., Розанова С.М., Боронина Л.Г., Агапова Е.Д., Марусина Н.Е., Мултых И.Г., Тарабан В.К., Здзитовецкий Д.Э., Сарматова Н.И., Тихонов Ю.Г. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофиль-

- ных стационаров России. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2008, 10 (2): 96-117.
12. Рябкова Е.Л. Оптимизация антибиотикотерапии нозокомиальных инфекций, вызванных *Klebsiella pneumoniae*, в стационарах России. Автореф. дис. канд. мед. наук. Смоленск, 2006.
 13. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Мванчик Н.В., Тимохова А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Попов Д.А., Астанина М.А., Жданова О.А., Большева Г.С., Большева Г.С., Новикова Р.И., Валиуллина И.Р., Кокарева Т.С., Частоедова А.Н., Поликарпова С.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования (Марафон) в 2011-2012 гг. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014, 16 (4): 254-265.
 14. Устойчивость к противомикробным препаратам. Информационный бюллетень ВОЗ. 2016. [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/ru/>].
 15. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1400].
 16. Ben-David D., Kordevani R., Keller N. et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012, 18 (1): 54-60.
 17. Boucher H., Talbot G., Benjamin D. et al. 10x20 Progress-Development of new drugs active against gram-negative bacilli: An update from the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2013, 56 (12):1685-1694.
 18. Bradford P.A. Extended-spectrum lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detections of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14 (4): 933-951.
 19. Bradford P.A., Bratu S., Urban C. et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 39: 55-60.
 20. Bratu S., Landman D., Haag R. et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch. Intern. Med.* 2005, 165: 1430-1435.
 21. Chen Y.T., Lin A.C., Kristopher S. et al. Sequence of closely related plasmids encoding bla(NDM-1) in two unrelated *Klebsiella pneumoniae* isolates in Singapore. *PLoS One.* 2012, 7 (11): 48737. doi:10.1371/journal.pone.0048737.
 22. Cornaglia G., Riccio M. L., Mazzariol A. et al. Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe. *Lancet.* 1999, 353 (9156): 899-900.
 23. Cuzon G., Ouanich J., Gondret R. et al. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55(5): 2420-2423.
 24. Dowzicky M.J., Park C.H. Update on antimicrobial susceptibility rates among gram-negative and gram-positive organisms in the United States: results from the tigecycline evaluation and surveillance trial (TEST) 2005 to 2007. *Clin. Ther.* 2008, 30 (11): 2040-2050.
 25. Doumith M., Ellington J. M., Livermore D.M. Molecular mechanisms disrupting porin expression in eripenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, 63 (4): 659-667.
 26. Enfield K. B., Huq N. N., Gosseling M. F. et al. Control of simultaneous outbreaks of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in an intensive care unit using interventions promoted in the Centers for Disease Control and Prevention 2012 carbapenemase-resistant *Enterobacteriaceae* toolkit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2014, 35 (7): 810-817.
 27. Giakkoupi P., Xanthaki A., Kanelopoulou M. et al. VIM-1 Metallo-beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41 (8): 3893-3896.
 28. Gupta N., Limbago B. M., Patel J. B. et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. *Clin. Infect. Dis.* 2011, 53 (1): 60-67.
 29. Johnson A.P., Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase(NDM)-mediated carbapenem resistance. *J. Med. Microbiol.* 2013, 62: 499-513.
 30. Jaruratanasirikul S., Sudsai T. Korean network for study on infectious diseases (KONSID).

- Continuous increase of the antimicrobial resistance among gram-negative pathogens causing bacteremia: a nationwide surveillance study by the Korean network for study on infectious diseases (KONSID). Comparison of the pharmacodynamics of imipenem in patients with ventilator-associated pneumonia following administration by 2 or 0.5 h infusion. *Antimicrob. Chemother.* 2009, 63 (3): 560-563.
31. Kelland K. Last-line drug resistance poses «alarming» European health threat. *Health News.* 2014. [<http://www.reuters.com/article/us-health-antibiotics-europe-idUSKCN-0J10W720141117>].
 32. Lamoureaux T.L., Frase H., Antunes N.T. Antibiotic resistance and substrate profiles of the class A carbapenemase KPC-6. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56 (11): 6006-6008.
 33. Lautenbach E., Fishman N.O., Bilker W.B. et al. Risk factors for of resistance to fluoroquinolones in nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Arch. Intern. Med.* 2002; 162: 2469-2477.
 34. Lin W. H. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014, 33 (9): 1533-1539.
 35. Lim T.-P., Cal Y., Hong Y. et al. In vitro pharmacodynamics of various antibiotics in combination against extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, 59 (5): 2515-2524.
 36. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 2016, 16 (2): 161-168.
 37. Norkov-Lauritsen N., Marchandin H., Dowzicky M. J. Antimicrobial susceptibility of tigecycline and comparators against bacterial isolated collected as part of the TEST study in Europe (2004-2007). *J. Antimicrob. Agents.* 2009, 34 (2): 121-130.
 38. Osterblad M., Kirveskari J., Hakanen A.J. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008–2011). *J. Antimicrob. Chemother.* 2012, 67: 2860-2864.
 39. Papadimitriou-Olivgeris M., Marangos M., Fligou F. et al. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization acquired during intensive care unit stay: the significance of risk factors for its development and its impact on mortality. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* 2013, 77:169-173.
 40. Peirano G., Ahmed-Bentley J., Fuller J. et al. Appearance of carbapenemases-producing gram-negative bacteria in Alberta (CANADA), due to the foreign trip: first 3 years of observation. *JCM.* 2014. [<http://danies.ru/expert/14657/>].
 41. Poirel L., Heritier C., Tolun V. et al. Emergence of oxacillinase mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48 (1): 15-22.
 42. Poole K. Efflux — mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, 56 (1): 20-51.
 43. Sanchez G.V. *Klebsiella pneumoniae* antimicrobial drug resistance, United States, 1998–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19 (1): 133-136.
 44. Tzouvelekis L.S., Markogiannakis A.A., Psychogiou B M. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an Evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology.* 2012, 25 (4): 682-707.
 45. Van der Bij A.K., Pitout J.D. The role of international travel in the worldwide spread of multi-resistant Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012, 67: 2090-2100.
 46. Wailan A.M., Paterson D.L. The spread and acquisition of NDM-1: a multifactorial problem. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2014, 12 (1): 91-115.
 47. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. WHO, 2017. [http://www.univadis.ru/medical-news/183/Nazvany-samye-opasnye-bakterii?utm_source=newsletter+email&utm_medium=email&utm_campaign=medical+updates+-+daily&utm_content=1297516&utm_term=automated_daily].
 48. Yong D., Toleman M. A., Giske C. G. et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2009, 53 (12): 5046-5054.

Поступила 15.04.17

Контактная информация: Анганова Елена Витальевна., д.б.н., 664003, Иркутск, ул. Тимирязева, 16, р. т. (3952) 33-34-25

ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗ: ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, ²Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток

В обзоре обобщены новые данные о механизмах врожденной иммунной защиты при инфекциях, вызываемых патогенными *Yersinia*, что в значительной степени было обусловлено комплексными разработками относительно уникальной пары генетически родственных возбудителей *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*. Проведенные нами ранее исследования выявили морфологический субстрат относительного гранулоцитарного иммунодефицита, обуславливающего характерные патоморфологические особенности псевдотуберкулеза. К настоящему времени получены доказательства того, что патогенные для человека виды *Yersinia* преимущественно инактивируют защитную функцию клеток врожденного иммунитета, что является важной стратегией, с помощью которой эти бактерии избегают элиминации и вызывают заболевание. В ответ на заражение патогенными *Yersinia* фундаментальную роль в первичной иммунной защите и в ограничении первоначального распространения бактерий в организме играют нейтрофилы (ПЯЛ), которые используют несколько механизмов для ликвидации бактерий, таких как фагоцитоз, оксидативный стресс, секреторная дегрануляция, образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, эффероцитоз. Инфицированные ПЯЛ могут действовать как промежуточный хозяин для последующей невоспалительной инфекции макрофагов. Дальнейшее раскрытие вопросов, касающихся первичной антиинфекционной защиты при *Yersinia* инфекциях даст ключ к пониманию иммунопатогенеза эпидемического псевдотуберкулеза (дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки) и в целом иерсиниозов.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 78—90

Ключевые слова: псевдотуберкулез, нерсиниозы, патогенез, клетки врожденного иммунитета, нейтрофилы (ПЯЛ), макрофаги

L.M.Somova¹, N.G.Plekhova^{1,2}, E.I.Drobot¹, I.N.Lyapun¹

PSEUDOTUBERCULOSIS: PATHOGENETIC VALUE OF INNATE IMMUNITY CELLS

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Novel data on mechanisms of innate immunity during infections with pathogenic *Yersinia* are summarized in the review, that was mostly determined by complex developments regarding a unique pair of genetically related causative agents *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*. Our previous studies have revealed a morphological substrate of relative granulocyte immune deficiency that determines characteristic pathomorphologic features of pseudotuberculosis. To date, evidence has been obtained, that pathogenic for human *Yersinia* predominately activate protective function of innate immunity cells that is an important strategy to avoid elimination and cause the disease for the bacteria. Neutrophils (PMNs) play a fundamental role in response to infection by pathogenic *Yersinia* in primary immune response and limit of primary spread of bacteria that use several mechanisms of eradication of bacteria, e.g.: phagocytosis, oxidative stress, secretory degranulation, formation of neutrophil extracellular traps, efferocytosis. Infected PMNs can act as an intermediate host for consequent non-inflammatory infection of macrophages. Further elaboration of questions relating to primary anti-infection protection during *Yersinia* infections gives a key to understanding of immune pathogenesis of epidemic pseudotuberculosis (far Eastern scarlet-like fever) and yersiniosis in general.

Key words: pseudotuberculosis, yersiniosis, pathogenesis, innate immunity cells, PMNs, macrophages

Псевдотуберкулез у человека до середины 1950-х годов встречался как редкое спорадическое заболевание, протекающее в виде острого аппендицита и мезентериального лимфаденита, и был известен лишь в Европейских странах, Северной и Южной Америке, Японии, Индии [37]. Решающую роль в изучении эпидемического псевдотуберкулеза сыграло открытие в 1959 году на Дальнем Востоке России нового клинко-эпидемического проявления этой болезни у человека — дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (ДСЛ) [13].

Особое положение возбудителя болезни, *Yersinia pseudotuberculosis*, как прародителя особо опасной чумной инфекции, *Yersinia pestis* [18], подчеркивает важность исследований по антиинфекционной защите организма. В процессе эволюции *Y. pseudotuberculosis* в *Y. pestis* [18] у последней развились как крайняя вирулентность, так и трансмиссивный способ передачи, уникальный среди семейства *Enterobacteriaceae*. Эти два вида являются генетически почти идентичными [22], но крайне различающимися по степени патогенности. Переход *Y. pseudotuberculosis* в *Y. pestis* сопровождался утратой многих и приобретением нескольких генов, ассоциированных с патогенностью, при этом не следует забывать, что у *Y. pseudotuberculosis* сохранилась способность вызывать у человека геморрагическую пневмонию, напоминающую легочную чуму. В настоящее время *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis* рассматриваются как уникальная пара, которая предоставляет возможность для углубленного изучения и сравнительного анализа патофизиологических процессов, связанных с высокой степенью патогенности.

Псевдотуберкулез по механизму патогенеза относится к общим инфекциям, протекающим с гематогенной и лимфогенной диссеминацией возбудителя и резко выраженным токсико-аллергическим синдромом. К началу 1990-х годов была сформулирована [4] экспериментально обоснованная концепция патоморфогенеза псевдотуберкулеза, впервые показан морфологический субстрат относительного вторичного иммунодефицита, обуславливающего характерные патоморфологические особенности псевдотуберкулеза с образованием гранулем с центральным кариорексисом, последовательной сменой в очаге воспаления реакций гиперчувствительности немедленного и замедленного типов.

Одним из кардинальных проявлений псевдотуберкулеза является патология лимфатического аппарата с наиболее выраженным изменением брыжеечных лимфатических узлов (до 62,4% случаев), что обусловлено алиментарным характером инфицирования. При псевдотуберкулезе возможно развитие не только мезентериального лимфаденита, но и лимфаденитов другой локализации, а также полиаденитов. Не вызывает сомнения, что поражение лимфатического аппарата при псевдотуберкулезе, охарактеризованное первоначально как «абсцедирующий ретикулоцитарный лимфаденит», следует рассматривать с точки зрения иммунологической функции лимфоидной ткани. Септицемия может возникнуть почти при всех формах псевдотуберкулеза [1], и потенциальные возможности развития иерсиниозного сепсиса заложены в основе характера инфекционного процесса и иммунологического ответа организма на специфические антигены. В патоморфологиче-

ской картине псевдотуберкулезного сепсиса у человека, как и у животных, преобладают многочисленные абсцессоподобные и некротические узелки в органах, особенно в печени и селезенке, которые являются морфологическим подтверждением иммунологической недостаточности организма [4]. Реакции иммунной системы при псевдотуберкулезе протекают согласно закономерностям, имеющим общие черты с таковыми при чуме, туляремии, бруцеллезе [12]. Склонность заболевания к обострениям и рецидивирующему течению имеет причинно-следственную связь с нарушениями в системе иммуногенеза [1, 4, 13].

В лимфатическом аппарате как у человека, так и у экспериментальных животных наблюдается сочетание иммуноморфологических реакций и воспалительно-деструктивных изменений [4], характеризующих у 21% перорально зараженных животных состояние иммунодефицита в период с 3 до 21 сут инфекции. При тяжелом течении псевдотуберкулеза с наличием многочисленных некротических очагов и обсеменением бактериями различных органов у 11,2% животных выявлялось резкое разрежение ткани лимфатических узлов и лимфоидных фолликулов слизистой кишечника в виде «сетчатого метаморфоза» и макрофагальная реакция в них. По мнению А.П.Авцына и др. [1], этот признак подтверждает иммунологическую недостаточность. При заражении вирулентным штаммом *Y. pseudotuberculosis* морфологические признаки иммунодефицита у 18,6% животных обнаруживались также в селезенке, что выражалось в отсутствии реактивных изменений в В-зависимых зонах лимфатических фолликулов на фоне некротических очагов и обсеменения органа бактериями, а также в очаговом разрежении и частичной делимфатизации пульпы с оголением ретикулярной стромы.

Действие эндотоксина грамотрицательных бактерий на мембраны нейтрофилов может извращать их метаболизм в направлении снижения оксидазных и бактерицидных свойств. С цитотоксическим действием *Y. pseudotuberculosis* и интралейкоцитарных высокорепактивных метаболитов в значительной мере может быть связана массовая гибель лейкоцитов, продукты распада которых, в свою очередь, воздействуют на внеклеточно расположенные бактерии и вызывают повреждение их. Липополисахарид *Y. pseudotuberculosis* оказывает цитотоксическое влияние на лейкоциты и имеет патогенетическое значение в развитии иммунодефицита при псевдотуберкулезе [6]. Доказана также роль комплекса белков семейства токсинов *Y. pestis* в резистентности к фагоцитозу полиморфноядерными лейкоцитами [Spinner J.L. et al., 2013].

Н.Ф.Тимченко и др. [16] сформулировано представление о спектре токсинов, продуцируемых *Y. pseudotuberculosis*, имеющих важное значение в патогенности вида и опосредовании полиморфизма клинических проявлений эпидемического псевдотуберкулеза (ДСЛ). Одним из этих токсинов является термостабильный летальный токсин (ТсТ), иммуногенный белок молекулярной массой 45 кДа, который продуцируют 82,6% дальневосточных штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Этот токсин вызывает у животных полиорганные поражения с образованием типичных для псевдотуберкулеза гранул с центральным кариорексисом, а также оказывает иммунодепрессивное действие на разные звенья иммунитета. Оно выражается в снижении фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов по отношению как к гомо-, так и к гетерологичным микроорганизмам, влиянии на окислительную и антиокислительную систему иммунокомпетентных клеток, подавлении гуморального ответа

мышей к тимус-зависимому антигену (эритроцитам барана), а также в ингибировании интенсивности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и воздействии на антителообразование.

Таким образом, результаты исследований, полученные к началу 2000-х годов, свидетельствовали о том, что при псевдотуберкулезе эффективная противoinфекционная защита зависит от нормального функционирования единой иммунофагоцитарной системы и определяется чувствительностью организма к различным по вирулентности популяциям возбудителя, массивностью инфекта и повторностью инфицирования, степенью сенсibilизации и иммунологической реактивностью организма [4, 13].

Псевдотуберкулез сопровождается значительными иммунными сдвигами в организме, направленность которых коррелирует с тяжестью течения инфекции. Депрессивное действие вирулентных штаммов *Y. pseudotuberculosis* на иммунную систему экспериментальных животных подтвердили М. Simonet и Р. Berche (1986). Явления иммуносупрессии у больных обычно имели место при тяжелых и рецидивирующих формах инфекции [12], при этом наблюдался дефект как гуморального, так и клеточного звена иммунитета. В организме человека иммунная недостаточность по отношению к возбудителю псевдотуберкулеза в большинстве случаев носит временный характер и не ведет к фатальному исходу.

Факторами, определяющими специфику патологических изменений при псевдотуберкулезе, являются биологические особенности возбудителя, главным образом его устойчивость к фагоцитозу. Способность *Y. pseudotuberculosis* размножаться в фагоцитах, в частности в макрофагах, является одним из факторов вирулентности этих бактерий [17]. Возбудитель псевдотуберкулеза обладает комплексом факторов патогенности, способных подавлять естественную резистентность организма, в том числе высоким потенциалом клеточной и тканевой инвазивности, скоростью реализации которой, по-видимому, играет решающую роль при взаимодействии паразита и хозяина. Именно антифагоцитарная устойчивость обеспечивает «диким» типам *Yersinia* высокую вирулентность при введении внутривенным путем, который допускает немедленное взаимодействие их с фиксированными макрофагами. Устойчивостью к фагоцитозу обладают иерсинии, содержащие плазмиду вирулентности *pYV* с мол. массой 45 МД, что обеспечивается синтезом белков *Yop 1* и *Yop 2* наружной мембраны бактерий [46].

Традиционно считалось, что полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ, нейтрофилы), имеющие бактерицидные системы, первоначально оказывают обезвреживающий эффект, воздействуя на иерсинии секреторными продуктами и частично поглощая микроорганизмы, а макрофаги, содержащие набор гидролаз, поглощают и переваривают эти микроорганизмы. Вплоть до 2000-х годов существовало две точки зрения на роль фагоцитов в развитии резистентности к псевдотуберкулезу. Согласно первой [7], первостепенное значение в обезвреживании *Y. pseudotuberculosis* принадлежит продуктам распада ПЯЛ; согласно второй [12], в очищении организма от возбудителя основное значение имеют макрофаги, входящие в систему мононуклеарных фагоцитов.

С начала 2000-х годов активизировались исследования по врожденной иммунной защите при инфекциях, вызываемых патогенными бактериями рода *Yersinia*, большой интерес к которым предопределен их причислением к группе эмерджентных инфекций, возбудители которых стали рассматриваться как потенциальные агенты биотерроризма [14]. Непредсказуемость и опас-

ность их возникновения требуют всестороннего изучения на основе новых технологий. В настоящее время возбудитель псевдотуберкулеза, именно штаммы конкретной клональной линии *Y. pseudotuberculosis*, вызывающие дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку (эпидемический псевдотуберкулез), имеющие измененный ген кластера вирулентности, привлекают внимание исследователей всего мира в качестве модели для раскрытия молекулярных механизмов взаимодействия патогенных *Yersinia* в системе микроорганизм-хозяин, где первостепенное значение придается клеткам врожденного иммунитета [40].

Нейтрофилы являются наиболее распространенными лейкоцитами, которые быстро рекрутируются из кровотока и арсеналов костного мозга в очаг инфекции, где они служат в качестве исходной клеточной защиты от вторгающихся патогенов [39]. Инфицировавшие организм патогены фагоцитируются ПЯЛ и высвобождают массив микробицидных агентов, способных уничтожить большинство бактерий и грибов. Получено достаточно доказательств того, что патогенные для человека виды *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) преимущественно инактивируют клетки врожденного иммунитета, что является важной стратегией, с помощью которой эти бактерии избегают элиминации и вызывают заболевание [11, 50]. В ответ на заражение иерсиниями фундаментальную роль в первичной иммунной защите играют нейтрофилы, которые используют несколько механизмов для ликвидации бактерий, таких как фагоцитоз, оксидативный стресс, секреторная дегрануляция, образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), эффероцитоз [2, 29, 35]. Иерсинии, в определенной мере ингибируя фагоцитоз и оксидативный стресс в фагоцитах животных и человека, индуцируют высвобождение провоспалительных цитокинов и развитие апоптоза фагоцитирующих клеток [12].

В клетках очага воспаления у животных, инфицированных внутрибрюшинно *Y. pseudotuberculosis*, обнаружено увеличение активности эктоферментов плазмалеммы (АТФ-азы, 5'-нуклеотидазы, лактатдегидрогеназы), что ассоциировалось с изменениями клеточного гликолиза [11]. Усиление анаэробного окисления требуется как механизм адаптационного ответа клеток на воздействие патогенов. Обнаруженное авторами усиление активности ферментов кислородзависимой бактерицидной системы (СДГ, МПО) и внутриклеточной продукции NO связано с клеточной гибелью по типу некроза на 3 день после заражения *Y. pseudotuberculosis*. Повторный рост уровня нитритов в клетках предшествовал появлению апоптотических клеток, которые обнаружены на 5 и 10 дни инфицирования. Исследования на модели *in vitro* показали апоптоз-индуцирующее действие *Y. pseudotuberculosis* на клетки врожденного иммунитета, в большей степени на нейтрофилы, чем макрофаги. Максимальное количество апоптотических нейтрофилов наблюдалось на 7 день после заражения ($45 \pm 3,3\%$). Апоптоз макрофагов обнаружен на 2 день после экспозиции с бактериями ($29 \pm 3\%$). Кроме некроза и апоптоза нейтрофилов при воздействии *Y. pseudotuberculosis* авторами обнаружен 3 тип клеточной гибели – образование внеклеточных ловушек. Эти результаты повышенной метаболической активности нейтрофилов и макрофагов, инфицированных *Y. pseudotuberculosis*, подтвердили важную роль этих клеток в патогенезе данной инфекции.

В опытах *in vivo* при внутрибрюшинном заражении беспородных мышей нами получены данные о вариабельности метаболической активности клеток

очага воспаления (перитонеальный экссудат) при инфицировании разными плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis*. В ответ на заражение более вирулентным типом *Y. pseudotuberculosis*, содержащим две плазмиды pYV и pVM 82, преимущественное значение в обеспечении бактерицидного потенциала фагоцитов имела продукция метаболитов оксида азота, а не активных форм кислорода, по сравнению с менее вирулентным плазмидным типом, содержащим единственную плазмиду pVM 82. Вероятно, это свидетельствует о дополнительном биологическом эффекте, ассоциированном с плазмидой pVM 82, содержащейся только в дальневосточных штаммах возбудителя эпидемического псевдотуберкулеза (ДСЛ), в защитной иммунной реакции организма.

