

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.

6

ноябрь—декабрь

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 (1 полугодие 2018 г.).
Объединенный каталог «Пресса России» 10277 (1 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 22.11.17. Выход в свет 12.12.17.
Формат 70x108 1/16. Печать офсетная. Тираж. 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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Е.В.Сазанова, Т.П.Шмелькова, А.Л.Кравцов, Т.А.Малюкова, Ю.А.Попов

ПРОТОЧНО-ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Цель. Изучение цитотоксического воздействия штаммов *Yersinia pestis* с различной степенью вирулентности на лейкоциты цельной дефибринированной крови человека. *Материалы и методы.* В работе использовано 15 штаммов *Y. pestis*. ДНК-гистограммы регистрировали с помощью проточного цитофлуориметра. *Результаты.* Экспериментально обоснована возможность использования показателя цитотоксичности для дифференциации штаммов *Y. pestis* на вирулентные и авирулентные. Полученные данные сопоставимы с показателем LD₅₀ для мышей и не противоречат молекулярно-генетическим характеристикам штаммов. *Заключение.* Предлагаемый подход позволяет получать достоверные результаты и является перспективным для оценки вирулентности штаммов *Y. pestis*.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 3—9

Ключевые слова: *Y. pestis*, вирулентность, апоптоз, проточная цитометрия

E.V.Sazanova, T.P.Shmelkova, A.L.Kravtsov, T.A.Malyukova, Yu.A.Popov

FLOW-CYTOFLUORIMETRIC ANALYSIS OF CYTOTOXICITY OF *YERSINIA PESTIS* STRAINS

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

Aim. Study cytotoxic effect of *Yersinia pestis* strains with various degree of virulence on leukocytes of whole defibrinated human blood. *Materials and methods.* 15 strains of *Y. pestis* were used in the study. DNA histograms were registered using flow cytofluorimeter. *Results.* Possibility of using cytotoxicity to differentiate *Y. pestis* into virulent and avirulent was experimentally proven. The data obtained was comparable with LD₅₀ for mice and did not contradict molecular-genetic characteristics of the strains. *Conclusion.* The approach proposed allows to obtain reliable results and is perspective for evaluation of virulence for *Y. pestis* strains.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 3—9

Key words: *Y. pestis*, virulence, apoptosis, flow cytometry

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель чумы является патогенным для человека микроорганизмом, относящимся к возможным агентам биотерроризма. Алгоритм идентификации штаммов *Y. pestis* включает комплекс регламентированных методов оценки вирулентности *in vitro* и *in vivo*, реализуемых на базе лабораторий регионального и федерального уровня [4]. Анализ *in vitro* позволяет продемонстрировать с помощью молекулярно-генетических методов наличие в геноме детерминант основных факторов патогенности изучаемого штамма, а с помощью

культурально-биохимических и иммунологических методов подтвердить их экспрессию. Применение биологического метода исследования (заражение мышей и морских свинок) дает возможность *in vivo* определить количественный показатель LD₅₀ и дать заключение о степени вирулентности на основании принятых критериев [8]: высоковирулентные штаммы — LD₅₀ для мышей при подкожном заражении — 5 — 10 м.к.; вирулентные — LD₅₀ более 10 м.к.; слабовирулентные — LD₅₀ более 1·10⁵ м.к.; авирулентные — LD₅₀ более 1·10⁶ м.к [3]. Кроме того, заражение двух видов лабораторных животных позволяет получить информацию о возможной избирательной вирулентности штамма. Однако полученная информация не позволяет оценить вирулентность микроорганизма для человека.

Цель работы — оценка цитотоксического воздействия штаммов *Y. pestis* на лейкоциты крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали вирулентные штаммы *Y. pestis*: 231; С-533; 748; М-586; И-3340; 400(290); авирулентные штаммы: 100Р6(36М5); КМ-130(3); КМ-260(12); 707; 521; А-819; 652; М-1813; вакцинный штамм EV линии НИИЭГ, а также штамм *Staphylococcus aureus* 209.

Штаммы *Y. pestis* выращивали на агаре Хоттингера pH 7,2 при (37±1)°С в течение 48 ч; штамм *S. aureus* 209 — на агаре Хоттингера pH 7,4 при температуре (37±1)°С в течение 24 ч. Взвесь бактериальных культур готовили в 0,9% физиологическом растворе по отраслевому стандарту мутности 10 единиц ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ОСО 42-2859-86П), что соответствует 1·10⁹ м.к./мл. Необходимый объем венозной крови для эксперимента получали из локтевой вены невакцинированного против чумы донора, кровь дефибрировали и добавляли в нее микробную взвесь в соотношении V:V до получения концентрации 5·10⁸ м.к./мл крови. Параллельно ставили отрицательный контроль — кровь с физиологическим раствором и положительный — кровь с клетками *S. aureus* в концентрации 5·10⁸ м.к./мл крови. Образцы инкубировали в течение 48 ч при 37°С. Через 24 ч и 48 ч инкубации из каждого образца отбирали 100 мкл крови и проводили лизис эритроцитов деионизованной водой (3 мл). Через 15 с восстанавливали осмотический баланс пробы добавлением 1 мл 0,1 М фосфатно-солевого буфера с 0,6 М NaCl, pH 7,2. Пробы центрифугировали (100 g, 5 мин). Осадок (выделенные лейкоциты) дважды промывали добавлением 3 мл 0,15 М фосфатно-солевого буфера с 0,6 М NaCl, pH 7,2. Затем к осадку приливали 2 мл холодного 70% этилового спирта и хранили при 4°С до получения результатов контроля на специфическую стерильность. Контроль специфической стерильности проводили путем высева 0,1 мл взвеси на агар и в бульон Хоттингера (pH 7,2) с последующей инкубацией при температуре 28°С в течение 5 суток. Отсутствие роста *Y. pestis* свидетельствовало о специфической стерильности бактериальных проб.

Перед исследованием лейкоциты осаждали центрифугированием (400 g, 10 мин) и окрашивали в течение 15 мин смесью бромид этидия и митрамицина: 0,1 моль Трис-HCl буфера (pH 7,6) с добавлением 0,15 М NaCl, 0,04 М Mg Cl₂, 25 мкг/мл бромид этидия (Serva, Германия) и 50 мкг/мл митрамицина (Sigma, США) из расчета 1 мл раствора красителя на 10⁵ — 10⁶ лейкоцитов. ДНК-гистограммы лейкоцитов регистрировали с помощью проточного цитофлуориметра ICP-22 фирмы RNYWE (Германия) и подсчитывали гиподиплоидные лейкоциты (в апоптозе), несущие менее 2С

ДНК на клетку и обладающие пониженной интенсивностью ДНК-флуоресценции [11].

Статистическая обработка результатов включала определение среднего арифметического, средней ошибки среднего арифметического, достоверности различий (P) в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дифференцировать штаммы *Y. pestis* по степени вирулентности позволяет методический подход, основанный на определении уровня их цитотоксичности по отношению к макрофагам лабораторных животных [5, 17] и в последние годы при оценке цитотоксичности штаммов *Y. pestis* широко используют проточную цитофлуориметрию, обеспечивающую наиболее быстрый и эффективный подсчет числа апоптотических клеток в культурах макрофагов, обсемененных *Y. pestis* [9]. Макрофаги, погибшие при взаимодействии с *Y. pestis* в процессе развития фагоцитарной реакции, легко могут быть идентифицированы как фагоциты, несущие менее 2С ДНК на клетку [2], которые учитываются на ДНК-гистограммах слева от диплоидного пика G1/Go [6].

Однако в образцах крови человека подавляющее число фагоцитов (более 90%) — это не макрофаги, а полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофильные гранулоциты), функция которых на ранней стадии инфекционного процесса полностью подавляется факторами вирулентности *Y. pestis* [16]. Подавляется не только фагоцитоз, но и ранний апоптоз нейтрофилов [15], что приводит к длительной отсрочке гибели этих клеток в условиях *in vivo* [10], к массивному апоптозу лейкоцитов, индуцируемому циркулирующими в крови устойчивыми к фагоцитозу *Y. pestis* и, как следствие, к неизбежному массивному постапоптотическому аутолизу (вторичному некрозу) лейкоцитов на стадии генерализации чумного инфекционного процесса [13]. Считается,

что длительная задержка гибели нейтрофилов лежит в основе быстрого развития системного воспаления при первичной легочной чуме и играет решающую роль в патогенезе чумы [14].

Имеются единичные работы, посвященные изучению динамики гибели лейкоцитов в образцах цельной крови человека, обсемененных живыми *Y. pestis* [7, 11].

Характеристика вирулентности штаммов *Y. pestis*

Наименование штамма	Геновариант	LD ₅₀ для мышей, м.к.	Кол-во апоптотических клеток (M±m),%	
			24 ч	48 ч
Вирулентные				
231	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	25—50 м.к.	42±6,22	91,33±4,56
C-533	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	31 м.к.	17±4,4	87±2,56
748	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	25 м.к.	15,6±4,2	89±6,4
M-586	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	32 м.к.	24,33±5,8	88,33±6,12
I-3340	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	112 м.к.	17±2,12	89,33±5,55
400 (290)	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	1·10 ⁴	21±5,39	83,33±3,91
Авирулентные				
A-819	pPst ⁻ pFra ⁺ pCad ⁻ Pgm ⁻	>10 ⁹	18,33±3,34	76,66±7,65
652 «Гризель»	pPst ⁻ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁺	2,15·10 ⁶	16,33±2,37	49±2,94
100P6(36M5)	pPst ⁻ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁻	1,47·10 ⁸	13,33±2,44	30,33±1,73
M-1813	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁻	1·10 ⁸	9,66±1,22	41,66±5,07
707 «Касуга»	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁻ Pgm ⁺	1·10 ⁹	7,66±3,78	44,33±7,35
521	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁻	>10 ⁹	2,33±0,33	2,66±0,33
260 (12)	pPst ⁻ pFra ⁻ pCad ⁻ Pgm ⁺	>10 ⁹	11,66±1,48	18±2,35
KM-130 (3)	pPst ⁻ pFra ⁺ pCad ⁻ Pgm ⁻	>10 ⁹	5,38±0,89	10±3,27
EV	pPst ⁺ pFra ⁺ pCad ⁺ Pgm ⁻	>10 ⁹	9±0,58	24±0,19
Контроль отр.			3,36±0,89	5±1,17
Контроль пол.			51,3±3,82	68±3,27

Результаты этих работ подтверждают неспособность *Y. pestis*, в отличие от золотистого стафилококка, быстро индуцировать интенсивную гибель нейтрофилов по типу апоптоза. Установлены различия в интенсивности цитотоксического эффекта, индуцированного в крови человека вирулентным, вакцинным и авирулентным штаммами *Y. pestis*. По данным проточной цитометрии под влиянием устойчивых к фагоцитозу *Y. pestis* нейтрофилы человека погибали по типу позднего апоптоза — в интервале времени от 24 ч до 48 ч инкубации. Однако использование небольшой выборки штаммов не позволило рассчитать пороговый показатель для дифференциации вирулентных и авирулентных штаммов.

В табл. представлены результаты дифференцировки штаммов на вирулентные и авирулентные по данным ПЦР-анализа и по расчетам показателя LD_{50} . Их сравнивали с результатами проточно-цитофлуориметрического ДНК-анализа.