Фагоцитоз бактерий может инициировать апоптоз ПЯЛ [27], что приводит к представлению фосфатидилсерина (PS) на плазматической мембране этих клеток [21]. PS распознается макрофагами, дендритными и другими компетентными клетками (включая эндотелиальные клетки, гладкие мышечные клетки и фибробласты), что приводит к поглощению и клиренсу апоптотических ПЯЛ, называемому эффероцитозом [43, 49]. Эффероцитоз апоптотических ПЯЛ уменьшает повреждение окружающей ткани, предотвращая высвобождение ПЯЛ-микробицидных агентов, увеличивает выработку противовоспалительных молекул и подавляет воспалительные молекулы [43]. Инфекция макрофагов путем эффероцитоза считается «немым» путем для патогенных микроорганизмов, чтобы войти в клетку-мишень хозяина, и, таким образом, была названа моделью «троянского коня» [24], поскольку поглощение апоптотических ПЯЛ ингибирует активацию антимикробных эффекторных функций фагоцитов [30, 43]. Важно отметить, что бактерии рода *Yersinia*, в том числе, *Y. pestis*, фагоцитированные нейтрофилами, в основном обезвреживаются, в то время как бактерии, поглощенные макрофагами, выживают и реплицируются, и что болезнь прогрессирует от бактерий, которые остаются внеклеточными или которые поглощены макрофагами [42].

Инфицированные ПЯЛ могут действовать как промежуточный хозяин для последующей невоспалительной инфекции макрофагов [49]. Авторами показано, что в нейтрофилах поглощенная *Y. pestis* содержится и реплицируется в фагосомах и что репликация в фагосомах не зависит от плазмиды вирулентности pCD1 (аналог плазмиды pYV у *Y. pseudotuberculosis*). Сходные проценты ПЯЛ у животных, инфицированных pCD1⁺ или pCD1⁻ штаммами *Y. pestis*, представляли фосфатидилсерин (PS) на их поверхности в течение 4 — 12 ч инфицирования, распознавались и поглощались макрофагами. Исследования с использованием *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, выращенными при 37°C, показали увеличение числа PS⁺ ПЯЛ человека с течением времени после заражения [31], а мышинные ПЯЛ, выделенные после 1 — 2 дня инфицирования, содержали жизнеспособные *Y. pestis* и были почти все PS⁺ [34].

При укусе инфицированной блохи *Y. pestis* попадает в дерму и приводит к рекрутированию нейтрофилов и макрофагов в очаг воспаления. Доказано выживание и репликация *Y. pestis* в фагосомах нейтрофилов человека с дальнейшим поглощением инфицированных нейтрофилов макрофагами [49]. *Y. pestis* может нарушить нейтрофильный ответ и выжить в месте входных ворот инфекции, диссеминировать и персистировать в организме хозяина. Несмотря на то, что геном *Yersinia* кодирует набор антифагоцитарных факторов вирулентности, был отмечен фагоцитоз *Y. pestis* в помощьью нейтрофилов и макрофагов. J.L. Spinner et al. [49] проанализировали гипотезу, что *Y. pestis*, выра-

щенные при температуре окружающей среды блох-вектора (21°C), могут выживать и реплицироваться внутри нейтрофилов и далее утилизироваться этими клетками в качестве пути, по которому затем происходит заражение макрофагов. В течение 12 часов инфекции у 70% инфицированных *Y. pestis* нейтрофилов присутствовал фосфатидилсерин (PS) на их поверхности. PS⁺ нейтрофилы, содержащие *Y. pestis*, *in vitro* персистировали на протяжении 24 часов инфекции. Поглощение PS⁺ нейтрофилов подавляет активацию анти-микробных эффекторных функций макрофагов, что может способствовать выживанию бактерий чумы в этих клетках. Таким образом, *Y. pestis* может выживать и реплицироваться в пределах ПЯЛ, а зараженные ПЯЛ могут быть маршрутом для невоспалительной инфекции макрофагов.

Учитывая данные о микробицидном значении ядерных гистонов, образующихся при распаде гранулоцитов, на внеклеточные *Y. pseudotuberculosis* [7], можно высказать предположение о том, что при псевдотуберкулезе образование ядерных гистонов имеет отношение к апоптозу ПЯЛ и является одним из проявлений эффероцитоза при взаимодействии возбудителя с клетками врожденного иммунитета. В этой связи, вполне обосновано, что распад клеток с образованием детрита, содержащего ядерные гистоны ПЯЛ, происходит преимущественно вследствие апоптоза, а не некроза клеток, что обуславливает развитие в органах гранулем с так называемым «центральным кариорексисом», типичных для псевдотуберкулеза [1, 15].

Особенности функционального состояния нейтрофилов при псевдотуберкулезе, характеризующиеся несоответствием напряженности иитралейкоцитарных бактерицидных систем и низкой переваривающей способности этих клеток [10], по В.Н.Галанкину и др. [3] означают относительный гранулоцитарный иммунодефицит. При этом нарушается нормальное функционирование ПЯЛ, следствием чего является микробизм и формирование в ткани органов абсцессоподобных очагов. В итоге, при псевдотуберкулезе в очагах воспаления формируется особый нефагоцитарный тип местной резистентности, при котором эффективное бактерицидное действие на возбудителя оказывает фракция ядерного гистона НЗ распадающихся лейкоцитов [7].

Анализ собственных и литературных данных позволил сделать заключение о нарушениях во всех звеньях иммунофагоцитарной системы при псевдотуберкулезе с развитием в части случаев вторичного иммунодефицита, в основе которого лежат специфическое повреждение лимфоидной ткани и дефектность функционирования клеток врожденного иммунитета за счет эффектов плазмид-ассоциированного фактора патогенности *Y. pseudotuberculosis*, связанного, скорее всего, с их цитотоксичностью, угнетающей защитные механизмы хозяина [Wilson M.E., 1985]. С развитием относительного иммунодефицита тесно связана склонность болезни к обострениям и рецидивам, являющимся одним из важных звеньев патогенеза псевдотуберкулеза. Участие ПЯЛ в защите организма должно рассматриваться не только с точки зрения неспецифической резистентности, но и участия их в специфическом иммунном ответе и в реализации иммунопатологических механизмов [9].

Патогенные виды *Yersinia* ориентированы главным образом на ПЯЛ, а также на дендритные клетки и макрофаги путем передачи наружных белков *Yersinia* (*Yops*) через систему секреции III типа (Т3SS) [19, 23, 28]. При проникновении в ПЯЛ эффекторы *Yop* могут ингибировать фагоцитоз, продукцию

активных форм кислорода и образование внеклеточных нейтрофильных ловушек [25, 45, 47].

Важное значение для раскрытия роли *YopS* белков имеют опыты, проведенные с использованием аттенуированных мутантов *Y. pseudotuberculosis*. Антифагоцитоз, скорее всего, является эссенциальным механизмом вирулентности *Yersinia*, и экспериментальные исследования последних лет на мышах подтвердили эту гипотезу, поскольку *yopH* и *yopE* одиночные мутанты элиминируются на ранних стадиях инфицирования [32, 45], причем клиренс *yopH* мутанта обычно происходит на уровне пейеровых бляшек в кишечнике, и *yopE* мутанта в мезентериальные лимфатических узлах. Показано [50], что бактерии *Y. pseudotuberculosis* «дикого типа» на 1 день после заражения взаимодействовали главным образом с дендритными клетками, но не с ПЯЛ, в то время как авирулентные *yopH* и *yopE* мутанты взаимодействовали с ПЯЛ, а также с дендритными клетками.

Для уточнения значимости ПЯЛ на ранних стадиях инфекции, исследователи [50] истощили мышинные ПЯЛ с помощью анти-*LybG* антител, после чего можно было увидеть более эффективную первоначальную колонизацию штамма «дикого типа», а также *yopH*, *yopE* и *yopK* мутантов на 1 день после орального инфицирования. Диссеминация *yopH*, *yopE* и *yopK* мутантов в кишечные отделы и в мезентериальные лимфатические узлы была быстрее у ПЯЛ-истощенных мышей, чем у неистощенных, что подчеркивало важность эффективного нацеливания ПЯЛ посредством внешних белков *Y. pseudotuberculosis* (*YopS*). В итоге, избежание *YopH*, *YopE* и *YopK* мутантов от взаимодействия с ПЯЛ является ключевой особенностью патогенных видов *Yersinia*, что способствует их колонизации и эффективному распространению в инфицированном организме, приводящему к развитию генерализованной инфекции.

При *Y. pseudotuberculosis* инфекции у неистощенных мышей зрелые ПЯЛ были в основном представлены рекрутированными из крови воспалительными клетками [50]. Для дальнейшего исследования увеличения доли макрофагов в инфицированных тканях, пейеровы бляшки и лимфоидные фолликулы слепой кишки от неинфицированных и инфицированных «диким типом» иерсиний мышей, собранные на 3 день после заражения, были окрашены для детекции воспалительных макрофагов путем двойной иммуофлюоресценции с анти-*LybC* и анти-*F4/80*. Полученные данные свидетельствовали о том, что в отсутствие зрелых ПЯЛ увеличивается доля моноцитов в крови, что также приводит к повышению уровня воспалительных макрофагов в инфицированных тканях. Следовательно, в отсутствие зрелых ПЯЛ ($Gr-1^{high} F4/80^{-}$) незрелые ПЯЛ ($Gr-1^{low} F4/80^{-}$) компенсируют их потерю за счет увеличения в крови и также рекрутирования в инфицированные ткани при инфекции. Эти исследования показали значение резистентности *Y. pseudotuberculosis* к ПЯЛ, а также то, что различные *Yop* эффекторы могут внести совместный вклад в экстенсивную способность этого патогена обойти эти бактериальные элиминаторы.

Таким образом, ПЯЛ, которые накапливаются в инфицированных тканях при заражении, играют важную роль в защите от кишечной *Yersinia* [23, 33, 36]. Эти клетки врожденного иммунитета играют фундаментальную роль в ограничении первоначального распространения бактерий в кишечной ткани, и *Y. pseudotuberculosis* демонстрирует способность надежного избегания противомикробного действия этих в норме очень эффективных иммунных

клеток. Показано, что инфекция у ПЯЛ-истощенных мышей, вызванная «диким типом» *Y. pseudotuberculosis*, была лишь легкой при отсутствии ПЯЛ, в то время как уорН, уорЕ и уорК мутанты с аттенуированной вирулентностью имели явно более высокий инфекционный потенциал при отсутствии ПЯЛ [Thorslund S.E. et al., 2013]. Примечательно, что уорН мутант был найден в мезентериальных лимфатических узлах у ПЯЛ-истощенных мышей, даже если этот мутант, как известно, ограничивается пейеровыми бляшками и не способен достичь более глубоких, внекишечных органов [33]. Авторы обнаружили, что более быстрая диссеминация в мезентериальные лимфатические узлы также отражалась в симптомах болезни ПЯЛ-истощенных мышей, инфицированных уорЕ или уорК мутантами, которые показали признаки болезни раньше, чем у неистощенных мышей.

В совокупности, данные литературы предполагают, что все эти Yop эффекторы вместе вносят вклад в ПЯЛ-резистентный фенотип видов *Yersinia* и важны для эффективного выхода бактерий «дикого типа» из ПЯЛ. Поскольку патогенные виды *Yersinia* инактивируют защитную функцию клеток врожденного иммунитета, предполагается наличие эффективного пути для этих бактерий, чтобы избежать элиминацию и вызвать болезнь. Показано, что в течение начальных стадий оральной инфекции у мышей авирулентные уорН и уорЕ мутанты *Y. pseudotuberculosis* по-разному взаимодействуют с клетками врожденного иммунитета по сравнению с бактериями «дикого типа» [50]. В то время, как бактерии «дикого типа» главным образом взаимодействуют с дендритными клетками в тонком кишечнике, мутанты также взаимосвязаны с нейтрофилами. Истощение нейтрофилов с помощью лечения с анти-Ly6G увеличивало вирулентность «дикого типа» уорН и уорЕ мутантов. Авторы сделали заключение, что нейтрофилы играют важную роль в иммунной защите против *Y. pseudotuberculosis* и несут ответственность за ограничение способности уорН и уорЕ мутантов вызывать системное заболевание. Аттенуированные мутанты могут диссеминировать за пределы кишечника и достичь мезентериальных лимфоузлов в отсутствие ПЯЛ, что подтверждает патогенетическое значение этих иммунных клеток в ограничении бактериальной диссеминации и генерализации псевдотуберкулезной инфекции.

У *Yersinia* развились сложные стратегии избегания фагоцитоза, включая апоптоз, расстройство передачи внутриклеточного сигнала и нейтрализацию провоспалительных ответов у хозяина путем использования арсенала секретруемых Yops белков. Кроме манипулирования ответом хозяина с Yop белками, *Yersinia*, как известно, используют несколько других параллельных механизмов, в частности сильный липополисахаридный ответ, чтобы ослабить иммунный ответ хозяина и вызвать заболевание [38]. Для индукции раннего противовоспалительного ответа *Yersinia* модулируют несколькими путями защиты хозяина. Одним из основных активаторов воспаления является семейство STAT белков (signal transducers and activators of transcription – сигнальные преобразователи и активаторы транскрипции). STAT-1 имеет эссенциальную функцию в защите против вирусных и бактериальных патогенов. Удаление STAT-1 у мышей приводит к быстрой смерти от тяжелых инфекций [44]. STAT-1 и STAT-2 активация с помощью IFN индуцирует транскрипцию 100 IFN-стимулирующих генов (ISGs) [44] и ведет к продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов. Интерферон-гамма может также взаимодействовать со STAT-1 в активированных макрофагах, и это ведет к стимуляции индуцибельной нитрооксидсинтазы (iNOS) и NADPH оксидазы, которая

способствует киллингу внутриклеточных патогенов [48]. При этих путях интерферон-гамма играет протективную роль во время бактериальных инфекций. Продукция интерферона активируется после фосфорилирования 1 — 2 основных факторов транскрипции (interferon response factor 3 и NFκB). Белок YopJ *Y. pseudotuberculosis* необходим для ингибирования продукции TNF-α и подавления MAP-киназы p38 в макрофагах [41].

В очаге воспаления имеется несколько механизмов кооперации нейтрофилов и макрофагов: гранулоциты взаимодействуют с клеточными опсонинами, помогают поглощению бактерий макрофагами, частично или полностью обезвреживают бактерии, активируют макрофаги и последующий процесс фагоцитоза макрофагами [5, 8]. Высвобождение преформированных биологически активных веществ составляет важнейший этап реализации эффекторного потенциала зрелого нейтрофила, который осуществляется в процессе фаго- и пиноцитоза, а также дегрануляции с выделением этих веществ во внеклеточное пространство. Имеются данные о наличии в очагах воспаления обратной связи между поли- и мононуклеарами. В системе *in vitro* установлено, что супернатанты интактных и активированных бактериями *Y. pseudotuberculosis* нейтрофилов повышают эффективность фагоцитарной функции макрофагов и их пролиферативную активность [10], что является одним из механизмов, лежащих в основе формирования резистивной клеточной резистентности.

Внутренние регуляторные механизмы, контролирующие активность клеток врожденного иммунитета, еще недостаточно определены. Недавно идентифицирована ранее не известная функция IL-17A как внутреннего регулятора координирования антимикробной активности нейтрофилов и макрофагов, чтобы обеспечить защиту против иерсиниозной инфекции [20]. Авторы обнаружили, что таким путем сигнальный фактор IL-17 может обеспечивать защиту против раннего воспаления при легочной чуме, и уровень IL-17 заметно увеличивался при инициации инфекции, тогда как отмена IL-17A значительно усугубляла тяжесть инфекции. Это указывает, что IL-17A и INF-гамма критически вовлекаются в содействие врожденным иммунным клеткам при формировании антиинфекционного иммунитета.

Исследования F. Guinet et al. [26] показали, что инициальные проявления заболевания в течение первых 24 часов протекали аналогично при обеих *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis* инфекциях, указывая, что экспрессия уникальной патогенности *Y. pestis* откладывается до более поздних стадий инфекционного процесса, когда значительные различия гистологических характеристик были ассоциированы с дренажным (региональным к месту заражения) лимфатическим узлом (ДЛУ). По данным мультикорреспондентского анализа (МСА) авторы определили наиболее дифференциальные тканевые поражения, а именно: *Y. pseudotuberculosis* инфекция сопровождалась организованной реакцией клеток врожденного иммунитета с образованием абсцессоподобных инфильтратов из полиморфноядерных клеток, сдерживающих инфекцию, в то время как *Y. pestis* инфицированный ДЛУ демонстрировал инфильтративный характер инфекции, поврежденную плотность ткани и сосудистые скопления с инвазией ткани свободными бактериями. Таким образом, исключительная вирулентность вида *Y. pestis* связывается не с его приобретенным интрадермальным порталом проникновения в организм хозяина через укусы блохи, а с отчетливой массивной диффузной инфильтрацией ДЛУ без эффективной абсцессоподобной защиты за счет организованной реакции ПЯЛ.

Таким образом, в последние 15 лет получены новые данные о клеточных и молекулярных механизмах врожденной иммунной защиты при инфекциях, вызываемых патогенными *Yersinia*, что в значительной степени было обусловлено комплексными разработками относительно уникальной пары генетически родственных возбудителей *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*. Проведенные нами ранее исследования выявили морфологический субстрат относительно гранулоцитарного иммунодефицита, обуславливающего характерные патоморфологические особенности псевдотуберкулеза. К настоящему времени получены доказательства того, что патогенные для человека виды *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) преимущественно инактивируют защитную функцию клеток врожденного иммунитета (нейтрофилов, моноцитов/макрофагов), что является важной стратегией, с помощью которой эти бактерии избегают элиминации и вызывают заболевание. Высказано предположение, что Yop эффекторы вносят вклад в ПЯЛ-резистентный фенотип *Yersinia* и важны для эффективного выхода бактерий из этих клеток. В ответ на заражение патогенными *Yersinia* фундаментальную роль в первичной иммунной защите и в ограничении первоначального распространения бактерий в организме играют нейтрофилы (ПЯЛ), которые используют несколько механизмов для ликвидации бактерий, таких как фагоцитоз, оксидативный стресс, секреторная дегрануляция, образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, эффероцитоз. Важно отметить, что *Yersinia*, включая *Y. pestis*, поглощенные макрофагами, способны выживать и реплицироваться и что болезнь прогрессирует от бактерий, которые остаются внеклеточными или которые поглощены макрофагами. Инфицированные ПЯЛ могут действовать как промежуточный хозяин для последующей невоспалительной инфекции макрофагов. Дальнейшее раскрытие вопросов, касающихся первичной антиинфекционной защиты при *Yersinia* инфекциях даст ключ к пониманию иммунопатогенеза эпидемического псевдотуберкулеза и в целом иерсиниозов, а также расширит представления о нефагоцитарном типе резорбтивной клеточной резистентности при этих инфекциях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авцын А.П., Исачкова Л.М., Жаворонков А.А. и др. Основные черты патогенеза псевдотуберкулеза. Архив патологии. 1990, 5: 3-7.
2. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Матосова Е.В. Антимикробная стратегия нейтрофилов при инфекционной патологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2016, 61 (12): 825-833.
3. Галанкин В.Н., Токмакова А.М., Боцманов К.В. О структурных основах снижения неспецифической антибактериальной резистентности организма, связанной с функционированием системы нейтрофильных лейкоцитов. Архив патологии. 1989, 3: 49-54.
4. Исачкова Л.М., Жаворонков А.А., Антоненко Ф.Ф. Патология псевдотуберкулеза. Владивосток: Дальнаука, 1994.
5. Крашенникова Е.А. Влияние продуктов, выделяемых нейтрофилами, на функции клеток системы мононуклеарных фагоцитов: Автореф. дис. канд. биол. наук. Л., 1987.
6. Кузнецова Т.А., Ермак И.М., Горшкова Р.П. О некоторых аспектах биологического действия липополисахарида бактерий псевдотуберкулеза. Сборник «Иерсиниозы», Новосибирск. 1983, с. 43-50.
7. Мазинг Ю.А. Гистологическая и цитохимическая характеристика экспериментальной и спонтанной псевдотуберкулезной инфекции: Дис. канд. мед. наук. Л., 1982.
8. Мазинг Ю.А. Морфофункциональные основы антимикробной активности фагоцитов: Автореф. дис. д-ра мед. наук. М., 1995.
9. Пауков В.С., Кауфман О.Я. Структурно-функциональная характеристика лейкоцитов

- и их роль в формировании воспалительных и иммунных процессов. Архив патологии. 1983, 5: 3-13.
10. Плехова Н.Г. Функциональное состояние полиморфноядерных лейкоцитов и их влияние на функции макрофагов при некоторых бактериальных инфекциях: Автореф. дис канд. биол. наук. Владивосток, 1996.
 11. Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И. Метаболизм клеток врожденного иммунитета при бактериальных инфекциях. Биомедицинская химия. 2015, 61 (1): 105-114.
 12. Сомов Г.П., Беседнова Н.Н., Дзадзиева М.Ф., Тимченко Н.Ф. Иммунология псевдотуберкулеза. Новосибирск, Наука, 1985.
 13. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М., Медицина, 2001.
 14. Сомова Л.М., Андриков Б.Г., Плехова Н.Г. Проблема иерсиниозов в современном мире. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015, 12 (4): 661-667.
 15. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Дробот Е.И. Новые аспекты патологии псевдотуберкулеза. Архив патологии. 2012, 74 (3): 60-64.
 16. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток, Приморский полиграфкомбинат, 2004.
 17. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002, 4 (3): 248-266.
 18. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999, 96: 14043-14048.
 19. Autenrieth S.E., Linzer T.R., Hiller C. et al. Immune evasion by *Yersinia enterocolitica*: differential targeting of dendritic cell subpopulations in vivo. PLoS Pathog. 2010, 6: e1001212.
 20. Bi Y., Zhou J., Yang H. et al. IL-17A produced by neutrophils protects against pneumonic plague through orchestrating IFN-gamma-activated macrophage programming. J. Immunol. 2014, 192 (2): 704-713.
 21. Bratton D.L., Henson P.M. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. Trends Immunol. 2011, 32: 350-357.
 22. Chain P.S., Carnial E., Larimer F.W. et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101: 13826-13831.
 23. Durand E.A., Maldonado-Arocho F.J., Castillo C. et al. The presence of professional phagocytes dictates the number of host cells targeted for Yop translocation during infection. Cell. Microbiol. 2010, 12: 1064-1082.
 24. John B., Hunter C.A. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan horses? Science. 2008, 321: 917-918.
 25. Grosdent N., Maridonneau-Parini I., Sory M.P., Cornelis G.R. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. Infect. Immun. 2002, 70: 4165-4176.
 26. Guinet F., Ave P., Jones L. et al. Defective innate cell response and lymph node infiltration specify *Yersinia pestis* infection. PLoS ONE, 2008, 3 (2): e1688.
 27. Kobayashi S.D., Braughton, K.R., Whitney A.R. et al. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003, 100: 10948-10953.
 28. Köberle M., Klein-Gunther A., Schutz M. et al. *Yersinia enterocolitica* targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model. PLoS Pathog. 2009, 5: e1000551.
 29. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat. Rev. Immunol. 2013, 13: 159-175.
 30. Laskay T., van Zandbergen G., Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. Immunobiology. 2008, 213: 183-191.
 31. Laws T.R., Davey M.S., Green C. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* is resistant to killing by human neutrophils. Microbes Infect. 2011, 13: 607-611.