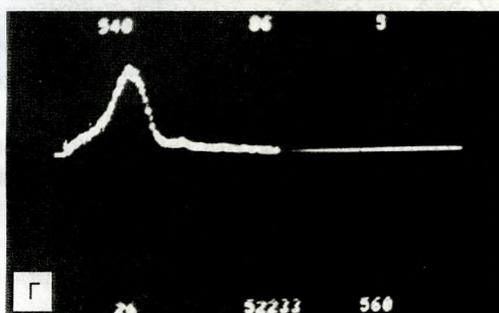
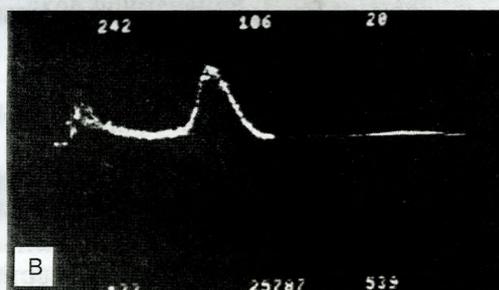
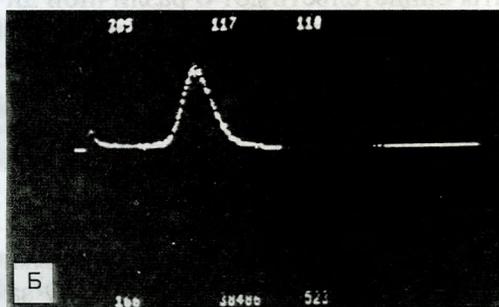
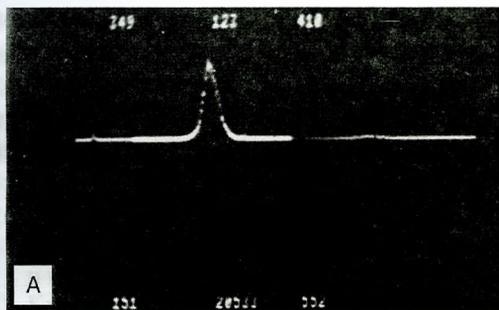
Анализ ДНК-гистограмм начинали с оценки контрольных образцов. В отрицательном контроле через 24 ч инкубации при $37^{\circ}C$ лейкоциты фактически не подвергались апоптозу. В положительном контроле был зарегистрирован интенсивный цитотоксический эффект, что подтвердило полученные ранее данные [7, 11].

ДНК-гистограммы образцов, содержащих клетки *Y. pestis* и подвергшиеся инкубации в течение 24 часов, сопоставляли с данными положительного и отрицательного контроля. Использование *S. aureus* дало возможность сравнить цитотоксические свойства бактерий, инфицирование которыми сопровождается завершенным фагоцитозом, быстрым апоптозом и лизисом нейтрофилов (в течение первых 6 — 8 ч), с цитотоксичностью возбудителя чумы, взаимодействие которого с макроорганизмом характеризуется незавершенным фагоцитозом, отсрочкой гибели нейтрофилов [15] и, как следствие, длительной задержкой развития воспалительного процесса (до 36 — 48 ч) [10].

В ходе эксперимента отмечено, что все ДНК-гистограммы, полученные при анализе образцов крови, содержащих клетки возбудителя чумы, характеризовались, в сравнении с золотистым стафилококком, затяжным (постепенным) развитием цитотоксического эффекта с проявлением максимальных различий для вирулентных и авирулентных штаммов к 48 ч инкубации.

Было выявлено три варианта индукции апоптоза лейкоцитов крови человека под влиянием штаммов *Y. pestis* (табл.). Первый вариант характеризовался фактическим отсутствием цитотоксического действия к 24 ч; количество апоптотических клеток при этом было очень близко к контролю ($P \geq 0,05$). В данную группу вошли авирулентные штаммы *Y. pestis* КМ-130 (3); 707 «Касуга»; 521. Второй вариант проявлялся более высокой цитотоксичностью, превосходящей данные отрицательного контроля от 3 до 8 раз. Группу составили 11 штаммов *Y. pestis* как вирулентных, так и авирулентных. Третий вариант развития апоптоза лейкоцитов демонстрировал штамм *Y. pestis* 231 (708) — интенсивный апоптоз лейкоцитов, превышающий в 11,5 раза показатель отрицательного контроля.

При исследовании образцов, подвергшихся инкубации в течение 48 часов, во всех образцах, содержащих вирулентные штаммы *Y. pestis*, была зафиксирована массовая гибель лейкоцитов. Среднее значение показателя повреждения лейкоцитов составило $88,05 \pm 1,12\%$. Аналогичный показатель для авирулентных штаммов был в 2,7 раза ниже и составил $32,96 \pm 7,57\%$. При этом интенсивность повреждения лейкоцитов вирулентными штаммами превысила результаты отрицательного контроля в 18 раз, а авирулентными — в 15



Различная интенсивность повреждения лейкоцитов крови человека, инфицированной штаммами *Y. pestis* с различными биологическими свойствами.

По оси абсцисс — содержание ДНК на клетку в усл. ед. интенсивности ДНК флуоресценции (каналах). По оси ординат — кол-во клеток (импульсов) на ед. измерения (канал). Основной пик представлен диплоидными клетками с содержанием ДНК 2С, которые находятся на постмитотической (G0) и предсинтетической (G1) стадиях клеточного цикла. Слева от диплоидного пика — лейкоциты, содержащие менее 2С ДНК на клетку. А, Б — контр. отр., исходный и после 48 ч инкубации соответственно; В — авирулентный штамм *Y. pestis* М-1813 после 48 ч инкубации; Г — вирулентный штамм *Y. pestis* М-586 после 48 ч инкубации.

раз. Проведенная нами статистическая обработка показала высокую степень достоверности ($p < 0,05$) различий показателей апоптоза лейкоцитов крови как в исследуемых группах, так и с контрольными образцами. Различия в интенсивности повреждения лейкоцитов крови человека вирулентными и авирулентными штаммами отражают характерные ДНК гистограммы, представленные на рисунке.

Следует отметить, что штаммы *Y. pestis* 100P6(36M5); М-1813; 707 «Касуга»; 652 «Гризель» продемонстрировали средний результат интенсивности повреждения лейкоцитов по сравнению со всей группой штаммов *Y. pestis*. Полученные данные согласуются с данными о наличии детерминант вирулентности. В геноме каждого из этих штаммов, за исключением *Y. pestis* 652 «Гризель», отсутствуют гены, детерминирующие один из основных факторов патоген-

ности. Обращает на себя внимание штамм *Y. pestis* A-819, который по данным ПЦР (отсутствие в геноме основных детерминант вирулентности) и биологического метода исследования на мышах ($LD_{50} > 10^9$ м.к.) был отнесен к группе авирулентных. Вместе с тем, при анализе ДНК-гистограмм, полученных методом проточной цитометрии в опытах с лейкоцитами крови человека, для данного штамма был определен высокий показатель цитотоксичности, а именно $76,77 \pm 7,65\%$ погибших лейкоцитов через 48 ч инкубации. Возможно, это обусловлено индивидуальными генетическими перестройками, что требует дополнительного исследования.

В целом, полученные нами результаты свидетельствуют о различной динамике и интенсивности гибели лейкоцитов в крови людей, обсемененной живыми клетками вирулентных и авирулентных штаммов *Y. pestis*. На основании имеющихся показателей можно предположить, что пороговым значением для отнесения штамма возбудителя чумы к вирулентным является наличие в исследуемом образце крови (к 48 ч инкубации при 37°C) более 80% апоптотических клеток, к авирулентным — менее 50%.

Это согласуется с литературными данными о пороговых значениях индексов деградации лейкоцитов крови у пациентов с тяжелыми бактериальными инфекциями, когда бактериемия приводит к неблагоприятному исходу заболевания в результате развития тяжелого сепсиса. Важно, что клиницисты предполагают высокую степень тяжести инфекции и серьезный прогноз только в тех случаях, когда более чем в 50% лейкоцитов крови человека появляются характерные для апоптоза дегенеративные изменения ядра и цитоплазмы [1, 12].

Результаты определения цитотоксичности 15 штаммов *Y. pestis* были сопоставлены с данными молекулярно-генетической оценки их вирулентности (ПЦР, плазмидный скрининг). При этом не выявлено прямой связи величины показателя цитотоксичности штаммов с их плазмидными профилями. Вместе с тем, все штаммы *Y. pestis*, имеющие две основные детерминанты вирулентности (плазмиду $p\text{Cad}$, хромосомную область pgm), обладали более выраженным повреждающим эффектом на лейкоциты крови человека в условиях *in vitro*. Штаммы, утратившие «остров высокой патогенности» либо плазмиду $p\text{Cad}$, обладали сниженной вирулентностью или авирулентностью по данным биологического метода и не индуцировали массивную гибель лейкоцитов в образцах цельной крови человека.

Результаты сравнительного анализа показателей цитотоксичности штаммов *Y. pestis* и их LD_{50} для мышей свидетельствуют об их высокой корреляции.

Оценка цитотоксического эффекта штаммов возбудителя чумы на лейкоциты крови человека в системе *in vitro* позволяет получать достоверные результаты и является перспективным подходом для оценки вирулентности. С целью установления пороговых значений для дифференциации штаммов на авирулентные и вирулентные (возможно, слабо- и высоковирулентные) необходимо продолжить исследования в плане увеличения выборки штаммов возбудителя чумы, в первую очередь, за счет слабовирулентных штаммов ($LD_{50} > 1 \cdot 10^5$ м.к.), а также штаммов авирулентных.

Полученные нами экспериментальные данные коррелируют с критериями регламентированного метода оценки вирулентности *in vivo* на мышах и не противоречат молекулярно-генетическим характеристикам штаммов (исключение составил штамм *Y. pestis* A-819).