32. Logsdon L.K., Mecsas J. Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. *Infect. Immun.* 2003, 71: 4595-4607.
33. Logsdon L.K., Mecsas J. The proinflammatory response induced by wild-type *Yersinia pseudotuberculosis* infection inhibits survival of yop mutants in the gastrointestinal tract and Peyer's patches. *Infect. Immun.* 2006, 74: 1516-1527.
34. Lukaszewski R.A., Kenny D.J., Taylor R. et al. Pathogenesis of *Yersinia pestis* infection in BALB/c mice: effects on host macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.* 2005, 73: 7142-7150.
35. Martin C.J., Booty M.G., Rosebrock T.R. et al. Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell Host Microbe.* 2012, 12: 289-300.
36. McCoy M.W., Marre M.L., Lesser C.F., Mecsas J. The C-terminal tail of *Yersinia pseudotuberculosis* YopM is critical for interacting with RSK1 and for virulence. *Infect. Immun.* 2010, 78: 2584-2598.
37. Mollaret H. Le laboratoire d'hygiène et de diagnostic d'infection humaine à bacilles de Malassez et Vignal. *Gaset. Med. Paris.* 1965.
38. Montminy S.W., Khan N., McGrath S. et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat. Immunol.* 2006, 7: 1066-1073.
39. Nauseef W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol. Rev.* 2007, 219: 88-102.
40. Norenberg D., Wieser A., Magiuseppe G. et al. Molecular analysis of a novel Toll/interleukin-1 (TIR)-domain containing virulence protein of *Y. pseudotuberculosis* among Far East scarlet-like fever serotype 1 strains. *Intern. J. Med. Microbiol.* 2013, 303: 583-594.
41. Palmer L.E., Hobbie S., Galan J.E., Bliska J.B. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF- α production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol. Microbiol.* 1998, 27: 953-965.
42. Pujol C., Bliska J.B. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin. Immunol.* 2005, 114: 216-226.
43. Ravichandran K.S., Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* 2007, 7: 964-974.
44. Rayamajhi M., Humann J., Kearney S. et al. Antagonistic crosstalk between type I and II interferons and increased host susceptibility to bacterial infections. *Virulence.* 2010, 1: 418-422.
45. Rolán H.G., Durand E.A., Mecsas J. Identifying *Yersinia* YopH targeted signal transduction pathways that impair neutrophil responses during in vivo murine infection. *Cell Host Microbe.* 2013, 14: 306-317.
46. Rosqvist R., Bolin I., Wolf-Watz H. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis* a virulence plasmid-encoded ability involving the YOP 2 protein. *Infect. Immunol.* 1988, 8 (56): 2139-2143.
47. Rosqvist R., Forsberg A., Rimpilainen M. et al. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* 1990, 4: 657-667.
48. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004, 75: 163-189.
49. Spinner J.L., Winfree S., Shannon J.G. et al. *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophils phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages. *J. Leukocyte Biology.* March 2014, 95.
50. Westermark L., Fahgren A., Fallman M. *Yersinia pseudotuberculosis* efficiently escapes polymorphonuclear neutrophils during early infection. *Infect. Immun.* 2014, 82 (3): 1181-1191.

Поступила 15.04.17

Контактная информация: Сомова Лариса Михайловна, д.м.н., проф.,
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1, р.т. (423)244-14-38

ЗАНОСЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА НЕЭНДЕМИЧНЫЕ ТЕРРИТОРИИ

48 Центральный НИИ МО РФ, Сергиев Посад

Представлены эпидданные, проанализированы возможные причины и оценена опасность наблюдаемого в последнее время расширения существующих ареалов вирусных инфекций, в том числе, и при заносах возбудителей на неэндемичные территории. В настоящее время наблюдается существенное расширение ареалов некоторых возбудителей зооантропонозов, в частности филовируса Эбола, и арбовирусов — лихорадка долины Рифт, Зика, чикунгунья. При расширении границ эпидемических очагов на новые для возбудителя территории может происходить утяжеление клинических проявлений заболевания и возрастание летальности среди аборигенного населения. Особо опасные вирусные экзотические геморрагические лихорадки (лихорадка Эбола, Марбург, Ласса) при заносе с больными людьми в отдельных случаях могут вызвать заражение контактных лиц. Лихорадка долины Рифт — один из наиболее агрессивных арбовирусов, в случае заноса может сформировать устойчивые эпидемические очаги. Заносы лихорадки Зика на территорию РФ существенного эпидемиологического значения не представляют. К эпидемиологическим факторам, существенным для формирования новых ареалов возбудителей, можно отнести наличие перmissive кандидатов в естественные хозяева и переносчики, климатические условия. Существенна роль социально-экономических факторов. Среди экологических факторов важна роль некоторых микроэлементов, в том числе селена, участвующего в регуляции гомеостаза и при недостатке которого происходят мутации вирусов в сторону повышения вирулентности. В регионах Африки и Азии с почвами, бедными селеном, впервые появились возбудители или высоковирулентные штаммы гриппа А, ТОРС, SIV и Эбола, а заносы на эти и аналогичные территории приводили к возрастанию вирулентности вирусов.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 91—100

Ключевые слова: биологическая опасность, экзотические инфекции, расширение ареалов, занос, эпидемические очаги, вирулентность, селен

V.A.Markin, D.E.Chifanov

TRANSFER OF DANGEROUS VIRAL INFECTIONS IN THE NON-ENDEMIC AREA

48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia

Epidemic data are presented, possible causes analyzed and the dangers of observed in recent years expansion of existing areas of viral infections, including the introduction of the agent to the non-endemic area, evaluated. At the present time there is a significant expansion of the ranges of some zoonoantronooses pathogens, particular filovirus Ebola and arboviruses — Rift Valley fever, Zika, Chikungunya. When extending the boundaries of epidemic foci in the new territory for the pathogen, can occur aggravating of clinical manifestations of the disease and increase mortality among the indigenous population. Extremely hazardous exotic viral hemorrhagic fever (Ebola, Marburg, Lassa) when transfer with sick people in some cases, can cause contamination of the contact persons. Rift Valley fever — one of the most aggressive arboviruses, in the case of importation can form stable epidemic foci. Transfer of Zika fever in the territory of the Russian Federation has not represent substantial epidemiological value. Epidemiological factors, essential for the formation of new areas of pathogens may include the presence of permissive candidates in natural hosts and vectors, the climatic conditions. Role of socio-economic factors is significant. Among of environmental factors is the important role of some trace elements, including selenium, involved

in the regulation of homeostasis and which faults occur in the upward virulence virus mutating. In parts of Africa and Asia, with soils poor in selenium, were first introduced pathogens or highly virulent strains of influenza A, SARS, Ebola and of SIV, and drifts on these and similar areas have led to an increase in the virulence of viruses.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 91—100

Key words: biohazard, exotic infections, expansion areas, transfer, epidemic foci, virulence, selenium

Расширение ареалов вирусных инфекций, особенно геморрагических лихорадок, несет постоянную угрозу эпидемическому и санитарному благополучию даже экономически развитых стран и рассматривается ныне как важнейший фактор биоопасности [11], что существенным образом связано с отсутствием эффективных средств профилактики и лечения вызываемых ими заболеваний.

На территории Российской Федерации до последнего времени не было зарегистрировано возникновения очагов или появления новых для науки особо опасных вирусных инфекций. В то же время, регистрировали заносы вирусозов-возбудителей экзотических заболеваний, к примеру, тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС). В период с 2012 по 2015 гг. в РФ было зарегистрировано более 800 завозных случаев инфекционных заболеваний разной этиологии, в том числе 427 случаев лихорадки денге, 340 случаев тропической малярии, 13 случаев лихорадки Западного Нила (ЛЗН) [14 — 31.12.2015]. Некоторые экзотические особо опасные вирусные инфекции в последнее время значительно расширили свои ареалы [7]. Эпидемический потенциал, изменчивость и непредсказуемость ряда возбудителей, появление новых инфекций способны привести к их глобальному распространению, что требует постоянного контроля биологической безопасности [6, 11].

Цель настоящей работы — анализ возможных причин и оценка опасности наблюдаемого в последнее время расширения границ существующих ареалов вирусных инфекций, в том числе и при заносах возбудителей на неэндемичные территории.

Занос возбудителей может происходить постепенно с инфицированными людьми или животными, комарами, переносимыми воздушными массами, птицами, контаминированными продуктами и т.д. на близлежащие к эпиочагу новые территории. Возможен и внезапный занос возбудителя с этими же источниками инфекции транспортом на неэндемичные территории, отстоящие от первичного эпиочага на большом удалении, что при благоприятных для возбудителя условиях может привести к формированию очага и расширит ареал. Так, с комарами-переносчиками и, вероятно, зараженным мясом в Египет в 1976 г. была занесена лихорадка долины Рифт (ЛДР). С инфицированными людьми в Канаду в 2003 г. из Гонконга был занесен ТОРС, заболели 375 человек. Естественно мигрирующие дикие кабаны из Армении и Грузии неоднократно заносили в Россию африканскую чуму свиней. ЛЗН с перелетными птицами попала в США, а оттуда — в Латинскую Америку и южную Канаду. С летучими белками, вывезенными из Африки, в США в 2002 г. была занесена оспа обезьян, а с экзотическими птицами в 2007 г. — лихорадка КУ в Голландию, где за три года переболели около 3500 человек. Весьма трагично протекала эпидемия холеры на Гаити, куда она была занесена миротворцами ООН, прибывшими для оказания помощи от землетрясения [19].

При заносах возбудителей на неэндемичные территории в случае наличия перmissive хозяев, переносчиков и других адекватных, в том числе климатических условий, могут сформироваться и сохраниться активные эпиочаги. Классическим историческим примером этому может служить занос в Южную Америку в средние века желтой лихорадки из Африки с больными людьми.

Общее количество заносных случаев вирусных экзотических особо опасных заболеваний гораздо меньше, чем вспышек банальных вирусных инфекций, но они ставят перед службами общественного здравоохранения чрезвычайно сложные проблемы, обусловленные высоким эпидемическим потенциалом их возбудителей, весьма высокой летальностью, особыми трудностями диагностики (во многих случаях для идентификации возбудителей требовалось до нескольких месяцев, когда вспышки уже затухали), лечения и предупреждения, а также в связи с большой эмоциональной и политической окраской связанных с ними ситуаций.

Анализ динамики эпидемиологической ситуации в мире позволил выявить ряд особо опасных возбудителей вирусной природы, которые в последние годы резко расширили ареалы, одновременно эволюционируя в сторону повышения патогенности для человека [7]. Лидирующие положения среди них в последнее время стали занимать возбудители лихорадок Эбола, ЛДР и Зика. Рассмотрим, прежде всего, на примере этих и некоторых других заболеваний опасность и возможные причины наблюдаемого в последнее время расширения границ существующих эпидочагов вирусных инфекций.

Лихорадку Эбола считают в настоящее время одной из агрессивнейших инфекций, а ее возбудитель — наиболее вирулентным для человека. Отсутствие до настоящего времени эффективных средств профилактики и лечения заболевания усиливает его актуальность для биологической безопасности. Впервые данный возбудитель был выявлен на африканском континенте в 1976 г. в Северном Заире (летальность 88%) и в Южном Судане (летальность 53%). Из сформировавшихся заирского и суданского эпидочагов инфекция начала постепенно распространяться по африканскому континенту, образуя новые очаги. Всего в Экваториальной Африке в период до 2012 г. было зарегистрировано более 35 вспышек и отдельных случаев инфицирования человека вирусом Эбола: в Заире/Демократической Республике Конго (1976, 1977, 1995, 2007, 2008 — 2009, 2011, 2012 гг.), Судане (1976, 1979, 2004 гг.), Габоне (1994, 1996 — 1997, 2001 — 2002 гг.), Республике Конго (2001 — 2002, 2002 — 2003 гг.), Кот-д'Ивуаре (1994 г.) и Уганде (2000 — 2001, 2007 — 2008, 2011, 2012 гг.). После 2000 г. время между вспышками начало сокращаться, а уровень заболеваемости возрос. Общее количество больных за этот период составило 2433 человек, из которых 1581 погиб (общая летальность для возбудителя в целом — 65 %) [19].

За пределами Африки выявлены еще три ареала вируса Эбола — в Центральной Америке, Юго-Восточной Азии (Филиппины, Индонезия, Китай, Пакистан) и Европе (Испания), где циркулируют апатогенные для человека штаммы возбудителя.

В 1989 — 1992 гг. были выявлены случаи заносов апатогенного для человека штамма Reston вируса Эбола в Италию и США с Филиппин с инфицированными обезьянами. В 2008 г. в Китае штамм Reston вызвал эпизоотию среди свиней. Последующее серологическое обследование выявило в регионе антитела к возбудителю у 66,7 — 74% животных данного вида и у 6 человек из 141 обследованных (4,3%). Считают, что заражение животных в Китае произошло в результате контакта с летучими мышами-крыланами, у которых также были обнаружены антитела к вирусу Эбола. На Филиппинах и в Индонезии также выявлена иммунная прослойка у людей к вирусу Эбола (6% из обследованных) в семьях, где содержали домашних обезьян [31, 46].

В 1977 г. вирус Эбола был занесен из Африки тяжело больным человеком в Великобританию, а в 1994 г. — в Швейцарию, но от больных не было заражений у многочисленных контактов в аэропортах и госпиталях [28]. В 1996 г. был случай заноса вируса Эбола из Габона в ЮАР с больным человеком. Медсестра, ухаживавшая за лихорадящим, заразилась и погибла, дальнейшего распространения инфекции не было [44].

В 2013 г. в Западной Африке началась крупнейшая эпидемия лихорадки Эбола, объявленная ВОЗ чрезвычайной ситуацией, имеющей международное значение

в области общественного здравоохранения. Заболевание возникло в Гвинее, и больными людьми было занесено в близлежащие Либерию и Сьерра-Леоне. Летальность на пике эпидемии составила 72% [14 — 03.12.14], что, вероятно, связано с состоянием здоровья населения — в регионе большое количество инфицированных ВИЧ, туберкулезом, малярией и многими другими хроническими инфекциями. В Западной Африке у населения ранее выявляли антитела к вирусу Эбола [25], однако случаев заболевания до 2013 г. не описано.

Вирус Эбола из основных эпидочагов Западной Африки был занесен в Нигерию (1 самостоятельно уехавший больной заразил 20 человек, из которых 8 погибли); Мали (от прибывшего больного ребенка заразились 8 человек, 6 из которых погибли); Италию (медсестра, прибывшая с эмигрантами); Индию (выявлен 1 переболевший эмигрант-носитель инфекции), зарегистрирован случай переезда больного из Гвинеи в Сенегал. Санитарными рейсами доставлены в госпитали США 22 человека, от одного из которых заразились два медработника; в Испанию в госпиталь доставлены 2 больных, от одного из которых заразилась и погибла медсестра; одна больная медсестра была доставлена в Великобританию [19,36]. В плане потенциальной опасности заноса вируса Эбола на неэндемичные территории особого внимания из описанных случаев, на наш взгляд, заслуживает ситуация с переболевшим эмигрантом-индийцем — уже на родине методом ОТ-ПЦР в его сперме были выявлены фрагменты генома вируса Эбола, и он был помещен в карантин в связи с тем, что описаны случаи полового заражения этой инфекцией от мужчин через 6 — 9 месяцев после их выздоровления [14, 19, 36].

Расширение ареала лихорадки Эбола указывает на возможность и в дальнейшем заноса возбудителя с инфицированными людьми, что требует повышенного контроля за лицами, прибывающими из эпидочагов.

Лихорадка долины Рифт. За последние три десятилетия ЛДР, циркулировавшая ранее лишь в экваториальной и южной частях Африки, вышла на северо-восток континента и перешла в Азию, захватив Синайский и западное побережье Аравийского полуостровов [8]. В конце восьмидесятих годов было сообщено о появлении вируса ЛДР в Афганистане [12], в трансгрессирующий нозоарел были вовлечены Турция (1987 г.) и Португалия (1993 г.) [4]. Международное Эпизоотическое Бюро в 2007 г. из 78 зоонозных заболеваний отнесло к числу особо опасных и экономически значимых болезней животных, имеющих тенденцию к трансграничному распространению, 15 вирусных инфекций, в том числе — ЛДР [1].

В 1977 г. ЛДР появилась в Египте, где первоначально одномоментно заболели 18 000 человек, последующий серологический анализ позволил оценить количество переболевших в регионе в 1,5 — 2 млн человек [38]. Весьма загадочный перенос инфекции за 3000 км через горы и пустыни в литературе объяснен по-разному — за счет переноса ветром инфицированных комаров, в результате транспортировки зараженных верблюдов, овец или контаминированных продуктов питания (мясо, молоко) и т.д. [22, 38]. Вспышки в Турции (1987 г.) и Португалии (1993 г.) затронули лишь овец [4]. В конце восьмидесятих годов ЛДР появилась на острове Мадагаскар, с сентября 2000 г. — в Саудовской Аравии и Йемене, где во время первой эпидемии суммарно заболели около 1000 человек [39]. На Африканском континенте ЛДР ныне распространена почти повсеместно за исключением пустынных и высокогорных местностей.

Во всех традиционных ареалах до 1975 г. ЛДР не представляла серьезной опасности для человека и протекала относительно легко как гриппоподобная нелетальная инфекция. Вспышки на юге Африканского континента — в ЮАР (1975 г.) и Зимбабве (1978 г.) были уже с гибелью людей от энцефалитов и геморрагического диатеза [38]. Во время эпидемии в Египте (1977 — 1978 гг.) ЛДР в трети случаев вызывала поражение глаз, геморрагические диатезы и менингоэнцефалиты при общей летальности 3,3% [29]. Эпидемия ЛДР в Южной Мавритании в 1987 г., захватившая около 3% населения региона, протекала как типичная геморрагическая

лихорадка с летальностью в среднем 9,9 %; в 2003 г. заболеваемость составила 25,5%, а летальность — до 44% [26]. В весьма тяжелой клинической форме протекала эпидемия ЛДР в Восточной Африке (Кения, Сомали) в 1997 — 1998 гг., где уровень летальности ориентировочно превышал 10%, а количество заболевших оценивают в количестве свыше 90 000 человек [15]. Летальность при ЛДР на Аравийском полуострове в 2000 г. ориентировочно составила 25 — 30% [39]. За последние четверть века вирус ЛДР эволюционировал от мало- до высокопатогенного для человека, вызывающего тяжелое геморрагическое заболевание, практически сравнявшись в этом отношении с вирусами натуральной оспы, лихорадок Марбург, Ласса и некоторыми другими особо опасными возбудителями, что, в целом, характеризует существенный рост эпидемиологической и социальной значимости данной инфекции. Вирус ЛДР способен к быстрому формированию новых эпидочагов в случае интродукции в регионы, где существуют адекватные для него естественные хозяева-грызуны и переносчики [8]. С высокой степенью вероятности можно предположить, что в дальнейшем при заносе возбудителя в регионы, где обитают комары родов *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* и москиты (естественные переносчики возбудителя в его ареалах) и где имеются необходимые климатические условия, возможно формирование очагов ЛДР. Как при многих арбовирусных инфекциях, комары рода *Aedes* могут быть вовлечены в формирование эпизоотических и эпидемических очагов ЛДР за счет выявленного участия некоторых их видов в циркуляции возбудителя между его природными хозяевами — грызунами и рогатым скотом. Антропофильные виды комаров родов *Culex*, *Aedes* и *Anopheles*, в свою очередь, питаясь как на животных, так и на человеке, способны инициировать эпидпроцесс. Орнитофильные виды комаров рода *Culex* могут инициировать также образование очага ЛДР при переносе возбудителя людям от инфицированных птиц, мигрирующих по восточному афро-европейскому маршруту.

Лихорадка Зика давно известна как легко протекающее тропическое заболевание, случайно выявляемое при иммунологическом обследовании населения в Африке и Азии, недавно появилась на островах Океании и быстро распространилась в обеих Америках, Европе и Азии. Начавшаяся в 2016 г. пандемия, серьезные осложнения инфекции для некоторых групп больных — массовые случаи микроцефалии у новорожденных и развитие синдрома Guillain-Barre, выдвинули данное заболевание в ряд актуальнейших, 1 февраля 2016 г. ВОЗ объявила глобальную чрезвычайную ситуацию по лихорадке Зика [14 — 01.02.2016]. Многие вспышки инфекции ранее были ошибочно приписаны лихорадкам чикунгунья и денге ввиду схожести клинических проявлений инфекций [9, 34].

Изучение генома возбудителя показало, что вирус Зика появился в Восточной Африке, а затем распространился в Западную Африку, а около 50 — 100 лет назад попал в Азию [20, 24, 27]. В 2007 г. вирус Зика появился на острове Яар Микронезии, а в 2013 г. — во Французской Полинезии, где было зарегистрировано около 32 000 случаев заболевания, что составляет около 15% населения. Далее возбудитель распространился с зараженными людьми по островам Океании, а затем в Бразилию, из которой с инфицированными туристами попал в другие государства Америки и Европы. Источник завоза во Французскую Полинезию остался неизвестен. Предполагают, что занос возбудителя в Бразилию мог быть в 2014 г. с большим количеством болельщиков-островитян либо во время проводившихся там чемпионата мира по футболу, либо во время мировых гонок на каноэ. К началу 2016 г. в Бразилии зарегистрировано около 500 000 случаев данной инфекции, а по неофициальным данным — до 1,5 миллиона; центром эпидемии является штат Пернамбуко [20, 24, 27, 32, 33, 40].

К началу 2016 г. в связи с бурным развитием туризма отмечены единичные и групповые случаи заноса вируса Зика более чем в 25 стран Южной Америки, а также США, Мексику, Канаду, Данию, Германию, Великобританию, Финляндию, Австрию, Италию, Испанию, Португалию, Швейцарию, Израиль, Швецию, Китай

и Россию [14 — 23.02.2016]. Природными переносчиками вируса Зика считают комаров рода *Aedes*. В южных регионах России некоторые виды комаров данного рода являются эндемиками [2, 3], что может в принципе вызвать передачу комарами лихорадки Зика от зараженного человека единичным здоровым, но это, очевидно, не приведет к крупным вспышкам или формированию эндемичного очага. Вместе с этим, считаем, что разработка средств диагностики лихорадки Зика в России целесообразна в интересах санитарного благополучия населения страны.

Лихорадка чикунгуния, выявленная в 1952 г. в Африке, перейдя в восьмидесятые годы в Азию, вызвала обширные эпидемии в Индии и Юго-Восточной Азии, после чего длительное время не появлялась. В 2004 г. она повторно появилась в Восточной Африке, опять перешла в Азию, откуда была занесена на все остальные населенные континенты. В начале 2000-х годов было зарегистрировано более 30 вспышек инфекции, в которых переболели около 7 миллионов человек при заболеваемости в некоторых регионах до 63% [9, 21, 34]. В Европе на средиземноморском побережье сформировались очаги в Италии (2007 г.) и Франции (2010 г.). Эволюционно закрепились западноафриканский, восточно-центрально-южноафриканский, азиатский и индокитайский геноварианты вируса, различающиеся по своим свойствам [21]. Распространение лихорадки чикунгуния совпадает с ареалом многих видов комаров рода *Aedes*, в основном, *A. aegypti*. В результате мутации появился геновариант возбудителя, отличающийся резким снижением заражающей дозы для комаров *A. albopictus*, что привело к формированию новых очагов возбудителя в более северных широтах.

Лихорадка денге — одна из наиболее распространенных инфекций, уровень ежегодной заболеваемости которой составляет от 1 до 50 миллионов человек, из которых госпитализируют до 500 тыс., а в ареале лихорадки проживает до половины населения Земли. Быстрое распространение заболевания началось около 50 лет назад [10]. Источник инфекции в эндемичных очагах — обезьяны, переносчик — комары рода *Aedes*. Особую опасность для человека представляет геморрагическая форма инфекции, развивающаяся у людей, ранее переболевших после инфицирования вирусом денге-I и повторно зараженных вирусом денге-II [43]. Занос вируса денге-II на Кубу в 1981 г. (где сложился ареал вируса денге-I) привел к эпидемии, в которой геморрагическую форму инфекции перенесли более 300 000 человек [5]. При возможном заносе лихорадки денге с больными людьми в Россию маловероятны даже единичные случаи реинфицирования.

Лихорадка Марбург. В 1967 г. в Германии и Югославии возникли вспышки ранее неизвестной геморрагической лихорадки. В двух институтах, где на основе ткани почек зеленых марышек, доставленных из Уганды, готовили вакцину против полиомиелита, заболели 32 человека, 7 из которых погибли. Как оказалось позже, обезьяны были заражены вирусом Марбург. Больные сотрудники имели многочисленные контакты, однако инфекция распространения не имела [43]. Единичные случайные заносы возбудителя в Европу с больными людьми не приводили к инфицированию окружающих, в том числе медицинского персонала.

Лихорадка Ласса. Начиная с момента первого научного описания лихорадки Ласса, протекающей с летальностью 0,3%, и до настоящего времени выявляют случаи заноса данной инфекции из эндемичных районов Экваториальной Африки с больными людьми в отдаленные регионы планеты. Естественно, что под медицинский контроль попадали лишь наиболее тяжелые случаи, часто заканчивавшиеся смертью. К настоящему времени зарегистрировано около 30 больных лихорадкой Ласса, самостоятельно выехавших за пределы Африки. Важно отметить, что ни один из этих завозных случаев благодаря своевременному принятым мерам не вызвал распространения инфекции среди многочисленных контактных лиц, в том числе и медицинского персонала [19].

Коронавирусные инфекции. В последние годы появились новые нозологии и зафиксированы случаи заноса и распространения тяжело протекающих форм

коронавирусных инфекций, ранее повсеместно проявлявшихся лишь в виде гриппоподобного заболевания у детей. Первая из таких необычных вспышек произошла в ноябре 2002 г. в провинции Гуаньдун Китая, где на фермах по разведению животных (снотовидная собака, китайский барсук) работники заражались при забое и разделке животных [13]. Новое заболевание проявлялось у людей в форме тяжелой пневмонии. По клинической картине, заболевание получило название «тяжелый острый респираторный синдром». Из Китая инфекция с зараженными людьми была занесена в 32 страны, в том числе США, Канаду, страны Юго-Восточной Азии. К июню 2003 г., по данным ВОЗ, было зарегистрировано 8460 случаев, 799 человек погибли (9,4%) [45]. Наиболее высокому риску заражения были подвержены трудоспособные жители этих стран в возрасте от 20 до 60 лет. Группой высокого риска оказались и медицинские работники госпиталей, среди которых заболело около 25%. ТОРС из активного эпидочага в Китае с большим был занесен на территорию РФ (в городскую больницу г. Благовещенск). Распространения инфекции не произошло [45].

Вспышка другой коронавирусной инфекции началась в Джидде (Саудовская Аравия) в июне 2012 г. Новое заболевание назвали «ближневосточный респираторный синдром» (MERS). Природный источник данного вируса — верблюды, т.к. в сыворотках 68 — 100% животных, взятых в северной Африке и Аравии, обнаружили антитела к этому возбудителю, в том числе в пробах 1993 и 2003 гг. [30, 47]. В Саудовской Аравии по состоянию на июнь 2016 г. подтверждено 1633 случая заболевания, 587 человек погибли (летальность 35,9%) [14 — 03.06.2016]. Из первичного очага зафиксированы заносы возбудителя с больными в 23 страны Ближнего и Дальнего Востока, Европу и Северную Америку (Катар, Оман, Иран, Южную Корею, Китай, Германию, Англию, США и др.). Один из случаев заноса возбудителя из эпидочага произошел в мае 2015 г. с 68-летним мужчиной, вернувшимся из Саудовской Аравии в Южную Корею, где от него заразились более 180 человек, из которых 38 погибли [14 — 31.12.2015; 18]. Наибольшему риску заболевания подвержены люди с ослабленным иммунитетом, хронической болезнью легких, диабетом и почечной недостаточностью. Поскольку соотношение клинических выраженных форм данной инфекции к инспарантным составляет примерно 1:100, то многие случаи заносов не были выявлены [18].

Эти и другие эпидситуации создали значительные медицинские и экономические проблемы, дезорганизацию общественной жизни, выявили неготовность государственных и общественных структур к ликвидации вспышек. Так, в 1972 г. и 1974 г. было 2 случая заноса лихорадки Ласса в Канаду. В преддверии Олимпийских игр 1976 г. в Монреале Федеральным рабочим центром Канады совместно с медицинским центром был выдвинут грандиозный план защиты от опасных болезней, который был чрезвычайно дорог в реализации, почти парализовал работу санитарных служб и едва не привел к срыву Олимпиады [43]. ВОЗ рассматривала целесообразность отмены Олимпиады в Рио-де-Жанейро в связи с эпидемией лихорадки Зика [19].

Известны и случаи четкой организации противоэпидемических мероприятий в аналогичных ситуациях. Занос натуральной оспы из Индии в Москву в 1959 г., когда от одного больного заразились 46 человек и трое погибли, потребовал введения длительных масштабных ограничительных мероприятий, изоляции около 1500 контактных и вакцинации почти 6,2 миллионов человек — все противоэпидемические меры были реализованы в течение всего двух недель [42].

Представленные наиболее характерные случаи заноса экзотических вирусных инфекций на эндемичные территории показывают, что в результате в некоторых ситуациях формируются новые устойчивые очаги инфекции (лихорадка Эбола в Западной Африке, ЛДР в Египте и Аравии, лихорадка Зика в Южной Америке, лихорадка Западного Нила в Северной Америке, геморрагическая лихорадка денге на Кубе), а в других — не только не образуется очаг, но и не происходит передачи даже контагиозных инфекций от человека к человеку (многочисленные

случаи заноса лихорадки Ласса за пределы Африки, лихорадки Марбург в Европу, занос ТОРС в Россию и др.).

Какие эпидемиологические факторы существенны для формирования новых ареалов возбудителей в нынешнюю эпоху глобализации и развития миграционных потоков? К первоочередным из них относятся наличие перmissивных кандидатов в естественные хозяева и (во многих случаях) переносчики; для арбовирусных инфекций важны также климатические условия нового для возбудителя региона. Естественная эволюция возбудителей приводит к появлению геновариантов, приспособляющихся к новым условиям обитания. Существенна роль социально-экономических и экологических факторов, в том числе коллективного здоровья коренного населения — недостаточное питание, широкое распространение малярии, туберкулеза, ВИЧ/СПИД среди аборигенов Африки [37] и Южной Америки [20, 32] резко повышают чувствительность к новым инфекциям и утяжеляют их течение. В противоположность этому, высокий уровень коллективного иммунитета к «местным» инфекциям может снизить восприимчивость людей к новым антигенно родственными возбудителям. Последняя ситуация может, на наш взгляд, частично объяснить барьер для желтой лихорадки в Азии, создаваемый распространенными там антигенно родственными вирусами денге, Зика и другими флавивирусами, передающимися комарами.

Среди недавно выявленных экологических факторов, влияющих на иммунокомпетентность организма, определена роль некоторых микроэлементов. В патогенезе вирусных инфекций одно из универсальных ключевых мест занимает биогенный микроэлемент селен [41], который в составе аминокислоты селеноцистеина участвует в регуляции свободнорадикальных процессов как каталитический центр селеносодержащих ферментов, в частности глутатионпероксидазы, регулирующей биологический окислительный гомеостаз [16, 23]. Свободные радикалы, разрушающие биополимеры, ткани и генетические механизмы, образуются при воспалении, вызванном, в частности, инфекцией. Глутатионпероксидаза, содержащаяся в клетках, нейтрализует метаболические производные кислорода и стимулирует противовоспалительные хемокины, активирующие Т-клетки и посредством этого выработку интерферонов и иммуноглобулинов [41]. Дефицит селена в организме даже на 10% подавляет пролиферацию Т-клеток, что приводит к ослаблению иммунокомпетентности и низкой выработке антител. Уровень селена в крови менее 1 мкМ/л вызывает поражение иммунной системы. Экспериментально показано, что нарушение окислительного гомеостаза хозяина вызывает быстрые мутации в вирусных нуклеиновых кислотах, приводящих к повышению вирулентности возбудителей (к примеру, вирусов полиомиелита, гриппа, ВИЧ) [17].

Сопоставим уровень селена в почвах некоторых регионов (соответственно достаточности его в местных продуктах питания и воде) и заболеваемость некоторыми вирусными инфекциями.

На территории Китая в регионах, бедных селеном (уровень этого элемента в почвах менее 0,01 мг/кг и одновременно содержатся повышенные концентрации его антагонистов — мышьяка и ртути) [35], где его мало в местных пищевых продуктах и воде, выявлена болезнь Кешана, вызванная вирусом Коксаки В3, обычно малопатогенным для человека [23]. В этих же местах впервые появились вирусы гриппа А пандемического типа H_2N_2 — азиатский, H_3N_2 — Гонконг, H_5N_1 — птичий, а также возбудитель ТОРС, распространившиеся по Земному шару. Вирусы SIV (предшественник ВИЧ) и Эбола впервые появились в субсахарских регионах Африки (Камерун, Уганда, Заир, Судан), бедных селеном [35], где почвы исчерпали запасы питательных веществ. Вспышкам лихорадки Эбола в Африке, начинавшихся в этих же регионах, как правило, предшествовали длительные засухи и хронический голод населения [23]. Возбудитель лихорадки долины Рифт начал резко повышать свою вирулентность для человека и формировать новые эпидочаги [7] после заносов в ряд бедных селеном регионов субсахарской Африки.

Лихорадка Зика, занесенная в Бразилию, дефицитную селеном [35], сформировала устойчивый эпидочаг.

Таким образом, дефицит селена и недостаточное питание населения во многих случаях являлись триггером, запускавшим механизм повышения вирулентности местных малопатогенных или заносных экзотических возбудителей, мутировавших в новых экосистемах, с формированием соответствующих эпидочагов. К подобным геопатогенным зонам возможно отнести некоторые регионы Китая, Экваториальной Африки, Амазонии, где, в основном, появлялись и широко распространялись новые для науки возбудители или высоковирулентные штаммы особо опасных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакулов И.А., Вологина И.В. Эпизоотическая ситуация по особо опасным болезням животных в 2007 — 2008 гг. Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных. ВНИИВВиМ, Покров, 2008, с. 6-13.
2. Бурлаков С.А., Паутов В.Н. Комары и клещи — переносчики возбудителей вирусных и риккетсиозных заболеваний человека. М., 1975.
3. Виноградская О.Н. Географическое распространение комаров-переносчиков инфекций. М., 1969.
4. Книзе А.В., Дмитриенко Н.В., Стрижаков А.А. Эволюция эпизоотической ситуации по лихорадке долины Рифт. Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов. ВНИИВВиМ, Покров, 2003, с. 93-98.
5. Лекции по инфекционным болезням (Под рук. Н.Д. Юшука). М., 1999.
6. Малеев В.В. Проблемы инфекционной патологии на современном этапе. Инфекционные болезни. 2015, 13 (12): 5-9.
7. Маркин В.А., Марков В.А. Вирусные геморрагические лихорадки — эволюция эпидемиологического потенциала. Журн. микробиол. 2002, 1: 91-98.
8. Маркин В.А. Лихорадка долины Рифт. Инфекционные болезни. 2015, 3: 25-31.
9. Маркин В.А. Лихорадка чикунгунья. Инфекционные болезни. 2015, 12 (3): 36-40.
10. Марков В.И. Лихорадка денге. Инфекционные болезни. 2015, 12 (3): 40-43.
11. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Концептуальные основы биологической безопасности. Вестник РАМН. 2013, 10: 4-13.
12. Перепелкин В.С., Раевский К.К., Николаев В.П., Шейбак В.В. Этиология москитной лихорадки у советских военнослужащих в Афганистане. Воен. мед. журн. 1989, 1: 48-49.
13. Покровский В.И., Малеев В.В., Киселев О.И. Коронавирус SARS — возбудитель атипичной пневмонии. Информационный экспресс-бюллетень. СПб, М., 2003.
14. A ProMed-mail post. URL //www.promedmail.org (дата последнего обращения 15.01.2017).
15. An outbreak of RVF, Eastern Africa, 1997-98. Wkly. Epidem. Rec. 1998, 73 (15): 105-109.
16. Beck M.A., Levander O.A., Handy J. et al. Selenium deficiency and viral infection. J. Nutr. 2003, 133 (5): 1463-1467.
17. Broome C.S., McArdle F., Kyle J.A. et al. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. Am. J. Clin. Nutr. 2004, 80: 154-164.
18. Carias C., o'Hagan J.J., Jewett A. et al. Exportations of symptomatic cases of MERS-CoV infection to countries outside the Middle East. Emerg. Infect. Dis. 2016, 22 (4): 723-725.
19. CDC. Known cases and outbreaks. URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages> (дата последнего обращения 15.01.2017).
20. Colombier D., Danielson N., Donachie A et al. Microcephaly in Brazil potentially linked to the Zika virus epidemic. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 24 November 2015.
21. Devau C.A. Emerging end re-emerging viruses: A global challenge illustrated by chikungunya virus outbreaks. World J. Virol. 2012, 1 (1): 11-22.
22. Gad A.M., Farid A., Ramzy R.R.M. Host feeding of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with the recurrence of Rift Valley fever in Egypt. J. Med. Entomol. 1999, 36 (6): 709-714.

23. Harthill M. Review: Micronutrient selenium deficiency influences evolution of some viral infectious diseases. *Biol. Trace Elem. Res.* 2011, 143: 1325-1336.
24. Hayes E.B. Zika virus outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, 15 (9):1347-1350.
25. Johnson E.D., Gonzales J.P., Georges A. Filovirus activity among selected ethnic groups inhabiting the tropical forest of equatorial Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1993, 87 (5): 536-538.
26. Jonan A. Epideme de fièvre virale hémorragique: formes neurologiques. *Med. Armées.* 1991, 6: 427-432.
27. Lanciotti R.S., Lambert A.J., Holodny M. et al. Phylogeny of Zika virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2016, 22 (5). DOI: 10.3201/eid2205.160065.
28. LeGuénou B., Formenty P., Wyers M. et al. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet.* 1995, 345: 1271-1274.
29. McIntosh B.M. Patterns of Rift valley fever activity in Zambia. *Epidem. Infect.* 1992, 108 (1): 185-191.
30. Meyer B., Muller M.A., Corman V.M. et al. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014, 20 (4): 552-559.
31. Michak J.H., Bressler D.S., Rossi C.A. Short report: Lack of virus replication in arthropods after intrathoracic inoculation of Ebola Reston virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996, 55 (1): 89-90.
32. Musso D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2015, 21 (1): 188.
33. Musso D., Roche C., Robin E. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2015, 21 (2): 359-361.
34. Musso D., Van Mai C.K., Gubler D. Zika virus: Following the path of dengue and chikungunya. *Lancet.* 2015, 386: 243-244.
35. Olfield J.E. World atlas of selenium. Selenium-Tellurium Ass., Grimbergen, 2002.
36. Outbreaks Chronology: Ebola Virus Disease. URL: <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/history/chronology.html> (дата последнего обращения 25.10.2016).
37. Parpia A.S., Ndeffo-Mbah M.L., Wenzel N.S. et al. Effects of response to 2014-2015 Ebola outbreak on death from malaria, HIV/AIDS, and tuberculosis, West Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2016, 22 (3): 433-441.
38. Rift valley fever. (Ed. T.A. Swartz). New York, 1980.
39. Rift valley fever. Saudi Arabia: Yemen. *Wkly. Epidem. Rec.* 2000, 76 (40): 321.
40. Rodriguez-Morales A.J. Zika: The new arbovirus threat for Latin America. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2015, 9 (6): 684-685.
41. Selenium: Its molecular biology and role in health. (Ed. D.L. Hatfield, M.J. Berry, V.N. Gladishev). Springer Science, N.Y., 2006.
42. Smallpox and its eradication. (Ed. F. Fenner, D.A. Henderson, L. Arita, Z. Je ek, L.D. Ladnyi). Geneva, WHO, 1988.
43. Westwood J.C.N. The hazard from dangerous exotic diseases. McMillan Press, 1980.
44. World Health Organization. Ebola haemorrhagic fever — South Africa. *WER.* 1996, 71 (4): 359.
45. World Health Organization. Global alert and response. Coronavirus infections. URL: http://www.who.int/csr/don/archive/disease/coronavirus_infections/en/ (дата последнего обращения 15.01.2017).
46. Yuan J., Zhang Y., Li J. et al. Serological evidence of ebolavirus infection in bats. China. *J. Virol.* 2012, 9: 236-241.
47. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M. et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New. Engl. J. Med.* 2012, 367: 1814-1820.

Поступила 15.03.17

Контактная информация: Маркин Владимир Александрович, д.м.н.,
141306, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 2

ПАРОДОНТОПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ — ОСНОВНОЙ ФАКТОР ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РАЗВИТИЯ ПАРОДОНТИТА

Московский государственный медико-стоматологический университет

Представлены современные представления о роли пародонтопатогенных видов бактерий *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*) и *Porphyromonas gingivalis* как ведущих факторов возникновения и прогрессирования пародонтита. Даны терминологические определения факторов, индикаторов и маркеров риска развития воспалительных заболеваний пародонта, показывающих уровень значимости их ассоциаций с заболеванием, а также количественные оценки ассоциаций.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 101—112

Ключевые слова: пародонтит, пародонтопатогенные бактерии, факторы риска, индикаторы риска

V.N.Tsarev, E.N.Nikolaeva, E.V.Ippolitov

PERIODONTOPHATOGENIC BACTERIA OF THE MAIN FACTORS OF EMERGENCE AND DEVELOPMENT OF PERIODONTITIS

Moscow State Medical-Stomatological University, Russia

Presents a modern understanding of the role of periodontopathogenic bacteria types: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* as indicators of periodontitis emergence and development risk. Terminological definitions are given of factors, indicators and markers of risk of periodontium inflammatory diseases development that show the level of importance of their association with the disease as well as the quantitative evaluation of these associations.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 101—112

Key words: periodontitis, periodontopathogenic bacteria, factors of emergence, indicators of risk

Накопленный за последние десятилетия опыт исследований по этиологии воспалительных заболеваний пародонта свидетельствует о том, что ведущая роль в формировании воспалительного процесса в полости рта принадлежит облигатно-анаэробной и микроаэрофильной факультативно-анаэробной микрофлоре. Многие исследователи изучали состав и свойства бактериальной биопленки ротовой полости с помощью микроскопических, бактериологических и молекулярных методов исследований, чтобы оценить микробные факторы риска заболеваний пародонта, однако лишь в единичных работах использован комплекс указанных методик и проведено исследование биопленок на моделях *in vitro* [1, 3, 4, 27]. Современные технологии позволили выделить в полости рта генетический материал более 700 видов или фило типов микробов, половина из которых не культивируема [12, 13].

В то же время, в качестве этиологических факторов заболеваний пародонта в настоящее время доказана роль относительно небольшого числа бактерий. К ним относят *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (по старой номенклатуре —

Actinobacillus actinomycetemcomitans), *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Wollinella recta* (*Campylobacter rectus*), *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Treponema denticola*, а также *Parvimonas micra* (*Peptostreptococcus micros*). Хотя с пародонтитом ассоциировано более 20 видов бактерий, только для четырех видов выявлены строгие ассоциации с прогрессированием заболевания [13]. На Всемирном рабочем совещании клинических пародонтологов в 1996 году в качестве специфических патогенных бактерий, обуславливающих заболевания пародонта, были названы три вида: *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus* и *P. gingivalis* [32].

Пародонтит — многофакторное заболевание, индуцируемое микробами зубной биопленки [12]. Проявление и прогрессирование признаков пародонтита зависит от обширного количества факторов и детерминант, включая индивидуальные особенности субъекта, социальные, поведенческие, системные, генетические факторы, изменения на уровне зубов, микробный состав зубного налета и другие факторы риска. В связи с большим количеством показателей, влияющих на развитие и прогрессирование пародонтита, трудно понять, в результате каких процессов происходит иницирование или прогрессирование заболевания. Поэтому основные усилия специалистов направлены на выявление маркеров, которые позволят выявить группы риска еще до развития пародонтита и определить факторы риска, которые можно было бы модифицировать, чтобы предотвратить или изменить течение заболевания [30].