Таким образом, предлагаемый подход, позволяющий моделировать условия, приближенные к организму человека и получать достоверные результаты, является перспективным для оценки вирулентности штаммов *Y. pestis* и дополнения комплекса регламентированных методов изучения их вирулентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козинец Г.И., Высоцкий В.В., Погорелов В.М., Еровиченков А.А., Малов В.А. Кровь и инфекция. М., Триада-Фарм, 2001.
2. Кравцов А.Л., Пилипенко Т.Ю., Коровкин С.А., Наумов А.В. Способ оценки фагоцитоза. А.с. 1522923 СССР, МКИ G 01 № 33/53. № 4014143. Изобретения. 1994, 4: 187.
3. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырев (ред.). М., Шико, 2013.
4. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. Методические указания. МУК 4.2.2940-11.
5. Пустовалов В.Л., Васильева Г.И., Киселева А.К. Устойчивость к фагоцитозу штаммов чумного микроба в зависимости от температуры культивирования. Вопросы профилактики природноочаговых инфекций. Саратов, 1983, с. 16-21.
6. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Изд-во Челябинская государственная медицинская академия, Челябинск, 2008.
7. Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Шуковская Т.Н., Ляпин М.Н., Костюкова Т.А., Малюкова Т.А., Головки Е.М., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Влияние биологических свойств чумного микроба на развитие апоптоза лейкоцитов крови человека в системе *in vitro*. Проблемы особо опасных инфекций. 2007, 1: 85-89.
8. Шмелькова Т.П., Сазанова Е.В., Кравцов А.Л., Малюкова Т.А., Попов Ю.А., Бойко А.В., Девдариани З.Л., Шуковская Т.Н. Определение вирулентных свойств патогенных микроорганизмов *in vitro*: состояние вопроса. Журн. микробиол. 2016, 6: 100-110.
9. Bashaw J., Norris S., Weeks S. et al. Development of *in vitro* correlate assay of immunity to infection with *Yersinia pestis*. Clin. And. Vaccine Immunology. 2007, 14 (5): 605-616.
10. Bubeck S.S., Cantwell A.M., Dube P.H. Delayed inflammatory response to primary pneumonic plague occurs in both outbred and inbred mice. Infection and Immunity. 2007, 75 (2): 697-705.
11. Kravtsov A.L., Grebenyukova T.P., Bobyleva E.V. et al. Flow cytofluorometric assay of whole blood leukocyte DNA degradation in response to *Yersinia pestis* and *Staphylococcus aureus*. Proceedings of SPIE. 2001, 4241: 260-267.
12. Parrino J., Hotchkiss R.S., Bray M. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. Emerg. Infect. Dis. 2007, 13 (2): 191-198.
13. Silva T.M. et al. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. Apoptosis. 2008, 13: 463-482.
14. Silva T.M. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. J. Leuk. Biology. 2010, 88 (5): 885-896.
15. Spinner J.L., Seo K.S., O'Loughlin J.L. et al. Neutrophils are resistant to *Yersinia YopJ/P*-induced apoptosis and are protected from ROS-mediated cell death by the type III secretion system. PLoS ONE. 2010, 5(2): e9279. Doi: 10.1371/journal.pone.0009279.
16. Spinner J.L., Cundiff J.A., Kobayashi S.D. *Yersinia pestis* type III secretion system-dependent inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function. Infect. Immunity. 2008, 76 (8): 3754-3760.
17. Zhang Y., Bliska B. Role of macrophage apoptosis in the pathogenesis of *Yersinia*. Curr. Top. Microb. Immunol. 2005, 289: 151-174.

Поступила 10.04.17

Контактная информация: Сазанова Елена Владимировна,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452) 51-52-30

О.В.Малецкая¹, В.М.Дубянский¹, А.И.Беляева², Л.И.Шапошникова¹, Д.С.Агапитов¹,
Н.В.Ермолова¹, Н.В.Цапко¹, Т.В.Таран¹, Е.С.Котенев¹, О.А.Белова¹, А.Н.Куличенко¹

ОЦЕНКА РИСКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСА ЗИКА В РЕСПУБЛИКЕ АБХАЗИЯ, СВЯЗАННОГО С МЕСТНОЙ ПОПУЛЯЦИЕЙ КОМАРОВ *AEDES AEGYPTI* И *AEDES ALBOPICTUS*

¹Ставропольский противочумный институт; ²Санитарно-эпидемиологическая станция администрации г. Сухум, Республика Абхазия

Цель. Характеристика численности и распространения комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* в Республике Абхазия и оценка риска распространения вируса Зика. **Материалы и методы.** Учет численности комаров проводили методом «на наблюдателя» за 20 минут на 70 точках природных ландшафтов в апреле—октябре 2016 г. **Результаты.** Черноморское побережье Республики Абхазия имеет благоприятные экологические условия для укоренения комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*. В 2016 г. комары *Ae. albopictus*, обладающие векторной компетентностью распространять вирус Зика, выявлены в открытых станциях на территории от Очамчирского района до границы с Российской Федерацией. Численность их коррелировала с температурой воздуха в регионе. Контроль эффективности инсектицидных работ показал, что в открытых станциях в течение 3 — 7 дней после дезинсекционных мероприятий комары *Ae. albopictus* не обнаруживались. Однако затем численность восстанавливалась в результате заселения из близлежащих природных биотопов. **Заключение.** В настоящее время риск местной передачи вируса Зика на территории Республики Абхазия оценен нами как «низкий». В то же время, с учетом серьезности болезни, вызываемой вирусом Зика, необходимо проведение более широкого комплекса методов контроля численности комаров в ареалах их обитания, особенно на эпидемиологически значимых объектах. Наиболее эффективной мерой защиты населения являются санитарная очистка территории и ликвидация мест размножения комаров.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 10—15

Ключевые слова: вирус Зика, комары *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, Республика Абхазия

О.В.Маletская¹, В.М.Дубянский¹, А.И.Беляева², Л.И.Шапошникова¹, Д.С.Агапитов¹,
Н.В.Ермолова¹, Н.В.Цапко¹, Т.В.Таран¹, Е.С.Котенев¹, О.А.Белова¹, А.Н.Куличенко¹

ESTIMATE OF VIRUS ZIKA SPREAD RISK IN THE REPUBLIC OF ABKHAZIA ASSOCIATING THE LOCAL POPULATION OF MOSQUITOES *AEDES AEGYPTI* AND *AEDES ALBOPICTUS*

¹Stavropol Research Institute for Plague Control, ²Sanitary and Epidemiological Station, Sukhum, Republic of Abkhazia, Russia

Aim. Characteristic of number and distribution of mosquitoes *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* in the Republic of Abkhazia and a risk assessment of virus Zika spread. **Materials and methods.** The accounting of mosquitoes number was made by the method «on the observer» in 20 minutes at the 70 nature landscapes points in april—oktober 2016. **Results.** The Black sea coast of the Republic of Abkhazia has favorable ecological conditions for the mosquitoes ingrowth of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. At 2016 the mosquitoes *Ae. albopictus* having vector competence to spread a Zika virus, has been revealed in the open stations in the territory from Oчамchirsky district to border with the Russian Federation. Their number is correlated with the air temperature in the region. The control of efficiency of the insecticidal works showed that in the open stations *Ae. albopictus* were not found within 3 — 7 days after the disinsection actions. However, their number of recovered as a result of settling from nearby natural biotopes. **Conclusion.** The risk of local Zika virus transmission has estimated as a low. Considering the gravity of the disease caused by the Zika virus carrying out a wider complex of the control methods of the mosquitoes number in areas of their

dwelling, especially on the epidemiologically significant objects is necessary. The most effective of the population protection action is riddance of the reproduction mosquitoes places and sanitation of territory.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 10—15

Key words: Zika virus, mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, Republic of Abkhazia

ВВЕДЕНИЕ

Современное состояние туристической отрасли Республики Абхазия характеризуется устойчивым развитием. С 2014 г. отмечается рост популярности данного региона для российских туристов. Согласно исследованиям Финансового университета при Правительстве Российской Федерации курорты Абхазии в 2015 году заняли третье место по популярности среди российских туристов и третье место в номинации «Открытие года» в конкурсе лучших туристических направлений на сайте журнала National Geographic Россия. По приблизительным подсчетам за летний период 2015 года Абхазию посетило один миллион отдыхающих.

Принимая во внимание быстрый и постоянный рост туризма, его мощное, в том числе негативное, воздействие на окружающую среду, непосредственную близость Абхазии к интенсивно используемому российскому международному курорту Сочи, актуальной проблемой остаются вопросы эпидемиологической безопасности этого региона.

По данным специалистов Ставропольского противочумного института, осуществляющих совместно со специалистами санитарно-эпидемиологической станции (СЭС) г. Сухум мониторинг возбудителей природно-очаговых и других болезней, на территории Абхазии установлено наличие природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом, лихорадки Западного Нила, Крымской геморрагической лихорадки, клещевого энцефалита, лихорадок Тягиня, Инко, Бханджа, Синдбис, Ку-лихорадки, анаплазмоза, клещевого боррелиоза, туляремии и лептоспироза [2].

Сложившиеся в данном регионе эпидемиологические экосистемы обуславливают опасность распространения возбудителей бактериальных и вирусных инфекций, а появление после длительного отсутствия на черноморском побережье Кавказа обладающих значительным эпидемическим потенциалом переносчиков возбудителей опасных арбовирусных инфекций комаров *Aedes aegypti* и *Ae. albopictus* также является серьезной потенциальной биологической угрозой эпидемиологическому благополучию Причерноморского региона.

В 20 — 30-е годы XX столетия на Черноморском побережье Кавказа были широко распространены комары *Ae. aegypti* [3], в последующем, вследствие успешно проведенных дезенсекционных работ, в данном регионе комаров этого вида не выявляли. Вновь самки *Ae. aegypti* были выловлены в 2004 г. сотрудниками Сочинского отделения Причерноморской противочумной станции в Центральном районе г. Сочи [5] и в дальнейшем были обнаружены на территории города-курорта Сочи и Республики Абхазия (в Тагрском, Гудаутском, Сухумском районах). В 2010 г., помимо имаго комаров, в Гудаутском и Сухумском районах были обнаружены личинки *Ae. aegypti* [6]. В 2012 г. в Краснодарском крае от границы с Республикой Абхазия до п. Джубги Туапсинского района был обнаружен *Ae. albopictus* [1].

Глобальное распространение комаров *Ae. aegypti* в мире стало основной причиной географического распространения вируса Зика, которое продолжает устойчиво расширяться. Выявлено около 5000 случаев лихорадки Зика, занесенных в эндемичные регионы, в т.ч. в страны Северной Америки и Европы. Так, вирус Зика укоренился на территории США, и в 2016 году отмечена местная передача его комарами инвазивных видов *Aedes*. ВОЗ признала вирус Зика глобальной угрозой и призвала страны Европейского региона к обеспечению защиты населения от распространения болезни, вызываемой вирусом Зика, и связанных с ней серьезных неврологических нарушений и врожденных аномалий развития нервной системы, включая микроцефалию. Комары *Ae. albopictus* были главным переносчиком возбудителей при недавней вспышке опасных арбовирусных заболеваний (лихорадки денге, чикунгунья) в Европе [4, 7].

Векторная компетентность комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* к вирусам Зика, денге, чикунгунья, желтой лихорадки и целого спектра других опасных арбовирусов, наряду с их интенсивным распространением в мире, обусловили актуальность исследований по распространению комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* не только в Причерноморском регионе Российской Федерации, но и на приграничной территории Республики Абхазия, а также определение их инфицированности арбовирусами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы данные с 10 стационарных точек в природных ландшафтах и 60 точек, на которых проводились разовые или 2 — 3-кратные учеты численности комаров специалистами Ставропольского противочумного института в апреле—октябре 2016 г.

Стационарные точки установлены в Гагрском районе — 4, в Сухумском — 4, Очамчирском — 2.

Учет численности комаров проводили методом «на наблюдателя» за 20 минут.

Для инсектицидных обработок использовались генераторы холодного тумана и препараты «Ларвиоль паста» и «Форс-Сайт». Работы проведены в 4 этапа: 1 этап — с 01 по 12 апреля; 2 этап — с 03 по 14 июня; 3 этап — с 22 июля по 02 августа; 4 этап — с 02 по 13 сентября. Обработано 1100 га открытых стадий и 204 га закрытых. Пред- и постобработочный контроль численности комаров проводился выборочно. Согласно проведенному анализу, учет на объектах, подвергшихся обработке, в том числе и неоднократной, проводился 18 раз как в период, предшествующий обработке, так и после нее.

Результаты мониторинга и сведения по обработке объектов открытых и закрытых стадий вносили в базу данных картографического ресурса «ZikaMap», которое было создано специалистами Ставропольского института и размещено на сайте института [<http://snipchi.ru/pagehp?326>].

Статистическая обработка проводилась с использованием программы «Past» [<https://folk.uio.no/ohammer/past/>].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку одним из основных факторов, влияющим на численность комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, является санитарно-гигиеническое состояние придомовых территорий, в том числе в частном секторе, и подвальных помещений многоэтажных домов, прежде всего была проведена оценка

санитарно-гигиенического состояния территории основных населенных пунктов Республики Абхазия.

Город Гагра. Санитарно-гигиеническое состояние подвалов, подъездов, придомовой территории во многих высотных домах неудовлетворительное — подвалы в основном затоплены сточными водами (26 домов, 72%), придомовые территории замусорены, во дворах самопроизвольно течет вода из колонок, из-за чего происходит заболачивание.

Город Сухум. Санитарное состояние подвалов, подъездов, придомовой территории в г. Сухум неудовлетворительное. Подвалы некоторых домов остаются сырыми, затопленными (63 дома, 65%).

Город Гудаута. Состояние подвалов, подъездов, придомовой территории во многих высотных домах неудовлетворительное — сырые подвалы, вода (15 домов, 63%).

Поселок Агудзера, с. Мачары Гульрипшского района. Неудовлетворительное состояние придомовой территории и подвалов большинства домов (11 домов, 55%).

Поселок Новый Афон Гудаутского района. Состояние подвалов, подъездов, придомовой территории во многих высотных домах хорошее, подъезды сухие, дренажные канавки во дворах чистятся и убираются вовремя.

Комары *Ae. aegypti* на территории Республики Абхазия не выявлены. *Ae. albopictus* были обнаружены на территории от Очамчирского до Гагрского районов. Южнее обследование территории не проводилось.

Годовая динамика численности комаров *Ae. albopictus* в Республике Абхазия представлена на примере учетов в г. Сухум.

В результате наблюдения установлено, что численность имаго комаров *Ae. albopictus* в Республике Абхазия имеет статистически достоверную, но невысокую корреляцию с дневной температурой воздуха ($r=0,4, \leq 0,05$). Наиболее высокая численность комаров в г. Сухум отмечена в июле в период средней дневной температуры воздуха 26 — 27°C (33 особи/20 мин. учета).

В теплый период года имаго комаров *Ae. albopictus* регистрировались повсеместно на изученной территории Республики Абхазия. В открытых станциях их численность характеризовалась как «высокая».

Проведение противокомариных обработок на черноморском побережье Республики Абхазия координировала Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Россия). Инсектицидные обработки были проведены специалистами Московского областного центра дезинфекции в закрытых и открытых станциях городов Сухум, Гагра, Гудаута, а также в Гульрипшском, Гудаутском, Гагрском районах по согласованию с Министерством здравоохранения Республики Абхазия и с учетом рекомендаций специалистов Ставропольского противочумного института. Обработки проводили преимущественно на территории эпидемически значимых объектов и основных рекреационных зон республики.

Контроль эффективности инсектицидных работ, проведенный специалистами Ставропольского противочумного института, показал, что комары рода *Aedes* в закрытых станциях не обнаружены. В открытых станциях в течение 3 — 7 дней после дезинсекционных мероприятий комары *Ae. albopictus* непосредственно на обработанных участках обнаружены не были. Однако затем численность восстанавливалась по причине заселения новых комаров из близлежащих природных биотопов.

Риск вспышки лихорадки Зика в Республике Абхазия в настоящее время определен нами как «низкий», однако такая оценка связана только с отсут-

ствием местной передачи вируса. Низкий уровень санитарной очистки территории населенных пунктов Абхазии наряду с субтропическим климатом республики определяют благоприятные условия для жизнедеятельности комаров. Состояние численности и распространение потенциального переносчика — комара можно оценить как «достаточное для осуществления трансмиссивной передачи возбудителя болезни».

С учетом серьезности болезни, вызванной вирусом Зика, необходимо проведение более широкого комплекса методов контроля численности комаров в ареалах их обитания, особенно на эпидемиологически значимых объектах. Противокомариные мероприятия в 2017 году должны быть организованы с учетом данных мониторинга и анализа эффективности обработок, проведенных в 2016 г.

Санитарно-эпидемиологический надзор должен быть направлен, прежде всего, на благоустройство территории, ликвидацию свалок мусора, в том числе старых автомобильных покрышек, а также на предотвращение массового выплода комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* на территории эпидемиологически значимых объектов (крупные гостиницы, санатории, пансионаты, базы отдыха и другие объекты, активно посещаемые туристами) и в населенных пунктах их ближайшего окружения. Сокращение или ликвидация мест выплода комаров оказываются более эффективными мерами, чем борьба с имаго. Целенаправленную обработку мест выплода комаров следует проводить на территории в радиусе 500 м от точки выявления имаго комаров, за исключением частной застройки, лесной зоны за пределами города и иных труднодоступных и малопосещаемых людьми мест вне эпидемически значимых объектов.

Важное значение имеет усиление информационно-разъяснительной работы среди населения, особенно проживающего на территории частной малоэтажной застройки, владельцев дачных строений, о необходимости очистки территории от пластиковых емкостей, автошин и прочих объектов, пригодных для выплода комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, предотвращении длительного (более семи дней) хранения воды в различных открытых емкостях (ведра, баки, бочки, поилки для скота и т.п.). Жителям многоэтажных застроек — о своевременном устранении мелких скоплений воды в местах возможного выплода комаров (поддоны цветочных горшков, банки, пищевые пластиковые контейнеры и т.п.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганушкина Л.А., Безжонова О.В., Патраман И.В., Таныгина Е.Ю., Сергиев В.П. Распространение комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. и *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuc. на Черноморском побережье Кавказа. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2013, 1: 45-46.
2. Малецкая О.В., Беляева А.И., Таран Т.В., Агапитов Д.С., Куличенко А.Н. Эпидемиологические риски опасных инфекционных болезней в Республике Абхазия. Журн. микробиол. 2013, 5: 43-47.
3. Марциновский Е.И. О мероприятиях против лихорадки Денге в СССР. Российский журнал тропической медицины и ветеринарной паразитологии. 1929, 3 (VII): 162-165.
4. Переносчики вируса Зика и риск его распространения в Европейском регионе ВОЗ. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0018/304263/Zika-virus-vectors-and-risk-of-spread-in-European-Region-RU.pdf.
5. Рябова Т.Е., Юничева Ю.В., Маркович Н.Я. и др. Обнаружение комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. в г. Сочи. Мед. паразитол. 2005, 3: 3-5.
6. Сергиев В.П. Появление экзотических переносчиков арбовирусных лихорадок — новая

недостаточно оцениваемая биологическая угроза южным регионам России. Журнал инфектологии. 2011, 1 (3): 59-63.

7. European Centre for Disease Prevention and Control. Update on autochthonous dengue cases in Madeira, Portugal. Stockholm; 2013 (<http://ecdc.europa.eu/eu/publications/Publications/dengue-madeira-risk-assessment-update.pdf>, accessed 11 March 2016).

Поступила 29.03.17

Контактная информация: Малецкая Ольга Викторовна, д.м.н., проф., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-83

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

О.Е.Хохлова^{1,2}, О.В.Перьянова^{1,2}, О.П.Боброва³, В.В.Сергеева³, А.А.Модестов³, О.Г.Еремеева³, Н.К.Поткина², Д.Н.Капшук¹, А.В.Алабушева¹, Т.Ямамото^{2,4}

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТИЦИЛЛИН-РЕЗИСТЕНТНЫХ STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) — ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

¹Красноярский государственный медицинский университет; ²Российско-японский центр микробиологии, метагеномики и инфекционных заболеваний, Красноярск; ³Красноярский краевой клинический онкологический диспансер, Россия; ⁴Международный медицинский образовательно-исследовательский центр, Ниигата, Япония

Цель. Изучение молекулярно-генетических особенностей MRSA, вызывающих гнойно-воспалительные осложнения у онкологических больных. *Материалы и методы.* В работе использованы бактериологический метод, молекулярно-генетические методы — ПЦР, М-ПЦР, секвенирование. *Результаты.* Доля MRSA среди стафилококковых инфекций у онкологических больных в 2003 — 2007 гг. составила 37,6%, а в 2010 — 2015 гг. возросла до 51,3%. При исследовании молекулярно-генетических особенностей выделенных штаммов MRSA установили наличие двух основных клонов: ST239/spa3(t037)/SCCmecIIIa и ST8/spa1(t008)/SCCmecIVc. Представители клонов отличались уровнем резистентности к антибактериальным препаратам. *Заключение.* У онкологических больных в Красноярске выявлено распространение двух вариантов MRSA — ST239_{Крас} и ST8_{Крас}, соответствующих вариантам, распространенным в Красноярском крае.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 15—20

Ключевые слова: MRSA, генотипирование, антибиотикорезистентность, онкологические больные

O.E. Khokhlova^{1,2}, O.V. Peryanova^{1,2}, O.P. Bobrova³, V.V. Sergeeva³, A.A. Modestov³, O.G. Eremeeva³, N.K. Potkina², D.N. Kapshuk¹, A.V. Alabusheva¹, T. Yamamoto^{2,4}

MOLECULAR AND GENETIC FEATURES OF THE METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) — CAUSATIVE AGENTS OF PURULENT DISEASES AT CANCER PATIENTS

¹Krasnoyarsk State Medical University; ²Russia-Japan Center of Microbiology, Metagenomics and Infectious Diseases; ³Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Center, Russia; ⁴International Medical Education and Research Center, Niigata, Japan

Aim. Study of the molecular and genetic features of the MRSA, causative agents of purulent diseases at cancer patients. *Materials and methods.* In the work were used — bacteriological method, molecular genetic methods (PCR, M-PCR, sequencing). *Results.* MRSA share among staphylococcal infections at cancer patients in 2003 — 2007 has made 37,6%, and in 2010 — 2015

has increased up to 51,3%. At a research of molecular and genetic features of the allocated MRSA strains, have established, existence of two main clones: ST239/spa3(t037)/SCCmecIIIa and ST8/spa1(t008)/SCCmecIVc. Representatives of clones differed in resistance level to antibiotics. *Conclusion.* In cancer patients in Krasnoyarsk, the distribution of two variants of MRSA — ST239_{Kras} and ST8_{Kras}, corresponding to the variants common in the Krasnoyarsk region, was revealed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 15—20

Key words: MRSA, genotyping, resistance, cancer patients

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA) является одним из основных возбудителей, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью с начала 1960-х годов и вызывающий инфекции различной степени тяжести от абсцессов кожи и раневой инфекции до сепсиса, пневмонии, синдрома септического шока и других [7]. MRSA вызывают приблизительно 50% всех стафилококковых инфекций в стационарах России [2]. Традиционно MRSA являются причиной госпитальных инфекций (HA-MRSA). Другой класс MRSA, резистентность которого сформировалась во внебольничных условиях, выявлен в конце 1990-х годов (CA-MRSA) [3]. Молекулярные эпидемиологические исследования показали распространение нескольких основных госпитальных и внебольничных клонов MRSA в мире, различающихся по уровню вирулентности и антибиотикорезистентности [7].