Терминология, связанная с индикаторами риска, указывает на уровень значимости их ассоциаций с заболеванием. Не всегда понятно, какие из этих терминов применяют в стоматологической литературе, ни каким образом клиницисты используют такую информацию. В зависимости от того, какие факторы связаны с началом и прогрессированием заболеваний пародонта, выбирают определенный дизайн исследования и уровень значимости результатов измерения, определяющих силу ассоциаций каждого фактора/индикатора риска и их использование для принятия клинического решения [44]. Самыми строгими показателями заболеваний пародонта являются признаки, наиболее близко отражающие возможный отрицательный результат потери зубов, и которые можно объективно оценить с наименьшей ошибкой измерения. Обычно для этого используют количественные оценки ассоциаций — относительный риск (ОР), отношение шансов (ОШ) и другие. Наиболее сильной ассоциацией для определения факторов риска является величина относительного риска. Относительный риск обычно определяют как отношение риска заболевания в группе, подверженной влиянию фактора, к риску в группе, не подверженной этому влиянию. Относительный риск — оценка ассоциаций, обычно получаемых в динамических исследованиях.

Для снижения риска начала или прогрессирования заболевания некоторые факторы риска можно изменять (например, прекращение курения или улучшение гигиены полости рта с целью снижения риска деструкции тканей пародонта), тогда как другие факторы нельзя модифицировать (генетические факторы). Неизменяемый фактор риска часто называют детерминантой [33].

A. actinomycetemcomitans — грамотрицательные, неспорообразующие, неподвижные, факультативно-анаэробные коккобациллы. Известно пять серотипов *A. actinomycetemcomitans*, различающихся по вирулентному потенциалу [23]. Многие авторы считают, что распространение серотипов *A. actinomycetemcomitans* при различных формах пародонтита является специфическим и индикаторным показателем их принадлежности к истинным пародонтопатогенам или микробам, связанным с высоким риском пародонтита [10]. Обычно пациенты инфицированы стабильно в течение долгого времени только одним серотипом актинобацилл. Например, штаммы серотипа с более часто выявляли при экстраоральных инфекциях и у людей со здоровым пародонтом. Многие штаммы *A. actinomycetem-*

comitans серотипа b такие, как JP-2, продуцируют повышенное количество лейкотоксина — основного фактора вирулентности, ассоциированного с заболеваниями пародонта [12]. Частота выявления серотипов *A. actinomycetemcomitans* отличается в различных популяциях. В США серотип b встречается чаще, чем серотипы a и c у пациентов с локализованным агрессивным пародонтитом. У финнов преобладает серотип b при пародонтите, а c — у здоровых людей. У японцев, страдающих пародонтитом, выявляют серотипы a, c и e. В настоящее время высоко патогенный штамм *A. actinomycetemcomitans* серотипа b считается наиболее вирулентным видом микробов или более высокого риска, особенно у молодых индивидуумов африканского происхождения [23].

Лейкотоксин *A. actinomycetemcomitans* — наиболее изученный фактор вирулентности, вызывает киллинг полиморфноядерных лейкоцитов и моноцитов человека при взаимодействии с интегриновыми рецепторами CD11a/CD18, ускоряет лизис моноцитов, активируя каспазу-1. В низких дозах он индуцирует дегрануляцию нейтрофилов с последующим выделением и активацией матриксной металлопротеиназы-8 (ММР-3), секрецию активной формы IL-1 β . Высокие дозы лейкотоксина вызывают образование пор, лизис клеток, секрецию неактивной формы про-IL-1 β [22]. Таким образом, *A. actinomycetemcomitans* избегает влияния факторов врожденного иммунного ответа, напрямую его атакуя. При лизисе клеток выделяются не только ферменты, разрушающие ткани, но и антимикробные пептиды — дефензины, которые могут убивать бактерии и привлекать другие клетки в очаг воспаления [14]. Протеины *A. actinomycetemcomitans* (особенно лейкотоксин) могут индуцировать апоптоз иммунных клеток организма хозяина. Снижая продукцию лейкотоксина и, таким образом, подавляя воспалительный ответ, данный вид бактерий может иметь преимущество на какой-либо стадии заболевания.

Cdt — токсин *A. actinomycetemcomitans* — вызывает нарушение гомеостаза тканей пародонта и защитной системы организма. В частности, он индуцирует задержку клеточного цикла, ингибирует функции клеток пародонтальных связок, пролиферацию десневых фибробластов, способствует образованию выростов клеток соединительной ткани пародонта. Он также индуцирует апоптоз T-лимфоцитов, активируя каспазу-2 и каспазу-7 [15].

Эндотоксин *A. actinomycetemcomitans* модулирует ответные реакции организма хозяина и способствует деструкции тканей. Липополисахарид (ЛПС) *A. actinomycetemcomitans* индуцирует секрецию макрофагами окиси азота, интерлейкина IL-1 β и TNF- α , IL-6 десневыми фибробластами, влияющих на резорбцию костей [39]. Между поверхностными структурами и компонентами O-антигена ЛПС у различных серотипов (особенно серотипа b) *A. actinomycetemcomitans* имеются значительные различия [12].

Наиболее важным свойством *A. actinomycetemcomitans* является их способность избегать врожденную защиту организма и выживать при механическом удалении бактериальных отложений, проникая в ткани десен и, особенно, в эндотелиальные клетки. Проникновение *A. actinomycetemcomitans* в клетки является энергозависимым процессом, связано с адгезией, синтезом протеинов, активным рецепторозависимым эндоцитозом [13]. *A. actinomycetemcomitans* имеют фимбрии, играющие важную роль в колонизации и инвазии тканей пародонта. Мишенями на клетках организма хозяина для *A. actinomycetemcomitans* являются трансферриновые рецепторы и эпителиальные интегрины. Выделяют актинозависимые и актинонезависимые штаммы *A. actinomycetemcomitans*, инвазирующие клетки организма хозяина. Штаммы актинобацилл, синтезирующие фосфорилхолин, способны проникать в системы циркуляции, связываться с рецепторами для фактора, активирующего тромбоциты. Активность трипсиноподобных протеаз *A. actinomycetemcomitans* коррелирует с клиническими параметрами пародон-

донтита. Они расщепляют коллаген, фибронектин, IgG, сывороточный, но не секреторный IgA, IgM *in vitro*. В 50% сывороток, выделенных у пациентов с агрессивными формами пародонтита, определяли антитела против GroEL протеинов, индуцирующих резорбцию кости у экспериментальных животных, активацию остеокластов и пролиферацию эпителиальных клеток [31]. Антисыворотка против GroEL *A. actinomycetemcomitans* перекрестно реагирует с GroEL *Escherichia coli*; *P. gingivalis*, *T. forsythia* и белками теплового шока (hsp60) [48]. Известно, что белки теплового шока играют определенную роль в этиопатогенезе аутоиммунных заболеваний. Некоторые авторы предполагают, что хронические воспалительные заболевания, например, пародонтит, могут быть результатом постоянного контакта с микробными белками теплового шока, которые способствуют развитию аутоиммунных заболеваний.

Частота выявления *A. actinomycetemcomitans* в зубодесневом налете варьирует в широких пределах, но при воспалительных процессах она обычно увеличивается. Так, *A. actinomycetemcomitans* выявляли в зубодесневой борозде у 0 — 26% здоровых детей [41] и в 40 — 100% поддесневых участков у пациентов с агрессивными формами пародонтита [45]. Наиболее четко была показана связь *A. actinomycetemcomitans* с локализованным агрессивным пародонтитом [29]. В связи с этим, было предположено, что *A. actinomycetemcomitans* является этиологическим фактором локализованного агрессивного пародонтита, но это было трудно подтвердить, в связи с эпизодической природой активации заболевания, а также трудностью культивирования этих микробов. При обширном введении в практику более чувствительных молекулярно-генетических методов исследований были получены похожие результаты, но *A. actinomycetemcomitans* выявили и при хроническом генерализованном пародонтите [2, 8, 23]. Поэтому этот вид микробов многие исследователи считают инициатором агрессивных форм пародонтита, однако недостаточным для его прогрессирования. Основным медиатором агрессивных форм пародонтита, скорее всего, являются ответные реакции организма хозяина [37].

Факторы вирулентности и антигенные свойства *T. forsythia* наименее изучены, по сравнению с другими пародонтопатогенами, в основном, вследствие того, что этот вид микробов трудно культивировать *in vitro*. *T. forsythia* продуцируют протео- и гликолитические ферменты. Активность этих ферментов в поддесневых образцах коррелирует с клиническими признаками пародонтита. Предполагают, что эти ферменты играют ключевую роль в связывании *T. forsythia* с эритроцитами, полиморфноядерными лейкоцитами и фибробластами. Основной поверхностный антиген VspA *T. forsythia* стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов в мононуклеарных клетках линии THP-1 при взаимодействии с CD14 и TLR4 [31].

Так как *T. forsythia* почти всегда определяют в участках, где присутствует *P. gingivalis*, Rudney J.D. et al. [35] предположили, что *T. forsythia* могут также проникать в клетки и существовать, например, в эпителиальных клетках ротовой полости. С помощью ПЦР, а затем методом флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), *T. forsythia* были выявлены в клетках слизистой щеки [34]. Существуют как инвазивные, так и неинвазивные штаммы *T. forsythia*. По-видимому, проникая в клетки тканей пародонта, бактерии поддерживают внутриклеточный резерв в тех случаях, когда колонизация участка затруднена. Инфицированные клетки являются переносчиками бактерий из одного участка в другой или от одного хозяина к другому и, возможно, защищают их в жесткой гипотонической среде слюны. Способность *T. forsythia* адгезировать и пенетрировать клетки может быть связана с их поверхностным S-слоем. Его белковые компоненты обладают активностью гемагглютинаина и играют важную роль в формировании абсцессов у экспериментальных животных. Инфицирование мышей *T. forsythia* вызывает деструк-

цию альвеолярной кости [31]. Наиболее интригующим фактором вирулентности *T. forsythia* является его способность индуцировать апоптоз. При добавлении экстракта *T. forsythia* к HL-60 и другим клеточным линиям была выявлена цитотоксическая активность, характерные для апоптоза фрагменты ДНК и активация каспазы-3. Более того, этот вид микробов вызывал снижение мембранного потенциала митохондрий и потерю целостности мембран, характеризующих апоптозные процессы в клетках. Так как апоптозные клетки поглощаются резидентными, не активированными макрофагами, возникает вопрос, не запускают ли *T. forsythia* врожденный аутоиммунный ответ. Согласно этому сценарию, резидентные макрофаги пытаются элиминировать апоптозные эпителиальные клетки, инфицированные *T. forsythia*, для поддержания тканевого гомеостаза [4]. *T. forsythia* чаще всего выявляют при хроническом генерализованном пародонтите. Вместе с *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis* этот вид бактерий также отнесли к наиболее вероятным индикаторам риска пародонтита [32, 42, 46]. По мнению японских авторов *T. forsythia* и *S. rectus* можно рассматривать в качестве маркера начала пародонтита [40].

Наиболее изученный вид патогенных микробов, выявляемый в пародонтальных карманах — *P. gingivalis* экспрессирует три основных фактора вирулентности — фимбрии, гингипаины и липополисахариды [13, 18]. Существуют, по крайней мере, 6 серотипов *P. gingivalis*, различающихся по наличию капсульных полисахаридов (К-антигенов) с вирулентными свойствами. Бескапсульные штаммы способны к аутоагрегации и повышенной адгезии к эпителиальным клеткам и другим бактериям полости рта. Фимбрии *P. gingivalis* обеспечивают адгезию к специфическим рецепторам на клетках хозяина; индуцируют интернализацию бактерий, взаимодействуя с β 1-интегринами эпителиальных клеток и изменяя их цитоскелет [4], модулируют образование провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α [25]; индуцируют образование опсонин, усиливающих фагоцитарную и киллинговую активность полиморфноядерных лейкоцитов; активируют экспрессию CD14⁺/CD16⁺ на дендритных клетках при участии TLR2 [5]. Однако они ингибируют взаимодействие между внеклеточными белками и интегринными, секрецию IL-8 и клеточный апоптоз [4]. Вакцинация против фимбрий *P. gingivalis* препятствует развитию пародонтита. *P. gingivalis*, лишенные фимбрий, могут проникать в эпителиальные клетки ротовой полости, но в меньшей степени, чем бактерии, имеющие фимбрии. Штаммы *P. gingivalis*, выделенные из пародонтальных карманов глубиной не менее 4 мм, обладали генами *gag* локуса, кодирующих вирулентные свойства бактерий (Р-фимбрии, Р-подобные фимбрии, гемолизин). Различия в скорости прогрессирования воспалительных процессов могут быть связаны с различиями вирулентных свойств инфицирующих штаммов.

Гингипаины — протеазы *P. gingivalis*, основной функцией которых является осуществление питания при расщеплении протеинов до пептидов. Гингипаины способствуют резистентности к фагоцитозу макрофагами и формированию обширных абсцессов, разрушая сывороточные опсонины [5]. Известно не менее 39 различных субстанций *P. gingivalis* с протеолитической активностью, которые были отнесены к трипсиноподобным ферментам [13]. Выделены и очищены 3 цистеиновые протеазы, способные гидролизировать пептидные связи в Arg-X остатках (Arg-гингипаин или RGP), и одна со специфичностью Lys-X (Lys-гингипаин или KGP) — гингипаин R и гингипаин K. Цистеиновые протеазы способствуют повышенной чувствительности к ЛПС, отщепляя CD 14 на моноцитах; обладают коллагеназной активностью; ингибируют TNF- α . Гингипаины R и K являются критическими факторами для проявления вирулентных свойств *P. gingivalis*. Гингипаин R изменяет сосудистую проницаемость, индуцируя выделение брадикинина, увеличивает адгезию фимбрий к фибробластам и экспрес-

сию ими IL-8, разрушает белки системы комплемента. Гингипаин К обладает такими же свойствами и является наиболее активной фибриногеназой, известной в настоящее время [19, 27]. Бактериальные протеазы индуцируют экспрессию, секрецию и активацию латентных форм матриксных металлопротеиназ организма хозяина, влияют на локальное накопление γ -интерферона и фенотип Th1 и Th2 при пародонтите.

ЛПС — наиболее важный амфифильный компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий, повышающий ее структурную целостность и биологическую активность. ЛПС *P. gingivalis* уникален по химической структуре корового полисахарида и липида А и биологической активности [13]. Он индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов моноцитами и макрофагами, обусловленную активацией CD14/TLR-4 и (или) CD14/TLR-2. Интересно отметить, что десневые фибробласты более резистентны к медиаторам воспаления, индуцированных ЛПС *P. gingivalis*, чем фибробласты кожи. Это может быть связано с низкой экспрессией TLR-2 и TLR-4 на десневых фибробластах. В отличие от энтерального ЛПС *P. gingivalis* индуцирует секрецию IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13 и низкий уровень γ -интерферона [47]. В то время как TLR-4 является основным трансмембранным рецептором для ЛПС грамотрицательных бактерий, TLR-2 является ключевым компонентом при ответе на дрожжи и грамположительные бактерии [26]. Возможным исключением является ЛПС *P. gingivalis*, который может взаимодействовать с TLR-2. Индукция TLR-2 мышинных макрофагов липополисахаридом *P. gingivalis* приводит к экспрессии генов воспаления, отличной, чем при индукции TLR-4. Более того, ЛПС *P. gingivalis*, по-видимому, стимулирует Th2-опосредованный ответ у мышей и дендритных клеток человека, и таким образом, может регулировать адаптивный иммунный ответ [7]. Важно отметить, что уровень сывороточных антител к ЛПС *P. gingivalis*, определяемый с помощью вестерн-блотта, особенно сильно коррелировал с клиническими параметрами пародонтита [6]. Таким образом, ЛПС *P. gingivalis*, по-видимому, способен влиять на тип иммунного ответа, благоприятствуя гуморальному ответу, и это может увеличивать его выживаемость *in vivo*. Действительно, *P. gingivalis* могут выживать внутри эпителиальных клеток, по-видимому, в некультивируемой стадии. При инвазии клеток усиливаются вирулентные свойства бактерий и воспалительный ответ [5, 46]. Инфицирование *P. gingivalis* приводит к активации многих факторов с помощью различных сигнальных механизмов (p38, ERK, PI3K, каликриин и JNK), что приводит к индукции гипертрофии H9c2 кардиомиобластов. *A. actinomycetemcomitans* и *P. intermedia* такими свойствами не обладают [46].

Динамические исследования роли P. gingivalis и T. forsythia при воспалительных заболеваниях пародонта. *P. gingivalis* почти всегда выявляют совместно с *T. forsythia*, поэтому обсуждать роль одного вида микробов без другого практически невозможно [35]. Некоторые авторы считают, что *T. forsythia* в большинстве случаев предшествуют появлению *P. gingivalis*. Так, при гингивите *T. forsythia* выявляли чаще и в большем количестве, чем *P. gingivalis* [43]. Было показано, что *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* и *T. forsythia* выявляют с высокой частотой как у пациентов с потерей зубодесневого прикрепления, так и с положительной динамикой. Наличие любого из этих видов микробов в определенном участке не является прогностическим фактором потери зубодесневого прикрепления в будущем. Однако постоянное присутствие *T. forsythia* у пациентов в каком-нибудь участке с потерей зубодесневого прикрепления при всех визитах к стоматологу в 5,3 раза увеличивало отношение шансов дальнейшего прогрессирования заболевания по сравнению с пациентами, у которых этот вид микробов выявляли периодически или не идентифицировали ни разу. Авторы пришли к заключению, что наличие *T. forsythia* является фактором риска развития пародонтита, но не определяет участок будущей потери зубодесневого прикрепления. У пациентов с

тяжелой степени пародонтита выявляли значительное количество *P. gingivalis* и *T. forsythia*. В участках с воспалением определяли гораздо больше *P. gingivalis*, *T. denticola* и *T. forsythia*, по сравнению со стабильными участками [44]. Позднее была подтверждена важная роль *T. forsythia* и *P. gingivalis* как в инициации, так и прогрессировании хронического пародонтита [7]. Chaves E.S. et al. [8], применяя компьютерный денситометрический анализ для оценки потери кости (CADIA), выявили корреляцию прогрессирования пародонтита с наличием *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* и других видов микробов. В этом исследовании *P. gingivalis* чаще выявляли в пародонтальных карманах пациентов с прогрессирующей резорбцией кости. При этом и положительные, и отрицательные прогностические показатели были относительно высокими, соответственно 84% и 85% [8]. Однако *T. forsythia* в данной работе не определяли. *T. forsythia* и *P. gingivalis* также влияют на характер течения заболевания после проведенной терапии. В ряде работ была выявлена небольшая, но статистически значимая корреляция между клинической потерей зубодесневого прикрепления и персистенцией или повторным восстановлением патогенной микрофлоры [43]. Наличие *P. gingivalis* и *T. forsythia* в поддесневом налете увеличивает риск развития хронического генерализованного пародонтита и снижает вероятность достижения положительных результатов при проведении терапевтических мероприятий.

Таким образом, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* обладают пародонтопатогенными свойствами и принимают участие в этиопатогенезе различных форм пародонтита, поэтому рекомендовано считать их пародонтопатогенами 1 порядка (или типа) [2, 42, 43].

Общепринято считать, что пародонтит начинается с появления специфической субгингивальной бактериальной флоры, происходящей из глубоких отделов зоны десневой борозды. Основными представителями биопленки, непосредственно прилегающей к десневому эпителию, являются пигментообразующие бактерии *P. nigrescens* и *P. intermedia*, а также *T. denticola*, которые можно отнести к пародонтопатогенам 2 порядка (или типа) [2, 42, 43].

Prevotella intermedia являются грамотрицательными, неподвижными, палочковидными бактериями, хорошо растущими в анаэробных условиях. Эти микробы одними из первых колонизируют ротовую полость в начале инфекционного процесса, связываясь или прилипая к другим бактериям и эпителиальным клеткам. Инвазия бактерий из биопленки в соединительную ткань считается особенно важным этапом патогенеза пародонтита [46]. Факторами вирулентности этих бактерий являются мембранно-ассоциированные протеиназы, ЛПС и цитотоксические конечные продукты метаболизма, которые способствуют деградации тканей организма хозяина. Цистеиновые протеазы *P. intermedia* отщепляют CD14 и липополисахарид, связывающий белок (LBP), модулируя, таким образом, вирулентность ЛПС. В дозозависимой манере они снижают экспрессию IL-1 β — специфической mRNA на активированных ЛПС макрофагоподобных клетках U937 и THP-1. Гликопротеиновая фракция *P. intermedia* индуцирует экспрессию ICAM-1 на десневых фибробластах, продукцию IL-8, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и ГМСФ эпителиальными клетками. Штамм *P. intermedia* 17, выделяемый из пародонтальных карманов, отличается от других наличием фимбрий. В многочисленных исследованиях было показано, что *P. intermedia* является одним из этиологических факторов пародонтита. Этот вид пародонтопатогенов чаще выявляют в участках с прогрессирующим воспалительным процессом, чем в стабильных участках [16]. Однако в качестве фактора риска этот вид бактерий в настоящее время не рассматривают, так как с помощью современных методов исследований показано, что обычно их выявляют одновременно с другими пародонтопатогенами [41]. Причем *P. intermedia* и *P. nigrescens* выявляют, в основном, в небольших пародонтальных карманах, в тканях перио-

донта и десен при воспалительных процессах, а также в здоровых участках, *P. gingivalis* — в глубоких пародонтальных карманах. В глубоких пародонтальных карманах рО₂ очень низкое, а рН имеет нейтральные значения. Однако в неглубоких пародонтальных карманах при попадании пищи, чистке зубов и т.д. эти условия могут отличаться. *P. gingivalis* растут только в анаэробных условиях и при нейтральных значениях рН, *P. intermedia* могут выживать в щелочной среде. Это может отражаться на разном распределении *P. gingivalis* и *Prevotella* spp. в ротовой полости. *P. gingivalis* не утилизируют сахара, *Prevotella* обладают сахаролитической способностью. Глюкоза не оказывает влияния на проявление вирулентных свойств *P. gingivalis*. Патогенность *P. intermedia* и *P. nigrescens* снижается в присутствии глюкозы, так как при этом они меньше выделяют конечные цитотоксические продукты метаболизма — сукцинат, изобутират, изовалериат и аммоний [36]. Некоторые исследователи считают, что микробиологический скрининг *P. intermedia* и других пародонтопатогенов может быть полезным для прогнозирования исхода пародонтологического лечения, так как при выявлении этого вида микробов вместе с другими при первичном обследовании наблюдается худший эффект от лечения, чем в участках, где этих микробов не определяли. Отрицательные результаты лечения часто связывают с тем, что одним из механизмов выживания превотелл является наличие у них генов резистентности к антибиотикам и способности вырабатывать β-лактамазы [20].

Факторы вирулентности пародонтопатогенных бактерий могут проявлять антагонистические взаимоотношения. Так, пигментообразующие бактерии *P. gingivalis* и, в меньшей степени, *P. intermedia* и *P. nigrescens* выделяют ферменты, разрушающие лейкотоксин *A. actinomycetemcomitans*. К ним относят гингипаины R и K *P. gingivalis*, цистеиновые протеазы *Prevotella* spp. Бактерии, продуцирующие трипсиноподобные ферменты (*Carpocytophaga* spp. и *T. forsythia*) подобной способностью не обладают. По-видимому, патогенные свойства лейкотоксина проявляются больше при локализованной форме пародонтита, когда пародонтальный карман колонизируют только *A. actinomycetemcomitans*. При совместном инфицировании с пигментообразующими бактериями токсическое действие лейкотоксина снижается [21].

С клиническими параметрами хронического пародонтита, особенно с глубокой пародонтальной кармана и кровоточивостью при зондировании, ассоциирован так называемый «красный» комплекс — *P. gingivalis*, *T. forsythia* и *T. denticola*. При этом бактерии выявляли чаще и в большем количестве в глубоких пародонтальных карманах.

Treponema denticola — грамотрицательные, подвижные, асахаролитические, анаэробные бактерии с типичной спиралевидной морфологией. Ультраструктурное строение слоев наружной мембраны *T. denticola* похоже на строение наружной мембраны грамотрицательных бактерий, но липидный состав наружного слоя похож на липотейхоевые кислоты клеточной поверхности грамположительных бактерий. Поэтому текучесть наружной мембраны *T. denticola* более похожа на текучесть мембран грамположительных бактерий, содержащих липотейхоевые кислоты, так как в их мембранах закорены фосфолипид- и глицерол-подобные структуры, содержащие две жирные кислоты (структурно сходные с липотейхоевыми кислотами), а не шесть, как липид А типичного ЛПС [31]. Трепонемальные фосфолипиды индуцируют в дозозависимой манере продукцию медиаторов воспаления, оксида азота, TNF-α и IL-1 макрофагами, отвечающими и не отвечающими на ЛПС. Предполагают, что механизм активации цитокинов и индукции резорбции костей отличается от ЛПС-опосредованной активации. Индукцию ЛПС *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* и *Escherichia coli* может вызвать mRNA RANKL (лиганд рецептора-активатора ядерного фактора κB), регулирующий образование остеокластов и резорбцию костей [12].

Поверхностные компоненты *T. denticola* — олигомерный основной поверхностный белок Msp и протеазный комплекс, кодируемый генами локуса *prcA-prtP*, обладают цитопатической активностью. Msp является пориноподобным белком наружной мембраны, который нарушает метаболизм Ca^{2+} и сборку цитоскелета фибробластов. Основной белок наружной мембраны Msp *T. denticola* связывается с фибронектином, фибриногеном и ламинином, играя важную роль в адгезии к клеткам организма хозяина. Он токсичен для клеток HeLa, оказывает цитотоксическое действие на десневые фибробласты, эпителиальные клетки, лимфоциты и эритроциты. Msp усиливает воспалительный ответ, индуцируя дегрануляцию нейтрофилов, выделение коллагеназ, желатиназ и матриксных металлопротеиназ MMP-8 и MMP-9 [9].

Важными внеклеточными белковыми антигенами *T. denticola* являются протеолитические ферменты. На клеточной поверхности экспрессирована наиболее изученная протеаза — дентилизин или треполизин — хемотрипсин-подобная сериновая протеиназа, гидролизующая фибриноген, трансферрин, желатин, сывороточный альбумин, ламинин, коллаген IV, IgG и IgA *in vitro*, а также деградирующая брадикинин, субстанцию P, ангиотензин I и II, ингибиторы протеаз клеток хозяина, α_1 -антитрипсин, антихемотрипсин, α_2 -макроглобулин, антитромбин III, антиплазмин и цистатин C [28]. PrtP-комплекс с протеазной активностью, состоящий из денсилитина, PrcA1 и PrcA2 протеинов, способствует пенетрации тканей *T. denticola* и модулирует продукцию воспалительных цитокинов. Все они обладают адгезивной способностью и цитотоксической активностью против эпителиальных клеток. PrtP участвует в связывании *T. denticola* с *P. gingivalis* [17].

Некоторые авторы предполагают, что дентилизин играет роль в превращении про-IL-1 β в его биоактивную форму, стимулируя воспалительный ответ. Способность деградировать матриксные белки, белки и пептиды, регулирующие воспаление, может способствовать неконтролируемой деструкции тканей пародонта и способствовать прогрессированию заболевания. Дентилизин индуцирует апоптоз эпителиальных клеток. Пептидазы, локализованные на клеточной поверхности *T. denticola*, нарушают воспалительный ответ, деградируя вазоактивные пептиды, гормоны и нейропептиды. Присутствие *T. denticola* в поддесневом налете коррелировало с трипсиноподобной протеолитической активностью, которая, в свою очередь, коррелировала с клиническими параметрами пародонтита. Так, при инокуляции *T. denticola* в поддесневые участки мышей через 48 часов отмечали значительную гиперемию, на 4 день — формирование абсцессов, максимальные размеры которых достигали на 5 — 7 день. При введении формализированных бактерий такие процессы не развивались [11]. Спирохеты могут составлять до 50% состава микрофлоры в поддесневом налете при язвенно-некротическом гингивите и хроническом генерализованном пародонтите и менее 1% в здоровом пародонте [31]. Основной нишей спирохет ротовой полости является десневая жидкость. Чтобы вызвать заболевание, трепонемы должны прилипнуть к субстрату. *T. denticola* может адгезировать на десневых фибробластах как в аэробных, так анаэробных условиях. Важным этапом колонизации пародонтального кармана является захват железа. *T. denticola* способна утилизировать лактоферрин и железосвязывающий протеин слюны с помощью рецепторов внешней мембраны. Благодаря подвижности *T. denticola* выявляли между клетками эпителия, которые в норме очень плотно соединены, а также в соединительной ткани и на поверхности альвеолярной кости. Они способны двигаться в вязких средах, например, в десневой жидкости, и пенетрировать десневой эпителий и соединительную ткань [9]. При подкожном введении монокультур *T. denticola*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* и неинвазивных штаммов *P. gingivalis* экспериментальным животным в участке инъекции появлялись локализованные абсцессы. Однако инвазив-

ные штаммы *P. gingivalis* W50 и A7A1-28 (ATCC 53977) приводили к обширному язвенно-некротическому повреждению в участках, удаленных от места введения инъекции. При совместном инфицировании *P. gingivalis* — *T. denticola*, *P. gingivalis* — *B. forsythus*, *P. gingivalis* — *F. nucleatum* и *P. gingivalis* — *A. actinomycetemcomitans* наблюдали значительные повреждения и большие проявления вирулентности, по сравнению с моноинфицированием каждым из этих бактериальных видов [12].

Подобная схема введения микробов соответствовала их коаггрегации в организме человека при формировании биопленки, что показано при ее моделировании *in vitro* [1].

Несмотря на то, что вирулентные свойства *T. denticola in vitro* хорошо изучены и, согласно теории Socransky S.S., этот вид микробов относят к «красному» комплексу пародонтопатогенов, этиологическая роль трепонем при пародонтите является предметом дискуссии и в настоящее время.

Это связано с тем, что выделяют около шестидесяти их филотипов, многие из которых не культивируемы. Большинство доказательств этиологической роли *T. denticola* основаны на количественных различиях ее содержания у пациентов с пародонтитом и у пациентов со здоровым пародонтом, их ассоциаций со степенью деструкции костной ткани и изменении клинических и микробиологических параметров при проведении регулярной поддерживающей терапии [12].

Итак, свойства и функции этих видов микробов наиболее соответствуют критериям Коха, модифицированным Socransky S. S. (1989) для инфекций полости рта: исследуемый вид микробов должен быть выявлен в большом количестве в участках с активно прогрессирующим заболеванием, чем в здоровых участках, устранение микробов должно прекращать прогрессирование болезни, патогенный микроб должен обладать факторами вирулентности, обуславливающими процессы деструкции тканей, на пародонтопатоген должен развиваться аномальный клеточный или гуморальный иммунный ответ, патогенный потенциал должен быть выявлен на модельных животных.

По мнению Ezzo P.J. et al. [12] общепризнанные виды пародонтопатогенов являются индикаторами, но не факторами риска, так как вероятность (отношение шансов) развития пародонтита при наличии в участках зубодесневого соединения только одного из них повышается не очень сильно.

Нами на основании изучения клинических, микробиологических и молекулярно-генетических исследований (2007 — 2016 гг.) выделены следующие наиболее значимые критерии диагностики ХГП и прогнозирования осложненного течения этого заболевания [1 — 3]: для подтверждения диагноза хронического пародонтита достаточно идентификации одного или двух видов бактерий 1 порядка: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* или комбинации одного из этих видов с *T. denticola*; пародонтопатогенные виды бактерий 2 порядка: *P. intermedia*, *T. denticola* и другие являются индикаторами риска развития хронического пародонтита, их присутствие необходимо, но не достаточно для развития острого воспаления; *T. forsythia* является безусловным индикатором риска кровоточивости десен; факторами риска ХП могут быть *P. gingivalis* или ассоциации — *T. forsythia* и *T. denticola*; *P. intermedia*, *T. forsythia* и *P. gingivalis*; *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola* и *P. gingivalis*; *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans*

ЛИТЕРАТУРА

1. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидозно-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 2015, 60 (12): 59-64.

2. Николаева Е.Н., Царев В.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии — индикаторы риска возникновения и развития пародонтита. *Стоматология для всех*. 2011, 3: 4-9.
3. Царев В.Н., Николаева Е.Н. Технологии генодиагностики в отечественной стоматологии. *Стоматология*. 2007,5: 82-87.
4. Amano A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontol.* 2000. 2010, 52: 12-37.
5. Amano A., Furuta N., Tsuda K. Host membrane trafficking for conveyance of intracellular oral pathogens. *Periodontol.* 2000. 2010, 52: 84-93.
6. Booth V., Solakoglu Ö., Bavisha N., Curtis M. A. Serum IgG1 and IgG2 antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* in patients with periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 2006, 21 (2): 93-99.
7. Brochut P.F., Grenier D., Nakayama K., Mayrand D. Acquisition of iron from human transferrin by *Porphyromonas gingivalis*: a role for Arg- and Lys-gingipain activities. *Oral Microbiol. Immunol.* 2001,16: 79-87.
8. Chaves E.S., Jeffcoat M.K., Ryerson C.C., Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J. Clin. Periodontol.* 2000,27: 897-903.
9. Chi B., Qi M., Kuramitsu H.K. Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Res. Microbiol.* 2003,154: 637-643.
10. Curtis M.A., Slaney J.M., Aduse-Opoku J. Critical pathways in microbial virulence. *J. Clin. Periodontol.* 2005, 32 (6): 28-38.
11. Ehmke B., Krefi W., Karch H. et al. Interleukin-1 haplotype and periodontal disease progression following therapy. *J. Clin. Periodontol.* 1999. 26: 810-813.
12. Ezzo P.J., Cutler C.W. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2003,32: 24-35.
13. Feng Z., Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology* 2000. 2006, 40 (1): 50-76.
14. Feucht E.C., DeSanti C.L., Weinberg F. Selective induction of human beta-defensin mRNAs by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in primary and immortalized oral epithelial cells. *Oral Microbiol. Immunol.* 2003,18: 359-363.
15. Figueira E.A., de Rezende M.L., Torres S.A. et al. Inhibitory signals mediated by programmed death-1 are involved with T-cell function in chronic periodontitis. *J. Periodontol.* 2009, 80 (11): 1833-1844.
16. Hashimoto M., Asai Y., Tamai R. et al. Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 lipopolysaccharide. *FEBS Letters.* 2003, 543: 98-102.
17. Hashimoto M., Ogawa S., Asai Y. et al. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to *Treponema denticola* dentilisin. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 226: 267-271.
18. Heitz-Mayfield L.J. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2005, 32 (6): 196-209.
19. Houle M.-A., Grenier D., Plamondon P., Nakayama K. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 221: 181-185.
20. Iwahara K., Kuriyama T., Shimura S. et al. Detection of *cfxA* and *cfxA2*, the β -lactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar infection by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 449 (1): 172-176.
21. Johansson A., Hånström L., Kalfas S. Inhibition of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxicity by bacteria from the subgingival flora. *Oral Microbiol. Immunol.* 2000, 15: 218-225.
22. Kelk P., Claesson R., Hanstrom L. et al. Abundant secretion of bioactive interleukin — I beta by human macrophages induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.* 2005, 73: 453-458.
23. Kim T.S., Frank P., Eickholz P. et al. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *J. Periodontol.* 2009, 80 (12): 2020-2027.
24. Lee J.Y. *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein vaccine reduces the alveolar bone loss induced by multiple periodontopathogenic bacteria. *J. Periodontol. Res.* 2006, 41 (1): 10-14.
25. Liu Y.C., Lerner U.H., Teng Y.T. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol.* 2000. 2010, 52: 163-206.

26. Mahanonda R., Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology*. 2000. 2007, 43: 41-55.
27. Millhouse E., Jose A., Sherry L. Development of an in vitro periodontal biofilm model for assessing antimicrobial and host modulatory effects of bioactive molecules. *BMC Oral Health*. 2014, 14 (80). doi:10.1186/1472-6831-14-80.
28. Moter A., Riep B., Haban V. et al. Molecular epidemiology of oral treponemes in patients with periodontitis and in periodontitis-resistant subjects. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44 (9): 3078-3085.
29. Mullally B.H., Dace B., Shelburne C.E. et al. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *J. Periodont. Res.* 2000, 35: 232-241.
30. Nunn M.E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontology*. 2000. 2003, 32: 11-23.
31. O'Brien-Simpson N.M., Veith P.D., Dashper S.G., Reynolds E.C. Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontology*. 2000. 2004, 35: 101-134.
32. Offenbacher S., Zambon J.J. Consensus report for periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann. Periodontol.* 1996, 1: 926-932.
33. Paquette D.W., Madianos Ph., Offenbacher S. et al. The concept of «risk» and the emerging discipline of periodontal medicine. *J. Contemp. Dent. Practice*. 1999, 1: 1.
34. Paster B.J., Olsen I., Aas J.F., Dewhirst F.E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology*. 2000. 2006, 42: 80-87.
35. Rudney J.D., Chen R., Sedgewick G.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J. Dent. Res.* 2005, 84: 59-63.
36. Saito K., Takahashi N., Horiuchi H., Yamada T. Effects of glucose on formation of cytotoxic end-products and proteolytic activity of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodont. Res.* 2001, 36: 355-360.
37. Schenkein H.A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology*. 2000. 2006, 40 (1): 77-93.
38. Schmidt H., Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, 17 (1): 14-56.
39. Socransky S. S., Haffajee A. D., Cugini M. A. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontology*. 1998, 25: 134-144.
40. Suda R., Kobayashi M., Nanba R. et al. Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students. *J. Periodontol.* 2004, 75 (8): 1084-1089.
41. Tanaka S., Minami M., Murakami Y. et al. The detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in tooth, tongue and buccal mucosa plaques in children, using immunoslot blot assay (IBA). *Pediatr. Dent.* 2006, 30 (3): 251-256.
42. Tanner A.C.R., Kent R. Jr., Dyke Van T. et al. Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. *J. Periodontol.* 2005, 76 (4): 573-581.
43. Tanner A.C.R., Paster B.J., Lu S.C. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. *J. Dent. Res.* 2006, 85 (4): 318-323.
44. Tran S.D., Rudney J.D., Sparks B.S., Hodges J.S. Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. *J. Periodontol.* 2001, 72 (1): 1-10.
45. Trevisatto P.C., Tramontina V.A., Machado M.A.N. et al. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2002, 29: 233-239.
46. Tribble G.D., Lamont R.J. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontol.* 2000. 2010, 52: 68-83.
47. Wang P.L., Ohura K. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts — CD14 and Toll-like receptors. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002, 13: 132-142.
48. Yoshioka M., Grenier D., Hinode D. et al. Antigenic cross-reactivity and sequence homology between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* GroEL protein and human fibronectin. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004, 1: 19: 124-128.

Поступила 08.12.16

Контактная информация: Царев В.Н., д.м.н., проф.,
124473, Москва ул. Делегатская, 20, стр. 1, р.т. (495)609-67-00

Л.А.Горелова, В.В.Царева, М.В.Витович

ЦЕФТАРОЛИН ПРОТИВ СТАФИЛОКОККА И ДРУГИХ «СУПЕРБАКТЕРИЙ»

Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова

Цефтаролин – цефалоспориновый антибиотик 5 поколения, проявляющий значимую активность в отношении многих возбудителей инфекций человека. Цефтаролин обладает более выраженной бактерицидной активностью по сравнению с другими бета-лактамами при инфекциях, обусловленных штаммами метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* (соответственно MRSA и MRSE), грамотрицательными «супербактериями» родов *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacteroides* и др. при внебольничной пневмонии, инфекциях кожи и мягких тканей. В статье приведены современные данные, полученные *in vitro* и *in vivo* против биопленок, а также результаты клинических исследований цефтаролина.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 113—119

Ключевые слова: цефтаролин, внебольничная пневмония, инфекции кожи и мягких тканей, биопленка, клеточный заряд

L.A.Gorelova, V.V.Tsareva, M.V.Vitovich

CEFTAROLINE AGAINST STAPHYLOCOCCUS AND OTHER SUPER-BACTERIA

Evdokimov Moscow State Medical-Stomatological University, Russia

Ceftaroline is a 5th generation cephalosporin antibiotic active against numerous causative agents of human infections. Ceftaroline has a more pronounced bactericidal activity compared with other beta-lactams during infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (MRSA and MRSE, respectively), gram-negative super-bacteria of *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacteroides* etc. genera during community-acquired pneumonia, infections of the skin and soft tissues. Contemporary data obtained *in vitro* and *in vivo* against biofilms as well as results of clinical trials of ceftaroline are provided in the paper.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 113—119

Key words: ceftaroline, community-acquired pneumonia, skin and soft tissue infections, biofilm, cell charge

Два ключевых процесса свидетельствуют об экологической пластичности бактерий: устойчивость к антибиотикам и биопленкообразование, которые, как оказалось по данным последних исследований, тесно связаны между собой [8, 9, 15, 17, 21, 22, 24].

Феномен устойчивости к лекарственным препаратам (антибиотикам) следует рассматривать как одно из проявлений микроорганизмов выжить в неблагоприятных условиях, закрепить себя в экологической нише биосферы, в том числе, в организме человека. Антибиотикорезистентность — это всегда нарушение взаимодействия антибиотика и его мишени. Появление и распространение приобретенной резистентности у возбудителей инфекций невозможно прогнозировать. Следует отметить, что в последнее время промежуток между использованием нового препарата и появлением к нему устойчивости все более сокращается [7, 12].

Антибиотикорезистентность и бета-лактамазы у стафилококка. Классическим примером распространения устойчивости в микробных популяциях, как известно, являются стафилококки. Представители рода *Staphylococcus* принадлежат к наиболее распространенным объектам инфекционной патологии человека. Наибольшее значение в медицинской микробиологии имеют золотистый (*S. aureus*) и эпидермальный (*S. epidermidis*) стафилококки [3, 4].

Образование мощного пептидогликанового каркаса прокариот (и стафилококка, в том числе) совершается при участии большой группы белков и ферментов. Эти белки известны как пенициллинсвязывающие белки (ПСБ), потому что служат мишенью для бета-лактамных антибиотиков. Ингибирование ПСБ — основа бактерицидного действия бета-лактамных антибиотиков. Основным эффектом обусловлен образованием необратимого комплекса ацил-фермент, сопровождающегося разрывом связи C-N в четырехчленном цикле, входящем в структурное ядро всех бета-лактамных антибиотиков. Почти все антибиотики, блокирующие синтез клеточной стенки, относятся к семейству бета-лактамов (бета-лактамное кольцо, связываясь с транспептидазами, препятствует завершению синтеза пептидогликанового каркаса).

Чрезвычайная актуальность проблемы стафилококковых инфекций обусловлена феноменом устойчивости возбудителей к лечебным препаратам, которая связана, в частности, с продукцией бета-лактамаз [5]. Стафилококковые бета-лактамазы представляют однородную группу ферментов, практически не различающихся по основным свойствам. Продукция ферментов носит индуцибельный характер [12]. Столь быстрое распространение устойчивости среди стафилококков объясняется плазмидной локализацией генетических детерминант резистентности [Лямин А.В., 2012].

Легкость передачи плазмид лежит в основе эпидемического распространения антибиотикорезистентности в условиях лечебного учреждения. Человечество создает все новые и новые антибиотики, однако возбудители инфекций, приобретая резистентность, снова проявляют эпидемическую активность, и разработанные антибиотики становятся неэффективными.

Анализ ПСБ и бета-лактамаз подтвердил гипотезу о наличии общего предшественника у этих белков. Основным механизмом, обеспечивающий устойчивость большинства клинических штаммов бактерии к бета-лактамам, является наличие у этих штаммов одной или нескольких бета-лактамаз [10, 12]. В настоящее время известно несколько сотен различных бета-лактамаз [Фурсова Н.К., 2014], и количество вновь открываемых нарастает до нескольких десятков в год.

Таким образом, приобретенная устойчивость бактерий против пенициллинов и цефалоспоринов связана с продукцией ими бета-лактамаз — ферментов, которые разрушают активный центр бета-лактамных антибиотиков.

Для ингибирования этих факторов устойчивости бактерий разработаны препараты, имеющие структурное сходство с бета-лактамным кольцом основных классов этих антибиотиков: пенициллинов — клавулановая кислота, цефалоспоринов — сульбактам, карбапенемов — тазобактам [11]. Вступая в прочную связь с бета-лактамазами, они конкурентно препятствуют их взаимодействию с антибиотиком (бета-лактамом) [11, 12].

Формирование резистентности у стафилококка во всех случаях обусловлено или приобретением новой генетической информации, или изменением уровня экспрессии собственных генов. Мутации генов, кодирующих ПСБ у микроорганизмов рода *Staphylococcus*, привели к появлению у них нового пенициллинсвязывающего белка (ПСБ 2a), обладающего пониженной аффинностью к бета-лактамным антибиотикам. ПСБ 2a кодируется геном *tes A*, входящим в состав подвижного генетического элемента «стафилококковой хромосомной кассеты

мес А» [Мальцева Г.С., 2015]. В результате этой мутации появились и получили широкое распространение стафилококки, обладающие резистентностью ко всем бета-лактамам — метициллинрезистентные стафилококки (MRSA). В настоящее время четверть штаммов *S. aureus*, выделенных от амбулаторных пациентов, это MRSA. В стационаре доля таких штаммов увеличивается до 46,9%, в клинических и реанимационных отделениях — до 71,7% [Божкова С.А. и др., 2011].