Особой категорией пациентов являются онкологические больные, так как для них характерно снижение иммунологического ответа, наличие серьезных сопутствующих заболеваний, нарушение многих видов обмена [5]. Таким образом, риск развития инфекции, вызванной MRSA, у онкологических больных значительно повышен. Проведение рациональной терапии и профилактики невозможно без современных знаний об этиологии, молекулярно-генетических особенностях и антибиотикорезистентности возбудителей.

Целью работы явилось изучение молекулярно-генетических особенностей MRSA, вызывающих гнойно-воспалительные осложнения у онкологических больных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 4209 образцов от больных отделения анестезиологии-реанимации, торакального и хирургического отделений №1 Красноярского краевого клинического онкологического диспансера, прооперированных по поводу злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта (рак желудка, пищевода, поджелудочной железы, ободочной и прямой кишки) и рака легкого за период 2003 — 2015 гг. Материалом для исследования являлись бронхоальвеолярное содержимое и раневое отделяемое. Отбор материала производился объемно шприцем либо стандартным тампоном промышленного производства с использованием транспортной среды.

Посев бронхоальвеолярного содержимого, раневого отделяемого производили по методу Gould для оценки этиологической роли выделенных микроорганизмов на комплекс питательных сред — кровяной агар, желточно-солевой агар, хром-агар. Идентификацию исследуемых культур проводили на основании морфо-тинкториальных, культуральных и биохимических свойств,

используя помимо рутинных методов тест-системы Remel (США) для идентификации микроорганизмов.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона с использованием дисков OXOID (Великобритания). Чувствительность стафилококков к оксациллину (Sigma-Aldrich, США) проводили методом скрининга в соответствии с международными рекомендациями CLSI.

Для внутрилабораторного контроля определения антибиотикочувствительности и метициллинорезистентности использовали референс-штаммы из коллекции ATCC (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы WHONET (ВОЗ).

Для генетических исследований MRSA микроорганизмы культивировали в бульоне LB (Difco, Detroit, MI) при температуре 37°C до фазы логарифмического роста.

Для определения принадлежности к MRSA исследовали гены *nuc* и *meaA* с помощью ПЦР. Праймеры для выявления гена *nuc* необходимы для дифференциации MRSA и MSSA от коагулазонегативных стафилококков. Режим амплификации включал начальный цикл 94°C 3 мин. Следующие этапы амплификации включали денатурацию ДНК при 94°C в течение 90 сек.; отжиг при 55°C в течение 60 сек.; синтез в течение 60 сек при 72°C (30 циклов) и завершающий цикл в течение 10 минут при 72°C. Детекцию продуктов амплификации ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с использованием бромистого этидия. В качестве контроля молекулярной массы использовали 100 bp DNA ladder (Sigma-Aldrich, Япония) и KAPA Universal DNA ladder (KAPA, США).

С помощью ПЦР исследовали 47 генов патогенности: 3 лейкоцидина; 4 гемолизина; 2 белковых цитолизина (*psma*, *hld*); 19 генов стафилококковых энтеротоксинов (SE): *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *seu*; 3 эксфолиатина; *set*, *edin*, *ssl*; 14 генов адгезии; ACME-*arcA* и *—opp-3C* [9].

Молекулярное типирование штаммов MRSA проводили в соответствии с международными стандартами [9]. MLST типирование основано на изучении семи «генов домашнего хозяйства» и определения аллельного профиля (аллельный номер) с использованием вебсайта (<http://www.mlst.net/>). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения eBURST. Spa типирование проводили путем секвенирования с последующим анализом с использованием базы данных eGenomics (<http://tools.egenomics.com/>) или Ridom SpaServer (<http://spaserver.ridom.de/>). SCCmec типирование (I — V типы) — с применением ПЦР, М-ПЦР. Субтипирование SCCmec проводили в соответствии с рекомендациями [4, 8] (<http://www.staphylococcus.net/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У больных с опухолями ЖКТ и раком легкого при посеве промывных вод бронхов в 2003 — 2007 гг. и 2010 — 2015 гг. рост был получен в 64,1% и 82,7% соответственно, а при посеве раневого отделяемого в 2003 — 2007 гг. и 2010 — 2015 гг. — в 70,8% и в 74,5% случаев соответственно. Доля ассоциаций микроорганизмов в бронхоальвеолярном лаваже в 2003 — 2007 гг. и 2010 — 2015 гг. составила 40,2% и 65,1% соответственно. Доля ассоциаций микроорганизмов в раневом отделяемом в 2003 — 2007 гг. и 2010 — 2015 гг. составила 38,3% и 63,7% соответственно.

При исследовании патологических материалов у онкологических больных в 2003 — 2007 гг. в отделении анестезиологии-реанимации и торакальном отделении в составе микрофлоры преобладали грамположительные микроорганизмы, выделенные в 34,6 и 50,9% случаев соответственно и представленные *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и *Enterococcus spp.* В хирургическом отделении в ранах доминировали представители семейства *Enterobacteriaceae* (45,5%), представленные в основном *Escherichia coli*.

В 2010 — 2015 гг. доминирующей микрофлорой ран в отделении анестезиологии-реанимации, торакальном и хирургическом отделениях являются грамположительные микроорганизмы, выделенные в 34,8%; 31,3% и 42,3% соответственно.

При исследовании раневого отделяемого и отделяемого дыхательных путей у онкологических больных в 2003 — 2007 гг. в отделении анестезиологии-реанимации доля MRSA составила 52,7%, а в 2010 — 2015 гг. — возросла до 61,3%. В торакальном отделении доля MRSA в 2003 — 2007 гг. составила 24,9%, в 2010 — 2015 гг. — 43,3%. В хирургическом отделении доля MRSA в 2003 — 2007 гг. составила 35,1%, а в 2010 — 2015 гг. — 49,4%.

У 4 штаммов MRSA, выделенных от разных онкологических больных в 2013 — 2015 гг., изучили молекулярно-генетические особенности (табл.). Все выделенные штаммы MRSA были PVL-негативными.

Выявлено наличие двух клонов MRSA, распространенных у онкобольных.

Три штамма MRSA (75%) относились к варианту ST239/spa3(t037)/SCCmecIIIA, имели гены *lukED*, гены, кодирующие адгезины, гемолизины и ген TSST-1, кодирующий токсин синдрома токсического шока, а также гены *sek seq*, кодирующие энтеротоксины (табл., рис.). У данных штаммов выявлена уникальная для Бразильского клона комбинация генов *tst*, *sek*, *sep*, *spa*. Токсин синдрома токсического шока (TSST-1) относится к суперантигенам, т.е. вызывает неспецифическую активацию Т-лимфоцитов, что значительно утяжеляет течение заболевания.

Характеристика MRSA, выделенных от онкологических больных в 2013 — 2015 гг.

Молекулярно-генетические характеристики	Определяемые вирулентности	Штаммы MRSA, изолированные от разных онкобольных	
		(n=1)	(n=3)
CC-		8	8
ST"		8	239
spa		1 (t008)	3 (t037)
SCCmec*		IV.3.1.1 (IVc)	III.1.1.2 (IIIa)
	Токсины:		
	Лейкоцидины	—	—
	<i>luk_{py}SF</i>	+	+
	<i>lukE-lukD</i>	—	—
	<i>lukM</i>		
	Гемолизины	+	+
	<i>hla</i> , <i>hlg</i> , <i>hlg-v</i>	(+)	(+)
	<i>hly</i> (split)		
	Белковые цитолитины	+	+
	<i>psmα</i> , <i>hld</i>		
	Энтеротоксины	+	—
	<i>sea</i>	—	+
	<i>tst</i>	—	—
	<i>sec</i> , <i>sep</i>	—	—
	<i>seb</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> , <i>seh</i> , <i>set</i>	—	+
	<i>Sap15</i> (<i>sek</i> , <i>seq</i>)	—	—
	<i>sej</i> , <i>seu</i>	—	—
	<i>egc</i> *		
	Эксфолиатины	—	—
	<i>eta</i> , <i>etb</i> , <i>etd</i>		
	Адгезины:	+	+
	<i>c12ag</i> '	—	+
	<i>сна</i>	—	—

Примечание. n=1 и n=3 — число штаммов, выделенных от разных онкобольных, CC- — клональный комплекс, ST" — сиквенс тип, SCCmec* — тип стафилококковой хромосомной кассеты, *egc** — кластер генов *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, кодирующих синтез энтеротоксинов, *c12ag*' — кластер генов *icaA*, *icaD*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *clfA*, *clfB*, *fib*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, кодирующих синтез адгезинов.

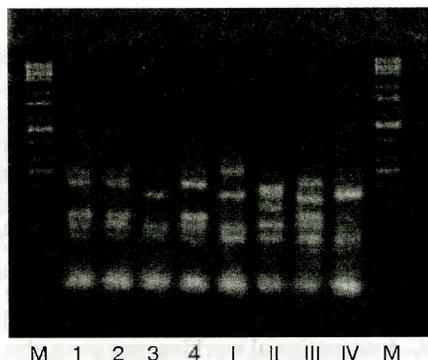
Бразильский клон, относящийся к генотипу ST239 MRSA, широко распространен во всем мире, но обычно не имеет *tst*-гена. В отличие от других ST239 вариантов штаммы, изолированные в Красноярске, продуцировали токсин синдрома токсического шока.

Один штамм MRSA (25%) относился к варианту ST8/*spa1*(t008)/SCCmecIVc, у таких штаммов установлено наличие генов *lukED*, генов, кодирующих адгезины, гемолизина, и они были положительными для гена *sea*, кодирующего энтеротоксин (табл., рис.).

По результатам исследования антибиотикорезистентности установили, что представители варианта SCCmecIII отличались множественной лекарственной устойчивостью, в т.ч. в 100% случаев резистентны к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам, сульфаметоксазолу, рифампицину, тетрациклину и в 66,7% случаев к хлорамфениколу. В 100% случаев чувствительны к ванкомицину, линезолиду. Представители клона MRSA SCCmecIVc в 100% случаев резистентны к аминогликозидам, тетрациклинам, макролидам, линкозамидам, хлорамфениколу. В 100% случаев чувствительны к фторхинолонам, сульфаметаксазолу, рифампицину, ванкомицину, линезолиду.

Доминирующими клонами MRSA в России являются ST239/*spa3*(t037)/SCCmecIII, ST239/*spa351*(t030)/SCCmecIII и ST8/*spa1*(t008)/SCCmecIV [1, 6]. В европейской части России (Москва, Санкт-Петербург), в Кургане, на Дальнем Востоке России (Владивосток) более распространен вариант ST239/*spa351*(t030)/SCCmecIII.1.1.4 [11]. В Красноярске распространенным вариантом линии ST239 является уникальный вариант ST239_{Крас}, характеризующийся наличием гена *tst*, кодирующего токсин синдрома токсического шока [6]. Второй клональной линией MRSA, распространенной в России и Красноярском крае, является линия MRSA ST8 [10]. В Красноярске выявлено распространение уникального клона MRSA ST8_{Крас}, у которого *sra* тип (*spa1*[t008]) соответствовал *sra* типу ST8 варианта, выявленного ранее в других регионах России, но отличался от штаммов, выделенных во Владивостоке (ST8*spa826*[t:unknown]). У вариантов ST8_{Крас}, выделенных в Красноярском крае, и ST8, выделенных во Владивостоке, выявлены SCCmecIV.3.1.1(IVc) и имеется ген *sea* [11].