По данным ВОЗ распространенность MRSA в стационарах России — 66,8 %. Из года в год наблюдается тенденция к распространению MRSA и *S. aureus* с MRS-профилем резистентности [6]. Одновременно отмечено появление данного признака у *S. epidermidis* (MRSE) и некоторых грамотрицательных возбудителей внутрибольничной инфекции и при одонтогенной инфекции [6, 11, 16, 18, 22]. Катастрофически быстрое развитие антибиотикоустойчивости оказалось уникальным не только для стафилококка.

Антибиотикорезистентность и биопленкообразование. Для выживания и размножения в организме человека микробы применяют разнообразные способы, одна из таких стратегий — биопленка [17]. Бактерии внутри биопленки приобретают особые формы резистентности: увеличивается количество особых форм бактерий — персистеров (клетки в состоянии метаболической инертности). Фильтрующая структура матрикса препятствует проникновению антибиотиков в глубокие слои биопленки и мешает взаимодействовать с бактериальными клетками. В условиях тесного контакта бактерий внутри биопленки успешнее реализуется межвидовая передача генов антибиотикорезистентности. Клетки микробов в составе биопленки менее доступны фагоцитам по сравнению с планктонными клетками.

Считается, что до 80% инфекционной патологии человека может быть связано с формированием биопленки. Инфекции, патогенез которых детерминирован микробными биопленками, называются биопленочными инфекциями [21].

С наибольшей частотой из биопленки при хроническом риносинусите исследователи выделяли золотистый стафилококк (50%), гемофильную палочку (28%) [4]. *S. aureus* является одним из основных возбудителей инфекционного эндокардита как при поражении нативных клапанов, так и протезированных (45,6% и 47,8% соответственно). Одним из доминирующих возбудителей инфекционного эндокардита с поражением клапанов является *S. aureus* — 74,6%, из которых 2/3 штаммов были MRSA. При этом среди MRSA процент биопленкообразующих штаммов *in vitro* может достигать до 96% [22].

В совместных исследованиях, выполненных в Центре сердечно-сосудистой хирургии им. Бакулева и на кафедре микробиологии Московского государственного медико-стоматологического университета им. Евдокимова, установлено, что в биопленке клапанов сердца при инфекционном эндокардите обнаруживается не только стафилококк, но также оральные стрептококки и анаэробы, причем доминирующими видами были *Enterococcus spp.* (до 33,3%), *Streptococcus sanguis* и *Prevotella intermedia* (до 20%), что подтверждено данными молекулярно-биологического исследования [2, 3, 13].

Очевидна потребность в применении новых подходов к лечению биопленочных инфекций. Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам в планктонной фазе в 10 — 1000 раз выше, чем у микроорганизмов в составе биопленки [8]. Известен парадоксальный факт — значительное усиление биопленочного роста *Staphylococcus caritis* в присутствии максимальных терапевтических концентраций оксациллина [Лямин А.В., 2012].

Общепринято, что биопленки развиваются на любом материале, контактирующем с движущейся жидкостью, где в принципе могут существовать микро-

организмы [8, 21]. Совершенствование медицинских технологий, в том числе широкое использование искусственных имплантируемых и внутрисосудистых устройств, создало экологическую нишу для микроорганизмов. Ни один из используемых для создания имплантатов материалов не является биологически инертным. В наибольшей степени адгезии микроорганизмов способствуют полиэтиленовые, поливиниловые и полиакриловые устройства (протезы), в наименьшей степени — силиконовые, тефлоновые и полиуретановые. Показано, что смешанная биопленка *S. sanguis* и грамотрицательных анаэробных бактерий полости рта (фузобактерии и порфиромонас) начинается с процесса адгезии и успешно воспроизводится *in vitro* в условиях движения жидкости и анаэробноза на полиметилметакрилате и полиуретане [8, 9, 15].

Искусственные материалы, из которых сделаны медицинские устройства в условиях биопленочной инфекции, быстро покрываются растворимыми белками хозяина (коллаген, фибронектин, альбумин, факторы комплемента и др.). Установлено, что именно стафилококки и стрептококки выступают в роли инициаторов биопленочного процесса, подготавливая почву для других организмов. Прикрепление кокков к поверхности полимерного субстрата продемонстрировано с помощью сканирующей электронной микроскопии при формировании биопленки *in vitro* и, очевидно, опосредуется микробными поверхностными компонентами, распознающими адгезивные матриксные молекулы [1, 8]. Как оказалось, золотистый стафилококк имеет более 20 белковых молекул, ковалентно связанных с пептидогликаном клеточной стенки. Поверхностный белок — Sas G имеется у всех клинических штаммов *S. aureus*. В комплексе с ионами Zn он необходим для построения биопленки [17].

Из биопленки пародонтальных карманов больных хроническим генерализованным пародонтитом выделены антибиотикорезистентные штаммы бактерий [8], у которых обнаружены гены СТХ-М-2, Мес-1, NDM. Ген СТХ-М-2, ответственный за резистентность к цефалоспорином 1 типа, выявлен у *S. sanguis* (2 штамма), *S. salivarius* (1 штамм), *Staphylococcus spp.* (2 штамма), *E. faecalis* (1 штамм), *K. pneumoniae* (1 штамм), *V. parvula* (1 штамм), то есть у 8 из 30 исследованных штаммов, что составило 26,6%. Другой ген, контролирующей резистентность к цефалоспорином — Мес-1, выявляли реже — у *S. sanguis* (2 штамма) и *S. aureus* (1 штамм), то есть у 3 из 30 штаммов (частота 10%). Ген резистентности к карбапенемам — VIM был выявлен у 1 штамма *Pseudomonas aeruginosa* (частота 3,3%). Другой ген, кодирующий резистентность к карбапенемам 2 типа — NDM — выявлен у 1 штамма *K. pneumoniae* (частота 3,3%) И наконец, третий ген этой группы — OXA-48 не выявлен ни в одном случае.

Среди так называемых пародонтопатогенных видов, которые являются облигатными анаэробами и которые образовывали биопленку *in vitro*, наиболее часто определяли ген резистентности к цефалоспорином СТХ-М-2. Он был выявлен у *T. forsythia* (1 штамм), *P. gingivalis* (1 штамм), *P. intermedia* (1 штамм), *P. micra* (1 штамм), *S. intermedius* (2 штамма), то есть у 6 из 36 исследованных штаммов пародонтопатогенов, что составило 16,7%. Другой ген, контролирующей резистентности к цефалоспорином — Мес-1, выявляли реже — только у *T. forsythia* (1 штамм) и *P. gingivalis* (1 штамм)], то есть у 2 из 36 (частота 5,5%). Ген резистентности к карбапенемам — VIM был выявлен у 1 штамма *P. micra* (частота 2,8%). Гены резистентности NDM и OXA-48 у представителей пародонтопатогенной флоры не выявлены ни в одном случае [8].

Таким образом, биопленка способствует главной стратегической цели патогенов — выживанию вида и его адаптации в организме хозяина в условиях проводимого антибактериального лечения.

Место цефтаролина в современной антибактериальной терапии. Цефтаролин

— цефалоспорины новой генерации (5 поколение) [14]. На фоне растущей устойчивости возбудителей инфекций к антимикробным препаратам особенно актуальным становится вопрос об эффективности цефтаролина, имеющего ряд преимуществ по сравнению с другими цефалоспоринами [14].

Цефтаролин — активный метаболит цефтаролина фосамила, по сути, представляющий из себя пролекарство. В отличие от других бета-лактамов цефтаролин обладает высокой аффинностью в отношении двух белков — ПСБ 2а и ПСБ 2х, определяющих устойчивость к метициллину у *S. aureus* и к пенициллину у *S. pneumoniae* соответственно. Аффинность цефтаролина ко всем шести ПСБ пневмококка обуславливает его активность в отношении штаммов, устойчивых к пенициллину, амоксиклаву, макролидам и фторхинолонам [23].

Важным свойством препарата является активность в отношении MRSA, устойчивых к другим классам анти-MRSA антибиотиков. В ряде экспериментальных работ установлена активность цефтаролина в отношении штаммов MRSA в составе микробных биопленок [19]. Доказана также высокая активность препарата в отношении резистентных стафилококков — возбудителей осложнений в отделениях реанимации и интенсивной терапии [Farrell et al., 2012].

Изучено проникновение цефтаролина в легочную ткань: у здоровых добровольцев 23% свободного цефтаролина проникает из плазмы крови в альвеолярную жидкость. Достижимая концентрация достаточна для лечения пневмонии, вызванной *S. aureus* и *S. pneumoniae*. Связывание препарата с белками плазмы составляет 20%. Система цитохрома P 450 не задействована в метаболизме цефтаролина, что объясняет хорошую переносимость и отсутствие риска лекарственных взаимодействий [20].

Активность цефтаролина против анаэробов достаточно высока, особенно в отношении грамотрицательных представителей родов *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, но отсутствует в отношении *Bacteroides fragilis* [20, 23]. В то же время, весьма ограниченной оказалась активность цефтаролина в отношении атипичных микроорганизмов и неферментирующих грамотрицательных *Pseudomonas aeruginosa* и *Actinobacter spp.* Важно, что цефтаролин способен уменьшать поверхностный заряд бактерий. Такие протезные материалы, как полистирол и стекло, имеют небольшой негативный поверхностный заряд. Поэтому подобное изменение заряда может ослабить притяжение биопленкообразующих организмов к протезным материалам.

Наиболее распространенный подход к преодолению биопленкообразования — комбинированная антибактериальная химиотерапия. Оценена активность цефтаролина, как отдельно, так и в комбинациях с другими препаратами. При этом показано, что он проявляет синергизм действия против биопленочной активности MRSA. Так, установлена эффективность комбинации цефтаролина с ванкомицином и даптомицином. Цефтаролин по сравнению с даптомицином имеет преимущества против резистентных *S. aureus*, а по сравнению с ванкомицином — преимущества против *S. aureus* со средней чувствительностью, благодаря так называемому «эффекту качелей» [19].

Несмотря на большой теоретический материал и важность проблемы, остаются нерешенными многие вопросы лечения биопленочных инфекций. Безусловно, феномен коллективного поведения бактерий при действии антибиотиков является предметом крайне перспективного изучения. Окончательного мнения о том, какой препарат следует применять в терапии биопленочного MRSA, MRSE или других полирезистентных возбудителей, соответствующих термину «супербактерии», к настоящему времени не сложилось. Однако не стоит недооценивать значение традиционной системной антибактериальной терапии для эрадикации биопленки. Приведенные в настоящем обзоре литературные данные позволяют

надеяться, что цефалоспорин новой генерации — цефтаролин наряду с другими современными антибиотиками займет важное место в борьбе с мультирезистентными «супербактериями».

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.А. Биодеструкция зубных протезов из полимерных материалов (экспериментальное исследование). Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 2013.
2. Бокерия Л.А., Саркисян М.А., Муратов Р.М., Шамснев Г.А. Результаты бактериологического исследования у пациентов, перенесших операцию на открытом сердце. Медицина критических состояний. 2009, 4 (4): 15-20.
3. Бокерия Л.А., Муратов Р.М., Шамснев Г.А. и др. Антибиотикопрофилактика при стоматологических хирургических вмешательствах у пациентов, перенесших операцию на открытом сердце, на основании результатов молекулярно-биологических исследований. Dental forum. 2009, 16 (4): 11-13.
4. Голуб А. В. Бактериальные биопленки — новая цель терапии. Клини. микробиол. анти-микроб. химиотер. 2012, 14 (1): 25.
5. Дехнич А.В., Эдельштейн И.А., Нарезкина А.Д. и др. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в России: результаты многоцентрового исследования. КМАХ. 2002, 4 (4): 325-336.
6. Дехнич А. В. Терапия нозокомиальных стафилококковых инфекций в России: время менять стереотипы. Врач. 2010, 10 (5): 1-4.
7. Душкина Н.В., Титов Р.Н., Батищева Г.А. и др. Структура и антибиотикорезистентность ведущих возбудителей послеоперационных раневых инфекций. КМАХ. 2016, 18 (2): 20-25.
8. Ипполитов Е.В. Мониторинг формирования микробной биопленки и оптимизация диагностики воспалительных заболеваний пародонта. Автореф. дис. д.м.н. М., МГМСУ, 2016.
9. Ипполитов Е.В., Царев В.Н., Автандилов Г.А. и др. Микробные биопленки на поверхности стоматологических полимерных материалов как основной фактор персистенции микроорганизмов при патологии зубов и пародонта. Российская стоматология. 2016, 9 (1): 92-93.
10. Кимайкина О.В., Григоричева Л.К., Бурков Д. В. и др. Анализ инфекционных осложнений и результатов микробиологической диагностики пациентов группы риска при оперативных вмешательствах на стопе и голеностопном суставе. КМАХ. 2016, 18 (2): 25-36.
11. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам М., Медицина, 2004.
12. Фурсова Н. К. Лекарственная устойчивость микроорганизмов. М., Онто-Принт, 2012.
13. Царев В. Н., Николаева Е. Н., Саркисян М. А. Выявления маркеров пародонтопатогенных бактерий у пациентов с инфекционным эндокардитом. Российский стоматологический журнал. 2009, 2: 32-34.
14. Царев В. Н., Балмасова И. П., Еремина О. Ф. Бета-лактамы: цефалоспорины. В: Антибиотики и противоинфекционный иммунитет. Под ред. Н.Д.Ющука, И.П.Балмасовой, В.Н.Царева. М. Практическая медицина, 2012, с. 56-78.
15. Царев В.Н., Ипполитов Е.В., Трефилов А.Г. и др. Особенности адгезии анаэробных пародонтопатогенных бактерий и грибов *Candida albicans* к экспериментальным образцам базисной стоматологической пластмассы в зависимости от шероховатости поверхности и способа полировки. Журн. микробиол. 2014, 6: 21-27.
16. Царев В.Н., Лабазанов А.А., Ипполитов Е.В. и др. Проблема устойчивости возбудителей одонтогенной инфекции к антибиотикам и разработка экспресс-метода выявления резистентных штаммов. Клиническая стоматология. 2016, 3 (79): 26-31.
17. Чеботарь И.В. Биопленки *Staphylococcus aureus*: структурно-функциональные характеристики и взаимоотношения с нейтрофилами. Дисс. д.м.н., 2015.
18. Anderl J.N., Franklin M. J., Stewart P.S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2000, 44: 1818-1824.
19. Barber K. E., Werth B.L., Mc Roberts I.P. et al. Novel asses the bactericidiae activiti of ceftaroline combindions agains biofilm producing methicillin-resisten *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 2014, 58 (5): 2989-2999.

20. Flamm R.K., Sader H.S., Farrell D.J. et al. Summary of ceftaroline activity against pathogens in the United States, 2010: report from the Assessing Worldwide Antimicrobial Resistance Evaluation (AWARE) surveillance program. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56 (6): 2933-2940.
21. Lynch A.S. Bacterial and fungal biofilm infection. *Annu. Rev. Med.* 2008, 59: 415-428.
22. Szczuka E., Urbanska K., Pieryka M., Kaznowski A. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol.* 2013, 58 (1): 47-52.
23. Saravolatz L.D., Stein G.E., Johnson L.B. Ceftaroline: a novel cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 2011, 52: 1156-1253.
24. Tetz G.V., Artemenko N.K., Tetz V.V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 2009, 53 (3): 1204-1209.

Поступила 15.02.17

Контактная информация: Горелова Л.А.,
124473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1, р.т. (495)609-67-00

ИСТОРИЯ НАУКИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Б.Г.Андрюков, Л.М.Сомова, Н.Ф.Тимченко

ЭВОЛЮЦИЯ ПОНЯТИЯ САПРОНОЗЫ И ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ КОНЦЕПЦИИ ПАРАЗИТИЗМА В ИНФЕКТОЛОГИИ

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, Владивосток

B.G.Andryukov, L.M.Somova, N.F.Timchenko

EVOLUTION OF THE SAPRONOSIS NOTION AND TRANSFORMATION OF THE ENVIRONMENTAL CONCEPT OF PARASITISM IN INFECTOLOGY

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 119—126 (*Zh. Mikrobiol., Moscow, 2017, No. 5, P. 119—126*)

К 100-летию со дня рождения академика Г.П.Сомова

В последнее время наблюдается повышенное внимание к изучению экологии патогенных микроорганизмов, находящейся на стыке паразитологии, микробиологии и эпидемиологии. Это связано, в частности, с совершенствованием методов, которые дают возможность характеризовать микробные сообщества в такой степени, какая была бы немыслима всего лишь несколько лет назад. Завоевывает все большее признание значение патогенных и условно патогенных микроорганизмов, способных размножаться во внешней среде, в здоровье человека и состоянии природных экосистем. Возможность существования и размножения некоторых патогенных микроорганизмов в окружающей среде в наши дни не вызывает сомнений, однако так было не всегда.

Значительная часть важнейших экологических концепций была разработана без изучения экологии микроорганизмов, которые представляют собой основную часть

филогенетического и функционального разнообразия на Земле. Это, отчасти, явилось следствием несравненно большей методологической сложности наблюдения бактерий в природе и их популяционного анализа. Очевидно, что экология патогенных микроорганизмов как научное направление в том виде, в каком она представлена сегодня, является продуктом исторического противостояния самых различных научных концепций и взглядов. Они в течение длительного времени определяли пути развития микробиологии, экологии, эпидемиологии и патогенеза инфекционных болезней [5 — 7].

Сегодня трудно представить себе возможность появления экологической микробиологии без победы экологической концепции. Она легла в основу эволюционной теории о сапронозах, у истоков которой стоял Георгий Павлович Сомов.

В 1988 году была опубликована монография Г.П.Сомова и В.Ю.Литвина «Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий: экологические аспекты». В этом труде были не только подведены итоги научного противостояния, но и дано обоснование возможности непаразитического существования патогенных бактерий, что даже в тот период воспринималось весьма болезненно в научном мире, где господствовала антропоцентрическая концепция. Академик Д.К.Львов, автор предисловия к монографии, отметил «экологичность» и новизну теоретических позиций авторов, по сути, предвосхитивших рождение новой науки — экологической микробиологии [5].

В эпидемиологии инфекционных болезней долгое время существовало представление о том, что патогенные микроорганизмы могут размножаться и длительное время выживать только в теплокровном организме, попадая же в иные условия, они погибают. Это положение было приемлемо для облигатных паразитов, которые имеют единственную среду обитания — теплокровный организм. Внешней среде отводилось мало места в экологии патогенных микроорганизмов.

В классической паразитологии, изучающей широкий спектр патогенных простейших и гельминтов, совершенно неоправданно выпадают из поля зрения патогенные микроорганизмы (вирусы, бактерии и грибы), паразитическая природа которых традиционно изучается независимо и параллельно [2]. Такая же ситуация сохраняется до настоящего времени. Очевидно, что она во многом связана с острой дискуссией, развернувшейся в отечественной науке вокруг понятия паразитизма микроорганизмов, проходившей на протяжении XX века.

Ф.Барнет (1947), Ш.Д.Мошковский (1946), В.С.Киктенко (1954) и Л.В.Громашевский (1965) считали средой обитания патогенных бактерий только организм хозяина. Что это может быть не только организм хозяина, но и внешняя среда, утверждали Е.Н.Павловский (1934), А.А.Филипченко (1937), В.А.Догель (1947), В.Н.Беклемишев (1970). В.В.Скворцов (1930) и Н.Р.Дядичев (1947) постулировали, что средой обитания патогенных бактерий может быть только внешняя среда.

В основе противоречивости суждений научного спора о возможных экологических свойствах бактериальных паразитов стояли различные эпидемиологические подходы того времени: антропоцентрический и экологический.

В 1958 году известный отечественный микробиолог В.И.Терских в статье «Сапронозы (о болезнях людей и животных, вызванных микробами, способными к размножению во внешней среде)» предложил выделить группу патогенных микроорганизмов (сапрофитов), свободно живущих в природе видов. Они, являясь сочленами естественных биоценозов, способны длительное время существовать и размножаться во внешней среде, не нуждаясь в теплокровном организме [9]. На основании эколого-эпидемиологического своеобразия инфекции, вызываемые этими возбудителями, автор назвал сапронозами. Несмотря на то, что данное положение основывалось на известных к тому времени фактах, предложение В.И.Терских не было принято, а сама новаторская работа и ее автор подверглись в научном мире резкой критике. Новое теоретическое обобщение вступало в противоречие с основными законами эпидемиологии, сформулированными в 1950-е годы академиком Л.В.Громашевским [1].

Относительно источника заразного начала в природе (только зараженный чело-

веческий или животный организм) в 1949 г. Л.В.Громашевский так сформулировал один из основных законов эпидемиологии: «Паразитарная природа возбудителей инфекций определяется отношением их к разным элементам внешней среды. Ни один из них не может быть первоначальным и постоянным носителем заразного начала. Все наши знания в этой области дают основание считать внешнюю среду для патогенных микробов чужеродной средой, в которой паразит не может найти благоприятных для своего существования условий» [1]. По логике Л.В.Громашевского паразит перестает быть паразитом, если он сохраняется и размножается в объектах внешней среды.

Таким образом, критика со стороны сторонников официальной отечественной эпидемиологии привела к тому, что новые идеи В.И.Терских были не приняты, а представление о сапронозах было полностью исключено из эпидемиологии и даже не упоминалось в учебниках, что задержало ее развитие на 25 — 30 лет [5, 6].

Однако многочисленные данные, полученные отечественными и зарубежными учеными при изучении экологии возбудителей псевдотуберкулеза, лептоспироза, листериоза, мелиоидоза, легионеллеза и сибирской язвы свидетельствовали о возможности размножения и обитания ряда патогенных бактерий в окружающей среде и, следовательно, о доказательстве ее резервуарной роли [3, 6, 8, 15].

В основе патогенных свойств возбудителей сапронозов лежат генетически детерминированные факторы и свойства (адгезины, инвазины, ферменты, токсины и др.). Они сформировались в процессе эволюции для существования в объектах окружающей среды и проникновения в клетки и ткани представителей почвенной, пресноводной, морской флоры и фауны [7]. Эти универсальные факторы патогенности благодаря комплементарности детерминант могут действовать на химически аналогичные мишени как в объектах внешней среды, так и в организме теплокровных животных и человека [5, 7].

Таким образом, адаптивные факторы, сформировавшиеся у сапрофитов в процессе эволюции для обитания в окружающей среде, становятся факторами патогенности при взаимоотношении их с теплокровным организмом, обеспечивая возникновение инфекционного процесса.

Положение о существовании большой группы факультативных паразитов, которые могут существовать в жизненном цикле две среды обитания — внешнюю среду и организм теплокровных животных, подвергал корректировке первый закон эпидемиологии. Становилось все очевиднее, что резкая граница между паразитизмом и иными формами симбиоза отсутствует, а патогенность не является исключительным свойством определенного микроорганизма [цит. по 6].