Таким образом, установлено увеличение доли MRSA среди *S. aureus*, вызывающих инфекционные осложнения у онкологических больных с 32,7% в 2003 — 2007 гг. до 52,5% в 2010 — 2015 гг. У онкологических больных в Красноярске выявлено распространение двух вариантов MRSA — ST239_{Крас} и ST8_{Крас}, различающихся чувствительностью к антибиотикам, что важно при подборе антибактериальной терапии. Варианты MRSA, выделенные от онкологических больных, соответствовали вариантам, распространенным в Красноярском крае.



Результаты типирования SCCmec у штаммов MRSA, выделенных от онкологических больных.

Примечание: М — маркер ДНК (100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000, 4000, 5000 п.н.); 1—4 — штаммы MRSA, выделенные от 4 разных онкобольных; I—IV — контрольные штаммы, в т.ч. I — тип SCCmecI (MRSA NCTC10442), II — тип SCCmecII (MRSA N315), III — тип SCCmecIII (MRSA 85/2082), IV — тип SCCmecIV (MRSA JCSC4788).

ЛИТЕРАТУРА

1. Романов А.В., Чернов Е.А., Эйдельштейн М.В. Молекулярная эпидемиология внутрибольничных золотистых стафилококков в стационарах различных регионов России. Молекулярная медицина 2013, 4: 55-64.
2. Сухорукова М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2014, 16 (4): 280-286.
3. DeLeo F.R., Otto M., Kreiswirth B.N. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2010, 375: 1557-1568.
4. International working group on the classification of staphylococcal cassette chromosome elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrob. Agents Chemother. 2009, 53: 4961-4967.
5. Kenneth V. I. et al. Tarrand current microbiology of surgical site infections in patients with cancer: a retrospective review. Infect. Dis. Ther. 2014, 3: 245–256
6. Khokhlova O.E., Hung W.-C., Wan T.-W. et al. Healthcare- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and fatal pneumonia with pediatric deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: Unique MRSA's multiple virulence factors, genome, and stepwise evolution. PLoS One. 2015, 1: 1-30.
7. Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J. et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. 2007, 298: 1763-1771.
8. Kondo Y., Ito T., Ma X.X. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. Antimicrob. Agents Chemother. 2007, 51: 264-274.
9. Takano T., Hung W.C., Shibuya M. et al. A new local variant (ST764) of the globally disseminated ST5 lineage of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the virulence determinants of community-associated MRSA. Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57: 1589-1595.
10. Wan T.-W., Khokhlova O.E., Iwao Y. et al. Complete circular genome sequence of successful ST8/SCCmecIV community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OC8) in Russia: One-megabase genomic inversion, IS256's spread, and evolution of Russia ST8-IV. PLoS One. 2016, 11 (10): 1-25.
11. Yamamoto T., Takano T., Higuchi W. et al. Comparative genomics and drug resistance of a geographic variant of ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged in Russia. PLoS One. 2012, 7: e29187.

Поступила 20.03.17

Контактная информация: Хохлова Ольга Евгеньевна, к.б.н.,
660022, ул. Партизана Железняка, 1, р.т. (391)220-13-61

М.В.Сычева^{1,2}, Ю.И.Пешкова², О.Л.Карташова^{1,2}, А.В.Андреева³

РЕГУЛЯЦИЯ АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТАГОНИСТИЧЕСКИ АКТИВНЫМ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМ МУТУАЛИСТИЧЕСКОЙ МИКРОФЛОРЫ

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Оренбургский государственный аграрный университет; ³Башкирский государственный аграрный университет, Уфа

Цель. Изучение влияния антимикробных пептидов (АМП) на чувствительность условно патогенных микроорганизмов к действию антагонистически активных представителей мутуалистической микрофлоры. *Материалы и методы.* В исследовании использовали пептиды из тромбоцитов кур, полученные методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя. Влияние АМП на чувствительность микроорганизмов к антагонистически активным веществам доминантных бактерий рода *Lactobacillus* и *Enterococcus* исследовали при совместном инкубировании. Антагонистическую активность бактерий изучали чашечным методом. *Результаты.* Показано усиление экспрессии антагонистической активности индигенной микрофлоры в отношении ассоциативной микрофлоры после ее соинкубирования с пептидными фракциями из тромбоцитов кур. *Заключение.* Полученные результаты позволяют предположить существование новых механизмов формирования колонизационной резистентности биотопа.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 21—25

Ключевые слова: антимикробные пептиды, тромбоциты кур, антагонизм, колонизационная резистентность

M.V.Sycheva^{1,2}, Yu.I.Peshkova², O.L.Kartashova^{1,2}, A.V.Andreeva³

REGULATION OF MICROORGANISMS SENSITIVITY TO ANTAGONISTIC ACTIVE REPRESENTATIVES OF MUTUALISTICALLY MICROFLORA BY THE ANTIMICROBIAL PEPTIDES

¹Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Orenburg State Agrarian University; ³Bashkir State Agrarian University, Ufa, Russia

Aim. Study of the effect of antimicrobial peptides (AMP) on the sensitivity of the conditional pathogenic of bacteria to the action of antagonistic active of representatives mutualistically microflora. *Materials and methods.* The study used peptides from platelets of chicken obtained by the method of reversed-phase high-performance liquid chromatography in stepwise and linear gradients of increasing concentrations of organic solvent. The effect of AMP on the sensitivity of microorganisms to antagonistic active substances of the dominant bacteria of the genus *Lactobacillus*, and *Enterococcus* were investigated in a joint incubation. Antagonistic activity of bacteria studied the gup method. *Results.* Shown an increased expression of antagonistic activity of indigenous microflora in relation to associative microflora after concubinage with a peptide fractions from platelets of chicken. *Conclusion.* The obtained results allow to assume the existence of new mechanisms of formation of the colonization resistance of the biotope.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 21—25

Key words: antimicrobial peptides, platelets of chicken, antagonism, colonization resistance

ВВЕДЕНИЕ

Живущие на планете организмы никогда не развивались в условиях бактериальной стерильности, поэтому функционирование практически всех органов и систем человека и животных неразрывно связано с микроорганизмами [1]. Представители индигенной микрофлоры, колонизируя определенные биотопы, вступают в тесные взаимоотношения с макроорганизмом и играют важную роль в поддержании состояния его здоровья, регулируя численность микробиоты, в том числе, с помощью антагонистической активности.

Из данных литературы известно, что антагонистическая активность микроорганизмов может модифицироваться под воздействием факторов различной природы [5, 12, 14]. Уместно предположить существование механизмов, способных регулировать чувствительность условно патогенных микроорганизмов к антагонистически активным веществам мутуалистической микрофлоры. К числу таких механизмов могут относиться и факторы врожденного иммунитета, например, антимикробные пептиды (АМП) — многофункциональные эффекторные молекулы, обеспечивающие первую линию защиты от патогенов.

Выяснение этого предположения и определило цель нашей работы — изучить влияние АМП на чувствительность условно патогенных микроорганизмов к действию антагонистически активных представителей мутуалистической микрофлоры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований явились три гомогенные пептидные фракции с выраженным антимикробным действием, полученные из уксуснокислого экстракта тромбоцитов курицы домашней методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя. Перед постановкой опыта антимикробные пептиды ресуспендировали в растворе 0,01% уксусной кислоты, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Германия).

В работе использовали штаммы-антагонисты из числа доминантных представителей микрофлоры — *Lactobacillus* spp. и *Enterococcus faecium* [6], выделенные из кишечного биотопа. В качестве индикаторных культур использовали вирулентные штаммы *Staphylococcus aureus* [3] и *Enterococcus faecalis*, изолированные от больных с инфекционно-воспалительными заболеваниями. Культуры энтерококков и стафилококков идентифицировали с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием известных праймеров [8, 9]. Идентификацию лактобацилл проводили общепринятыми методами по Берджи.

Для определения влияния АМП из тромбоцитов курицы домашней на чувствительность индикаторных культур к антагонистически активным веществам представителей мутуалистической микрофлоры клоны *S. aureus* и *E. faecalis* соинкубировали с пептидными фракциями в минимальной подавляющей концентрации (МПК) и $1/4$ МПК, установленных нами ранее [2], в Мюллер-Хинтон бульоне (HiMedia, Индия) в течение 1 часа при 37°C с последующим высевом на Мюллер-Хинтон агар (HiMedia, Индия). В качестве контроля использовали те же культуры микроорганизмов, которые инкубировали в Мюллер-Хинтон бульоне, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина с добавлением раствора 0,01% уксусной кислоты.

Антагонистическую активность бактерий изучали чашечным методом (принцип отсроченного антагонизма) [4]. Диаметр зон задержки роста чувствительных культур и диаметр зон роста штаммов-продуцентов измеряли при помощи штангенциркуля. Коэффициент антагонистической активности вычисляли как отношение диаметра зоны задержки роста условно патогенного микроорганизма к диаметру зоны роста штамма-продуцента.

Эксперименты проводились в трех сериях при трехкратном воспроизведении. Результаты обработали с использованием критерия Стьюдента и представили в виде средней арифметической и ее ошибки ($X \pm Sx$). В качестве минимально допустимого использовали уровень значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении чувствительности индикаторных культур к факторам межмикробного взаимодействия доминантных *E. faecium* и *Lactobacillus* spp. установлено выраженное однонаправленное стимулирующее влияние тромбоцитарных АМП на рассматриваемый признак.

Максимальное увеличение чувствительности клонов золотистого стафилококка к антагонистически активным бактериям рода *Lactobacillus* зарегистрировано после предварительного соинкубирования с АМП первой и третьей фракции в $1/4$ МПК (рис. 1).

При этом коэффициент антагонистической активности лактобацилл значительно увеличивался в 2,2 ($p < 0,01$) и 2,3 раза ($p < 0,001$) соответственно. В меньшей степени повышалась чувствительность *S. aureus* к антагонистически активным веществам под действием АМП третьей фракции в МПК — до $12,4 \pm 0,52$ ($p < 0,01$). Пептиды первой фракции в МПК и второй в $1/4$ МПК увеличивали коэффициент антагонистической активности лактобацилл в среднем в 1,8 раза до $10,9 \pm 0,79$ и $10,6 \pm 0,45$ ($p < 0,05$) соответственно. Умеренное увеличение чувствительности клонов *S. aureus* к антагонистически активным веществам *Lactobacillus* spp. зарегистрировано после соинкубирования с пептидами второй фракции в МПК ($9,2 \pm 0,24$ против $6,2 \pm 1,00$ в контроле, $p < 0,05$).

Аналогичные результаты были получены при исследовании антагонистической активности *E. faecium* в отношении клонов *E. faecalis* после предварительного соинкубирования последних с антимикробными пептидами из тромбоцитов курицы домашней. Максимальный стимулирующий эффект в отношении чувствительности клонов фекального энтерококка к антагонистически активным веществам *E. faecium* был выявлен у АМП третьей фракции в МПК и первой в $1/4$ МПК: коэффициент антагонистической активности значительно увеличивался до $4,3 \pm 0,64$ ($p < 0,05$) и $4,0 \pm 0,12$ ($p < 0,001$) соответственно против $0,99 \pm 0,350$ в контроле.