Кроме указанной группы непатогенных сапрофитов (истинные, облигатные) выделяется группа возбудителей сапронозов, которые обладают двойственной (сапрофитной и паразитической) природой и способны в зависимости от среды обитания вести «двойной» образ жизни. Жизненный цикл таких факультативных паразитов состоит в непрерывном переходе их из окружающей среды (сапрофитная фаза) в организм теплокровных, где они реализуют свои паразитические свойства.

Как показали дальнейшие исследования, возбудители сапронозов и сапрозоонозов могут длительно существовать, размножаться, сохранять и повышать свою вирулентность при взаимодействии с почвенной и водной (в т.ч. морской) биотой за счет селективного отбора наиболее жизнеспособных клонов [3, 14].

Целесообразность выделения такой группы факультативных паразитов (Г.П. Сомов считал удачным для этой группы инфекций термин «сапрозоонозы») поддерживают многие ученые, обоснованно отделяя ее от группы истинных сапронозов [5, 7].

Характеристика источника инфекции является одним из ключевых понятий современной эпидемиологии. Согласно современному представлению, по основному экологическому признаку — резервуару возбудителя — все инфекционные заболевания человека могут быть классифицированы в зависимости от источника инфекции и экологической специфичности связей возбудителей с хозяевами на антропонозы, зоонозы и сапронозы.

Антропонозы (от греч. антропос — человек, нозос — болезнь) являются примером наиболее простой паразитической системы — возбудитель-человек [5, 15]. При антропонозах возбудитель и человек (организм-хозяин) тесно взаимосвязаны. Резервуаром возбудителя является больной человек или носитель бессимптомной формы инфекции. Передача возбудителя от человека к человеку является типичной. Источником инфекции при антропонозе является только человек: больной, реконвалесцент или носитель бессимптомной формы инфекции. Животные к возбудителям антропонозов, как правило, не восприимчивы [14].

Типичными микробными антропонозами являются брюшной тиф (возбудитель — *Salmonella typhi*), дизентерия (*Shigella* spp.), коклюш (*Bordetella pertussis*), дифтерия (*Corynebacterium diphtheriae*), сифилис (*Treponema pallidum*), гонорея (*Neisseria gonorrhoeae*) и другие.

Зоонозы (от греч. зоо — животное, нозос — болезнь) — это инфекции, естественным образом передающиеся от позвоночного животного человеку (ВОЗ) [цит. по 14]. Этот термин был предложен Рудольфом Вирховом в 1855 году. Резервуаром возбудителя являются популяции определенных видов животных. Как правило, зоонозы характеризуются более сложной паразитарной системой как в структурном, так и в функциональном отношении. Специфичность взаимоотношений возбудитель-хозяин имеет экологическую природу. Высокая экологическая пластичность возбудителей зоонозных инфекций позволяет им иметь одновременно несколько хозяев, относящихся к разным таксономическим видам. Из зарегистрированных около 1500 известных патогенов человека более 60% имеют зоонозное происхождение [15]. При зоонозных инфекциях источником является инфицированное животное. Передача инфекции осуществляется от животного человеку, при этом заражение человека человеком происходит редко (геморрагические лихорадки Ласса, Эбола, чума и др.). Примерами зоонозных инфекций являются бруцеллез, сибирская язва, ящур, туляремия, боррелиоз, клещевой энцефалит, ГЛПС и др.

Сапронозы (от греч. сапрос — гнилой и нозос — болезнь) — это болезни, передающиеся человеку из абиотических субстратов окружающей среды (почвы, воды, разлагающихся растений, экскрементов животных и др.) [4, 9]. Этот термин и определение были впервые предложены российским микробиологом В.И. Терских (1958) [9]. Важной особенностью сапронозов является то, что бактерии-возбудители не только сохраняются, но и активно размножаются в абиотических субстратах (сапрофитическая фаза), а попав в организм теплокровного животного (или человека), продолжают репликацию и в нем (паразитическая фаза) [2, 6]. Таким образом, источником инфекции не является животное или человек, передача инфекции от человека к человеку происходит лишь в исключительных случаях. Возбудители сапронозов обычно имеют чрезвычайно широкий круг хозяев. К возбудителям инфекций, относящихся к данной группе, относятся *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Erysipelothrix*, *Bacillus anthracis*, *Leptospira interrogans*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*.

Таким образом, возбудители типичных сапронозов представляют собой группу микроорганизмов, которые могут существовать и размножаться в природе без всякой связи с теплокровными животными (случайные паразиты). Например, *Y. pseudotuberculosis*, *L. pneumophila*, *L. monocytogenes* вызывают заболевания человека и поражают значительное число видов теплокровных животных. Они, по мнению Г.П. Сомова, могут быть отнесены к факультативным паразитам (полусапрофитам), которые могут рассматриваться в качестве переходной формы между сапрофитами и паразитами [5, 6].

В признании парадигмы о возможности размножения ряда патогенных бактерий, относящихся к факультативным паразитам, в объектах внешней среды существенную роль сыграла теория психрофильности патогенных бактерий, разработанная во Владивостокском НИИ эпидемиологии и микробиологии в конце 80-х годов XX века под руководством Г.П. Сомова. В ходе многолетних исследований были выявлены многочисленные генетико-биохимические механизмы, обеспечивающие высокую экологическую пластичность патогенных бактерий [6, 7, 10, 11].

Прошли годы, и аналогичные исследования, проведенные в России и за рубежом в XXI веке на более высоком уровне с использованием современных молекулярно-генетических методов, подтвердили теорию психрофильности [11 — 13, 15].

Выявлено, что характерным биохимическим признаком патогенных видов *Yersinia* является наличие у них двух изоферментных систем, функционирующих самостоятельно во внешней среде и в теплокровном организме и способных переключаться в зависимости от конкретных условий существования микроорганизма [13]. Установлено, что при понижении температуры наблюдается интенсивное поглощение этими микроорганизмами питательных веществ и расщепление их внутри клетки. Кроме того, способность патогенных бактерий расти при низкой положительной температуре зависит от строения и липидного состава клеточной мембраны.

В частности, в липополисахаридах (ЛПС) клеточных мембран иерсиний содержится больше ненасыщенных кислот, чем в липидах мембран мезофилов, вследствие чего цитоплазматическая мембрана постоянно находится в жидкокристаллическом состоянии даже при низких температурах. Было выявлено, что при выращивании бактерий при 37°C каждый из энтеропатогенных видов *Yersinia* синтезирует ЛПС, содержащий, главным образом, тетра-ацилированную форму липида А, а при понижении температуры окружающей среды происходило относительное увеличение гекса-ацилированных форм. При этом некоторые отличия были выявлены в количестве и типах ацильных групп между видами иерсиний.

Однако указанные конформационные изменения ЛПС не дали ответа на главный вопрос: каким образом происходит регулирование метаболизма иерсиний в зависимости от температуры окружающей среды и какие структуры бактериальной клетки ответственны за ее контроль. Ответ был получен в 2009 году К. Herbst et al., которые открыли ранее неизвестный механизм контроля температуры патогенными видами *Yersinia* [13].

Было установлено, что энтеропатогенные виды *Yersinia* обладают инструментом, обладающим свойствами уникального белкового термометра, в роли которого выступает протеин RovA (один из ДНК-связывающих белков), который воспринимает изменения температуры непосредственно через изменения в конформации белка. Этот же протеин в зависимости от температуры окружающей среды регулирует активность биологических функций бактерий, в том числе факторов патогенности. Было обнаружено, что протеин RovA представляет собой многофункциональный сенсорный белок, измеряющий как температуру окружающей среды, так и контролирующей широкий спектр метаболических процессов в бактериальной клетке [13, 17].

Таким образом, психрофильные свойства патогенных видов *Yersinia* способствуют сохранению их от эпидемиологической опасности в объектах окружающей среды. Холод не только позволяет этим бактериям размножаться и накапливаться в объектах земных и водных экосистем, но и является пусковым фактором молекулярно-генетических механизмов, обеспечивающих регуляцию их вирулентности [13]. Таким образом, был окончательно раскрыт механизм психрофильности бактерий, главную роль в открытии которой принадлежит научной прозорливости академика Г.П.Сомова.

Теоретические положения о психрофильности патогенных бактерий в свое время существенно бы обогатили паразитологию, однако до настоящего времени в перечень объектов изучения традиционной паразитологии патогенные микроорганизмы не входят. Однако, как полагал Г.П.Сомов, изучение вопросов их паразитизма с точки зрения современных представлений общей паразитологии могло бы ее существенно углубить и расширить [5, 7].

Хотя патогенные бактерии функционируют как паразиты, использование термина «паразитарное заболевание», как правило, более ограничено. Три основных типа микроорганизмов, вызывающих эти заболевания, являются простейшими (вызывающими протозойные инфекции), гельминтами (гельминтозы) и эктопаразитами. Простейшие и гельминты обычно являются эндопаразитами (как правило, живут внутри тела хозяина), в то время как эктопаразиты обычно живут на поверхностных

покровах хозяина. Иногда определение «паразитарное заболевание» ограничивается заболеваниями, связанными с эндопаразитами [10, 11].

Паразитизм, также как и другие формы взаимоотношений между паразитами и их хозяевами, возник, развивался и совершенствовался в процессе эволюции микроорганизмов. Полагают, что свободно живущие микроорганизмы-сапрофиты появились свыше 3 млрд лет тому назад во время зарождения жизни на нашей планете, а микроорганизмы-паразиты — значительно позже — по мере образования эукариотов [13, 16].

С экологической точки зрения, микроорганизмы, населяющие организм человека или теплокровных животных, находятся с ними в различных симбиотических взаимоотношениях от взаимовыгодных (мутуалистических) до антагонистических (паразитических). Паразитические отношения свойственны всем патогенным микроорганизмам, которые, являясь паразитами своих хозяев (человека, животных или растений), вызывают инфекционные заболевания. При этом в научной литературе XX века приводятся многочисленные доказательства об отсутствии четких границ между паразитизмом и иными формами симбиоза, а патогенность не является исключительным свойством определенного микроорганизма [цит. по 5, 6].

Паразитизм патогенных бактерий трансформировался по пути: сапрофиты (синантропные) → факультативные паразиты → облигатные паразиты. В основе формирования паразитических свойств бактерий-сапрофитов лежат расширение и обновление экологических условий, открывающих перед ними новые экологические сферы распространения. Так возникли факультативные (необязательные) паразиты, многие из которых, не нанося заметных повреждений организму хозяина, извлекают для себя пользу [6, 15].

В классической схеме трансформации паразитизма не указаны условно патогенные (оппортунистические) бактерии. Они являются по отношению к организму-хозяину комменсалами и составляют значительную часть нормальной флоры человека, не вызывая заболеваний. Примером могут служить сапрофитные гнилостные микроорганизмы, которые освоили новую экологическую нишу — кишечник животных и человека. К ним относятся условно патогенные, или оппортунистические, виды бактерий (эшерихии, протей и др.), дрожжеподобные грибы, популяции которых в нормальных условиях не наносят ущерба хозяину. Однако в экстремальных ситуациях данные микроорганизмы вызывают патологические процессы [11, 16].

Инфекции, обусловленные условно патогенными возбудителями, являются результатом нарушения симбиотических отношений и связаны с определенными условиями [15, 16]. В настоящее время эта группа бактерий составляет основную часть госпитальных штаммов и является основной этиологической причиной возникновения внутригоспитальных инфекций, устойчивых к антибактериальным препаратам. Данный пример показывает условность границы между симбиозом и паразитизмом, что, опираясь на учение академика Е.Н.Павловского [4], постоянно подчеркивал Г.П.Сомов [7].

Характерной особенностью большинства зоонозов и сапронозов является то, что при попадании возбудителя в организм человека обычно происходит обрыв эпидемической цепи, при этом клиническая картина заболевания может быть достаточно тяжелой и иметь серьезные последствия, вплоть до смертельного исхода [6, 7, 15].

По мере увеличения зависимости от организма хозяина происходило дальнейшее совершенствование паразитизма, которое привело к появлению патогенных видов — возбудителей инфекционных заболеваний людей и животных. Многие из них утратили сапрофитную форму в своем развитии в отличие от условно патогенных микроорганизмов. Они оказались неспособными не только размножаться, но даже сохраняться в окружающей среде [6, 13].

Так, бледная трепонема (*Treponema pallidum*), коклюшная палочка (*Bordetella pertussis*) и другие патогены выживают во внешней среде всего несколько минут, энтеробактерии — несколько недель и месяцев и т.д. Однако спорообразующие патогенные (бациллы сибирской язвы) и условно патогенные бактерии (клостридии

столбняка и газовой гангрены) сохраняются в течение многих месяцев и лет в виде спор [14].

По мере увеличения зависимости паразитов от организма хозяина появились факультативные внутриклеточные паразиты. К ним относятся гонококки и менингококки, микобактерии туберкулеза, шигеллы, сальмонеллы и другие бактерии, для которых внутриклеточная среда организма является основным местом размножения. Перечисленные виды не утратили способности к внеклеточному размножению и на искусственных питательных средах, что свидетельствует о сохранении у них набора ферментов, необходимых для анаболических и катаболических реакций [6, 7, 15].

На более поздних этапах эволюции появились облигатные внутриклеточные паразиты, удовлетворяющие свои жизненно важные потребности (пищевые, метаболические, энергетические) только в условиях внутриклеточного существования. К этой группе микроорганизмов относятся вирусы, хламидии, риккетсии и патогенные простейшие. Эти возбудители сохранили клеточную организацию, но лишились генов, контролирующих образование ряда ферментов, необходимых для важнейших метаболических реакций, вследствие чего они утратили способность расти на питательных средах [2, 3, 7, 15].

Таким образом, в результате регрессивной эволюции появились облигатные внутриклеточные паразиты с редуцированными метаболическими реакциями, полностью зависящие от своего хозяина. Как у внеклеточных, так и у внутриклеточных паразитов, подавляющее число которых относится к патогенным видам, в процессе эволюции появились факторы, защищающие их от факторов врожденного и адаптивного иммунитета организма хозяина.

Основной движущей силой эволюции микробного паразитизма, во время которой сформировались патогенные виды, явились мутации и рекомбинации генов. В результате направленного отбора особей, наиболее приспособленных к конкретным условиям существования в организме человека, происходило совершенствование вирулентных и токсических свойств возбудителей, формирование новых их разновидностей и видов. Основные селективные факторы направленного отбора, действующие в организме человека и животных, относятся к врожденной и адаптивной иммунной защите организма хозяина, а также постоянно увеличивающемуся арсеналу этиотропных химиотерапевтических и иммунных (вакцины, иммуноглобулины) препаратов. При этом число новых генотипов, выживших в результате направленного отбора, находится в прямой зависимости от количества действующих селективных факторов. Это приводит к постоянному обновлению генофонда микробной популяции [7, 14].

Таким образом, эволюционная роль внехромосомных факторов наследственности состоит в повышении гетерогенности бактериальных популяций, что в конечном итоге способствует выживанию тех биоваров с измененной антигенностью и патогенностью, которые наиболее приспособлены к данным конкретным условиям существования в организме своего хозяина.

Прошло много лет, прежде чем концепция о сапронозах, предложенная В.И. Терских и развитая Г.П. Сомовым с сотрудниками, завоевала международное признание. В наши дни является общепризнанным фактом, что возбудители сапронозов обладают особыми эволюционными и эпидемиологическими свойствами, отличающими их от других инфекционных агентов.

История открытия и изучения сапронозов — это многолетняя борьба за пересмотр установившихся представлений в эпидемиологии. Выдвинутые в середине XX века новаторские теоретические положения открыли новые пути для изучения экологии сапрофитов, способствовали утверждению представлений о новом классе инфекций, а также появлению нового направления в науке — экологической микробиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Громашевский Л.В. Общая эпидемиология. М., Медгиз, 1949.
2. Жданов В.М., Львов Д.К. Эволюция возбудителей инфекционных болезней. М., Медицина, 1984.

СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л.** Когнитивная ось старости: воспаление – микробиота тонкого кишечника.....3
Filippova, Yu.Yu., Burmistrova, A.L. Cognitive axis of aging: inflammation – microbiota of small intestine
- Ефременко Д.В., Малецкая О.В., Оробей В.Г., Ефременко В.И.** Биологическая безопасность массовых мероприятий: актуальные вопросы и принципы 10
Efremenko, D.V., Maletskaya, O.V., Orobey, V.G., Efremenko, V.I. Biological safety of mass actions: topical issues and principles
- Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Волюнкина А.С., Лисицкая Я.В., Шапошникова Л.И., Таран Т.В., Куличенко А.Н.** Причины обострения эпидемиологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2016 году 17
Vasilenko, N.F., Maletskaya, O.V., Manin, E.A., Prislegina, D.A., Volynkina, A.S., Lisitskaya, Ya.V., Shaposhnikova, L.I., Taran, T.V., Kulichenko, A.N. Causes of deterioration epidemiological situation on Crimean-Congo haemorrhagic fever in the Russian Federation in 2016
- Борисова О.Ю., Пименова А.С., Чаплин А.В., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Аleshкин В.А., Аleshкин А.В., Афанасьев М.С., Караулов А.В.** Ускоренный способ генодиагностики дифтерии на основе изотермальной амплификации для выявления ДНК возбудителя..... 24
Borisova, O.Yu., Pimenova, A.S., Chaplin, A.V., Kafarskaya, L.I., Afanasiev, S.S., Aleshkin, V.A., Aleshkin, A.V., Afanasiev, M.S., Karaulov, A.V. An accelerated method of diphtheria gene diagnostics based on isothermal amplification to detect DNA of the causative agent
- Калюшин А.А., Солдатенкова А.В., Зимина Е.М., Михайлова Н.А.** Получение слитых рекомбинантных белков OprF- Δ OprI, Δ OprF- Δ OprI и OprF-aTox- Δ OprI *Pseudomonas aeruginosa* 32
Kaloshin, A.A., Soldatenkova, A.V., Zimina, E.M., Mikhailova, N.A. Obtaining fused recombinant proteins OprF- Δ OprI, Δ OprF- Δ OprI and OprF-aTox- Δ OprI of *Pseudomonas aeruginosa*
- Солнцев Л.А., Дубянский В.М.** Опыт использования метода максимальной энтропии (Maxent) для зонирования территории по риску заражения ГЛПС на примере Нижегородской области 39
Solntsev, L.A., Dubyansky, V.M. Experience of using maximal entropy method (Maxent) for zoning of the territory by HFRS risk using Nizhny Novgorod region as an example
- Новикова Н.А., Сашина Т.А., Солнцев Л.А., Епифанова Н.В., Кашников А.Ю., Погодина Л.В., Окунь И.Н., Княгина О.Н.** Проявления эпидемического процесса ротавирусной инфекции в Нижнем Новгороде в предвакцинальный период 46
Novikova, N.A., Sashina, T.A., Solntsev, L.A., Epifanova, N.V., Kashnikov, A.Yu., Pogodina, L.V., Okun, I.N., Knyagina, O.N. Manifestations of epidemic process of rotavirus infection in Nizhny Novgorod in pre-vaccination period
- Аleshкин А.В., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Бочкарева С.С., Чернова В.А., Требунских И.П., Ефимов Б.А., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Аleshкин В.А., Афанасьев М.С., Борисова А.Б., Караулов А.В.** Микробиоценоз кожи у больных бромгидрозом 53
Aleshkin, A.V., Borisova, O.Yu., Gadua, N.T., Bochkareva, S.S., Chernova, V.A., Trebunskikh, I.P., Efimov, B.A., Kafarskaya, L.I., Afanasiev, S.S., Aleshkin, V.A., Afanasiev, M.S., Borisova, A.B., Karaulov, A.V. Microbiocenosis of skin in bromhidrosis patients
- Неустроев М.П., Мурашев А.Н., Бондаренко Д.А., Степанова А.М., Тарабукина Н.П.** Исследование токсичности препарата Сахабактисубтил на крысах..... 59
Neustroev, M.P., Murashev, A.N., Bondarenko, D.A., Stepanova, A.M., Tarabukina, N.P. Study of toxicity of Sakhabactisubtil in rats

- Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Чапоргина Е.А., Попова Ю.О., Долгова Т.М., Гаврилова О.В., Тайкова Т.С., Никитина А.В., Помелова В.Г., Осин Н.С., Балахонов С.В.* Сравнительный анализ эффективности твердофазных методов иммунодетекции ботулинического токсина в сыворотке крови больного с диагнозом «ботулизм» 64
Zagoskina, T. Yu., Markov, E. Yu., Chaporgina, E. A., Popova, Yu. O., Dolgova, T. M., Gavrilova, O. V., Taikova, T. S., Nikitina, A. V., Pomelova, V. G., Osin, N. S., Balakhonov, S. V. Comparative analysis of effectiveness of solid-phase methods of immune detection of botulinic toxin in blood sera of a patient with botulism diagnosis

ОБЗОРЫ (REVIEWS)

- Анганова Е.В., Ветохина А.В., Распопина Л.А., Кичигина Е.Л., Савилов Е.Д.* Состояние антибиотикорезистентности *Klebsiella pneumoniae*..... 70
Anganova, E. V., Vetokhina, A. V., Raspopina, L. A., Kichigina, E. L., Savilov, E. D. State of antibiotics resistance of *Klebsiella pneumoniae*
- Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Дробот Е.И., Ляпун И.Н.* Псевдотуберкулез: патогенетическое значение клеток врожденного иммунитета 78
Somova, L. M., Plekhova, N. G., Drobot, E. I., Lyapun, I. N. Pseudotuberculosis: pathogenetic value of innate immunity cells
- Маркин В.А., Чифанов Д.Е.* Заносы особо опасных вирусных инфекций на неэндемичные территории 90
Markin, V. A., Chifanov, D. E. Transfer of dangerous viral infections in the non-endemic area
- Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В.* Пародонтопатогенные бактерии — основной фактор возникновения и развития пародонтита 101
Tsarev, V. N., Nikolaeva, E. N., Ippolitov, E. V. Periodontopathogenic bacteria of the main factors of emergence and development of periodontitis
- Горелова Л.А., Царева В.В., Витович М.В.* Цефтаролин против стафилококка и других «супербактерий» 113
Gorelova, L. A., Tsareva, V. V., Vitovich, M. V. Cefaroline against staphylococcus and other super-bacteria

ИСТОРИЯ НАУКИ (HISTORY OF SCIENCE)

- Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф.* Эволюция понятия сапронозы и трансформация экологической концепции паразитизма в инфектологии 119
Andryukov, B. G., Somova, L. M., Timchenko, N. F. Evolution of the sapronosis notion and transformation of the environmental concept of parasitism in infectology

ЮБИЛЕИ (ANNIVERSARIES)

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, редколлегией 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 сообщает 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 обезбоживания 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.