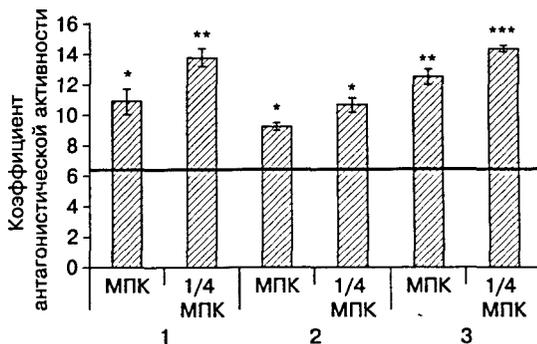


Рис. 1. Влияние АМП из тромбоцитов кур на чувствительность клонов *S. aureus* к антагонистически активным веществам лактобацилл.

Примечание. * Достоверность различий выраженности коэффициента антагонистической активности *Lactobacillus* spp. в отношении клонов *S. aureus* в контроле и после соинкубирования с АМП из тромбоцитов кур ($p < 0,05$); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; горизонтальная черта — контроль; 1, 2, 3 — пептидные фракции.

Высокий стимулирующий потенциал выявлен у антимикробных пептидов первой ($p < 0,01$) и третьей фракции в МПК.

В меньшей степени стимулирующая способность была выражена у пептидов второй фракции в МПК и $1/4$ МПК: значение коэффициента антагонистической активности увеличивалось до $2,7 \pm 0,70$ и $3,0 \pm 0,40$ ($p < 0,05$) соответственно (рис. 2).

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлена способность антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней повышать чувствительность условно патогенных микроорганизмов к антагонистически активным представителям мутуалистической микрофлоры кишечника. Максимальный стимулирующий эффект оказали антимикробные пептиды первой и третьей фракций в $1/4$ МПК.

Мы полагаем, что обладая способностью усиливать чувствительность условно патогенных бактерий к антагонистическому действию представителей индигенной микрофлоры кишечника, АМП могут вносить определенный вклад в формирование колонизационной резистентности биотопа, препятствуя развитию дисбиотических и инфекционных состояний.

В качестве иллюстрации этой гипотезы следует рассматривать результаты экспериментальных работ, направленных на изучение гомеостазирующей роли АМП в кишечном биотопе [7, 13]. Доказано, что антимикробные пептиды могут регулировать работу и видовой состав полезных симбиотических микроорганизмов у многоклеточных видов [10]. Результаты работы N.H. Salzman свидетельствуют о том, что α -дефенсины млекопитающих, конститутивно синтезируемые клетками Панета слизистой оболочки кишечника, играют важную роль в функционировании микробиома животных [11].

Вышеизложенное подтверждает тот факт, что функциональная активность АМП не ограничивается антимикробным действием, а включает регуляцию широкого спектра биологических свойств микроорганизмов, тем самым обеспечивая колонизационную резистентность биотопа.

Прикладной аспект проведенных исследований заключается в возможности разработки на основе АМП, выделенных из тромбоцитов курицы домашней, нового перспективного класса антимикробных препаратов, которые могут быть в будущем использованы для терапии инфекционно-воспалительных заболеваний и коррекции дисбиозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алехина Г.Г., Суворов А.Н. Пробиотики — новый подход к старым проблемам. *Успехи современного естествознания*. 2007, 6: 36-39.
2. Сычева М.В., Васильченко А.С., Рогожин Е.А., Пашкова Т.М., Попова Л.П., Карташова О.Л. Биологическая активность антимикробных пептидов из тромбоцитов кур. *Журн. микробиол.* 2016, 2: 24-30.
3. Карташова О.Л., Уткина Т.М., Попова Л.П. Штамм бактерий *Staphylococcus aureus*,

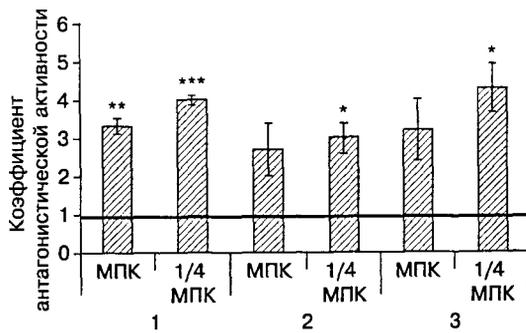


Рис. 2. Влияние АМП из тромбоцитов кур на чувствительность клонов *E. faecalis* к антагонистически активным веществам *E. faecium*.

Примечание. * Достоверность различий выраженности коэффициента антагонистической активности *E. faecium* в отношении клонов *E. faecalis* в контроле и после соинкубирования с АМП из тромбоцитов кур ($p < 0,05$); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; горизонтальная черта — контроль; 1, 2, 3 — пептидные фракции.

используемый в качестве тест-культуры для отбора бактериальных средств. Патент РФ № 2568058. Бюл. № 8 от 20.03.2015 г.

4. Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г. Бактериоциногенез. М.: Медицина, 1966.
5. Семенов А.В., Сгибнев А.В., Черкасов С.В., Бухарин О.В. Микробная регуляция антагонистической активности бактерий. БЭБИМ. 2007, 144 (11): 545-548.
6. Сычева М.В., Карташова О.Л., Щепитова Н.Е. Штамм бактерий *Enterococcus faecium*, обладающий антагонистической активностью в отношении бактерий рода *Listeria* и вида *Enterococcus faecalis*. Патент РФ № 2571852. Бюл. № 35 от 20.12.2015 г.
7. Giorgetti G., Brandimarte G., Fabiocchi F. et al. Interactions between innate immunity, microbiota, and probiotics. *J. Immunol. Res.* 2015. DOI: 10.1155/2015/501361.
8. Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. Use of a genus- and species- specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J. Clinical Microbiology.* 2004, 42(8): 3558-3565.
9. Morot-Bizot S.C., Talon R., Leroy S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 97(5): 1087-1094.
10. Maróti G., Kereszt A., Kondorosi E. et al. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res. Microbiol.* 2011, 162 (4): 363-374.
11. Salzman N.H. Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes.* 2010, 1(6): 401-406.
12. Shapiro J.A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1998, 52: 81-104.
13. Wang S., Thacker P.A., Watford M. et al. Functions of antimicrobial peptides in gut homeostasis. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2015, 16 (7): 582-591.
14. Yan L., Boyd K.G., Adams D.R. et al. Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in bacilli. *Appl. Environmental Microbiol.* 2003, 69: 3719-3727.

Поступила 10.05.17

Контактная информация: Сычева Мария Викторовна, д.б.н., 460014, Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, р.т. (3532) 68-97-13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

А.А.Асратян^{1,2}, Е.Г.Симонова^{2,4}, С.М.Казарян^{1,2}, О.А.Орлова³,
К.В.Ильенкина², С.Р.Раичич⁴, Н.Б.Сипачева¹, Н.В.Каражас¹

ЭПШТЕЙНА-БАРР ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: СОВРЕМЕННАЯ СИТУАЦИЯ И КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ У ЖЕНЩИН ДЕТОРОДНОГО ВОЗРАСТА И НОВОРОЖДЕННЫХ

¹Федеральный НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва;

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;

³Городская клиническая больница № 8, Челябинск; ⁴Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

Цель. Изучение современных проявлений манифестного и скрыто протекающего эпидемического процесса Эпштейна-Барр инфекции, а также выявлении ее особенностей среди женщин детородного возраста и новорожденных. *Материалы и методы.* Проведен эпидемиологический анализ заболеваемости инфекционным мононуклеозом и ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации. Изучены тенденции динамики заболеваемости, ее распределение по территориям и возрастным группам. На неблагоприятной территории проведено изучение частоты выявления маркеров инфицирования у женщин фертильного возраста, в т.ч. ВИЧ-инфицированных беременных, а также новорожденных. *Результаты.* Установлено, что несмотря на сложности диагностики, заболеваемость инфекционным мононуклеозом следует рассматривать как индикатор манифестно протекающего эпидемического процесса Эпштейна-Барр инфекции. У беременных ВИЧ-инфицированных женщин, в отличие от здоровых беременных, маркеры острой инфекции, протекавшей без клинических проявлений, наблюдались достоверно чаще. Максимальная интенсивность активно протекающего эпидемического процесса выявлена среди беременных 15

— 19 лет, находящихся в латентной стадии течения ВИЧ-инфекции с заражением при внутривенном введении наркотиков. В более старших возрастных группах беременных наблюдалась реинфекция. Высокая инфицированность новорожденных, а также обнаружение маркеров острой инфекции свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований с целью получения строгих доказательств вертикальной передачи возбудителя. **Заключение.** Получены доказательства высокой активности эпидемического процесса Эпштейна-Барр инфекции среди женщин фертильного возраста. Максимальная частота маркеров инфицирования выявлена среди ВИЧ-инфицированных беременных, что повышает риск внутриутробного инфицирования плода и новорожденных.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 25—31

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барр, инфекционный мононуклеоз, женщины детородного возраста, новорожденные, ВИЧ-инфицированные беременные

A.A.Asratyan^{1,2}, E.G.Simonova^{2,4}, S.M.Kazaryan^{1,2}, O.A.Orlova³, K.V.Ilenkina², S.R.Raichich⁴, N.B.Sipacheva¹, N.V.Karazhas¹

EPSTEIN-BARR VIRAL INFECTION: MODERN SITUATION AND CLINICAL-EPIDEMIOLOGICAL FEATURES AMONG FERTILE WOMEN AND NEWBORNS

¹Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow; ²Sechenov First Moscow State Medical University; ³City Clinical Hospital No 8, Chelyabinsk; ⁴Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Aim. The investigate the current manifestations of the symptomatic and inapparent epidemic process of Epstein-Barr infection, as well as identification of its features in women of childbearing age and newborns. *Materials and methods.* We performed an epidemiological analysis of the incidence of infectious mononucleosis and HIV infection in the Russian Federation. The trends of morbidity and its distribution across the territories and age groups was studied. A study was made on the frequency of detection of infection markers in women of childbearing age, incl. HIV-infected pregnant women and newborns. *Results.* It has been established that despite the complexity of the diagnosis, the incidence of infectious mononucleosis should be considered as an indicator of the epidemic process of the Epstein-Barr infection. Unlike healthy pregnant women, in HIV-infected pregnant women markers of acute infection that occurred without clinical manifestations were observed significantly more frequent. The maximum intensity of the active epidemic process was detected among 15 — 19 years old pregnant women who are in the latent stage of HIV with intravenous drug abuse. In older age groups of pregnant women, reinfection was observed. High incidence in newborns, as well as detection of markers of acute infection indicate the need for further research to obtain strong evidence of vertical transmission of the pathogen. *Conclusion.* The study showed evidence of high activity of the epidemic process of Epstein-Barr infection in fertile women. The maximum frequency of infection markers was found among HIV-infected pregnant women, which increases the risk of intrauterine infection of the fetus and newborns.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 25—31

Key words: Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, women of childbearing age, newborns, HIV-infected pregnant women

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы отмечается рост иммунодефицитных состояний среди населения [7], на фоне которых наблюдаются значительные изменения в структуре инфекционной патологии, связанные с ростом заболеваемости оппортунистическими инфекциями [2]. Герпесвирусная патология относится к числу наиболее распространенных среди населения оппортунистических

инфекций, интерес к изучению которых возрастает из года в год. Из всех вирусов герпеса наименее изучен вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) [3, 4], вызывающий различную патологию, включая инфекционный мононуклеоз (ИМ), который характеризуется трудностью диагностики, а также высокой социально-экономической значимостью, обусловленной длительной потерей трудоспособности [1, 5].

В настоящее время известно, что к эпидемиологическим особенностям Эпштейна-Барр вирусной инфекции (ЭБВИ) относят ее повсеместное распространение, которое чаще проявляется в виде бессимптомного носительства возбудителя (в развитых странах около 50% детей в возрасте до пяти лет инфицированы ВЭБ), значительный рост заболеваемости (за последнее десятилетие она выросла в 5 раз), преимущественное вовлечение в эпидемический процесс детей, подростков и молодежи, доля которых в структуре заболеваемости достигает 65 — 80%, а также нарастание числа манифестных случаев, регистрируемых среди взрослых [10]. Исследователи полагают, что это обусловлено как истинным увеличением заболеваемости вследствие действия различных экзогенных и эндогенных факторов, так и улучшением качества лабораторной диагностики этой инфекции [5].

Актуальность проблемы связана также с доказанной ведущей ролью ВЭБ не только в инфекционной, но и в онкологической и иммунологической патологии человека [8]. Современное внимание клиницистов приковано к изучению влияния ВЭБ на течение ВИЧ-инфекции, при которой манифестация наступает в любом возрасте и запускает развитие таких патологических процессов, как оральная волосовидная лейкоплакия, лимфоцитарная интерстициальная пневмония и неходжкинские лимфомы (иммунобластные, типа Беркитта, большеклеточные, а также ассоциированные с герпесвирусом человека 8 типа) [6].

У женщин детородного возраста — здоровых беременных, а также женщин с патологией беременности и акушерско-гинекологической патологией, сопровождающейся невынашиванием плода, привычными выкидышами, бесплодием, часто имеются признаки снижения показателей иммунитета с формированием временных иммунодефицитов [6]. Физиологический иммунодефицит беременных усугубляется клиническими проявлениями ВИЧ-инфекции, что способствует развитию сопутствующих инфекционных заболеваний, в т.ч. вызванных ВЭБ [9, 11].

Цель исследования состояла в изучении современных проявлений манифестного, хронического и скрыто протекающего эпидемического процесса ЭБВИ, а также выявлении клинико-эпидемиологических особенностей данной инфекции среди женщин детородного возраста и новорожденных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из всего многообразия клинических форм ЭБВИ в настоящее время официально учету и регистрации в Российской Федерации подлежат только отдельные манифестные формы, а точнее — ИМ, большинство случаев которого этиологически связано с ВЭБ. Поскольку развитие ЭБВИ чаще происходит на фоне иммунодефицитных состояний, проведен сопряженный эпидемиологический анализ заболеваемости ИМ и ВИЧ-инфекцией. Изучены тенденции динамики заболеваемости за период с 2010 по 2014 гг., ее распределение по территориям и возрастным группам.

Клинико-эпидемиологические исследования проводились в одном из неблагоприятных по ВИЧ-инфекции и ИМ регионе — Челябинске. Под наблю-

дение были взяты 61 ВИЧ-инфицированная беременная и 49 рожденных от них детей. Контрольную группу составили здоровые женщины фертильного возраста ($n=63$), здоровые беременные ($n=45$), а также дети, рожденные от здоровых беременных ($n=31$). Критерием исключения для контрольной группы явилось наличие клинических проявлений ЭБВИ.

Лабораторная диагностика ЭБВИ проводилась на основе выявления в сыворотке крови антител классов G к раннему антигену EA, IgG к ядерному антигену NA и IgM к ВЭБ методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Для выявления особенностей инфицирования беременных и новорожденных ретроспективно проанализированы 239 историй родов и амбулаторных карт беременных.

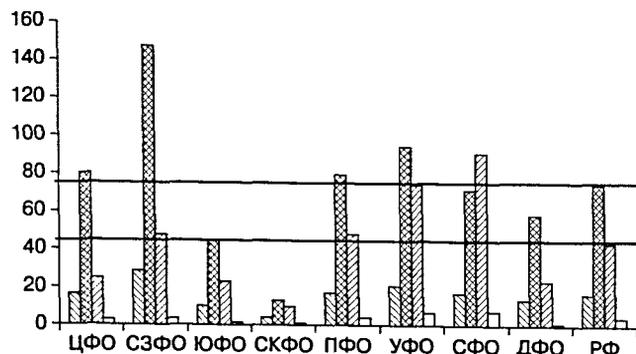
Статистическую обработку результатов исследований проводили стандартными методами с использованием прикладных пакетов программ «Excel 2000», а также статистического калькулятора (<http://medstatistic.ru>). Для определения статистической значимости различий полученных величин применяли t-критерий Стьюдента, а также хи-квадрат.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты эпидемиологического анализа показали, что заболеваемость ИМ, регистрируемая в Российской Федерации, в последние годы составила в среднем 16,4 случаев на 100 тыс. населения. Ее распределение по территориям характеризовалось неравномерностью: от 3,9 случаев на 100 тыс. населения в Северо-Кавказском федеральном округе (СКФО) до 28,6 случаев на 100 тыс. населения — в Северо-Западном федеральном округе (СЗФО) (рис.).

Установлено, что заболеваемость ИМ детей на всех без исключения территориях в среднем в 4,6 раза превышала заболеваемость совокупного населения и колебалась от 12,7 до 147,2 случаев на 100 тыс. Максимальный уровень заболеваемости детей регистрировали в СЗФО, УФО, ЦФО (Центральном федеральном округе) и ПФО (Приволжском федеральном округе).

Низкие показатели регистрируемой заболеваемости предположительно свидетельствуют о проблемах, связанных с диагностикой ИМ, что, безусловно, отражается на качестве официальной статистики, согласно которой к



Территориальное распределение заболеваемости инфекционным мононуклеозом (ИМ) и впервые выявленной ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации в 2010 — 2014 гг. (среднегодовые показатели на 100 тысяч населения).

В каждой группе столбиков (слева направо): ИМ, всего; ИМ, дети до 17 лет; ВИЧ, всего; ВИЧ, дети до 17 лет.

территориям эпидемиологического неблагополучия, кроме СЗФО, также относится Уральский федеральный округ (УФО). Здесь заболеваемость ИМ составила 21,0 случаев на 100 тыс. населения и наблюдалась на фоне высокого уровня заболеваемости ВИЧ-инфекцией (74,7 на 100 тыс. населения).

В динамике на всех территориях России отмечалась тенденция к росту заболеваемости ИМ, различающаяся по скорости. Наиболее интенсив-

ный рост заболеваемости ВИЧ-инфекцией и ИМ как среди детей, так и среди взрослых наблюдался в УФО. Скорость эпидемического распространения ВИЧ-инфекции среди совокупного населения составила $10,0\text{‰}$, а ИМ среди детей — $5,9\text{‰}$ в год.

Изучение распространенности ЭБВИ среди женщин детородного возраста на одной из территорий УФО показало, что максимальная частота обнаружения маркеров острой инфекции (IgM) была выявлена среди ВИЧ-инфицированных беременных ($p < 0,05$), которая составила 6,5% и была в 1,5 раза выше в сравнении со здоровыми беременными (4,4%) и в 2 раза выше — с группой здоровых женщин фертильного возраста (3,2%).

Маркеры реинфицирования ВЭБ (IgG EA и IgG NA) также чаще выявлялись среди ВИЧ-инфицированных беременных — практически у каждой четвертой женщины (24,6%). Частота обнаружения данных маркеров среди здоровых женщин фертильного возраста составила 17,4%, а среди здоровых беременных — всего 7,0%.

Полученные результаты свидетельствуют о широкой циркуляции ВЭБ среди женщин детородного возраста. Как острая, так и реинфекция встречаются во всех изученных группах, однако максимальная частота активно текущей инфекции выявлена среди ВИЧ-инфицированных беременных (хи-квадрат 5,9; $p < 0,05$).

В этой связи изучены клинико-эпидемиологические особенности ЭБИ среди ВИЧ-инфицированных беременных. Установлено, что во всех случаях выявление маркеров инфицирования сопровождалось отсутствием клинических проявлений. Маркеры острой ЭБВИ обнаружены только у беременных, употреблявших наркотические вещества внутривенно (11,8%). Маркеры реинфекции выявлялись у женщин с внутривенным употреблением наркотиков и половым путем заражения ВИЧ-инфекцией в анамнезе практически с одинаковой частотой (26,4 и 22,2% соответственно).

Специфические антитела класса М выявляли среди ВИЧ-инфицированных беременных в возрасте 15 — 19 лет (10%), а также в возрастных группах от 25 лет и старше и в возрасте 20 — 24 года (7,1 и 5,4% соответственно). Антитела класса G к раннему антигену EA обнаруживали достоверно чаще ($p < 0,05$) в группе женщин 25 лет и старше (21,4%). Среди ВИЧ-инфицированных беременных в возрастных группах 15 — 19 лет и 20 — 24 года частота выявления данного маркера составила 10,0 и 10,8% соответственно. Антитела к ядерному антигену в высоких титрах выявлены в возрастных группах 20 — 24 года (10,8%), 25 лет и старше (7,1%), а также 15 — 19 лет (2,0%).

Анализ зависимости обнаружения маркеров ВЭБ от стадии ВИЧ-инфекции показал, что антитела класса М к ВЭБ выявлены у 4 женщин, находившихся в латентной стадии с генерализованной лимфоаденопатией (Ш стадия). Можно предположить, что увеличение лимфоузлов не было связано с прогрессированием ВИЧ-инфекции, а было клиническим проявлением острой недиагностированной ЭБВИ.

Маркеры реинфекции — IgG EA и IgG NA в высоких титрах в 3,5 раза чаще обнаруживали у ВИЧ-инфицированных беременных в острой фазе ВИЧ-инфекции (II A стадия), чем в латентной стадии течения заболевания, что свидетельствует о том, что различные неспецифические клинические проявления на ранних стадиях ВИЧ-инфекции, возможно, могли быть вызваны ВЭБ, но также не были своевременно диагностированы.

Таким образом, ЭБВИ у ВИЧ-инфицированных беременных протекала без клинических проявлений, острые формы достоверно чаще выявляли сре-

ди женщин в возрасте 15 — 19 лет, находящихся в латентной стадии течения ВИЧ-инфекции (III стадии) с заражением при внутривенном введении наркотиков.

При относительно невысокой частоте обнаружения маркеров ВЭБ инфицирования среди здоровых беременных установлено, что специфические антитела класса М к ВЭБ выявляли у двух женщин старше 25 лет, антитела класса G к раннему антигену EA — только у одной женщины в возрасте 24 года. Максимальная частота обнаружения антител к ядерному антигену NA в высоких титрах была выявлена у женщин старше 25 лет (11,1%).

Анализ частоты обнаружения маркеров ЭБВИ в зависимости от количества беременностей у здоровых женщин не выявил какой-либо закономерности. Антитела класса М определяли у женщин как с первой, так и с третьей беременностью (6,3 и 11,1% соответственно). Антитела класса EA выявлялись только у женщин с третьей беременностью (11,1%). Антитела класса G NA в высоких титрах обнаружены у 75% женщин с первой беременностью (31,3%) и у 88,9% женщин со второй беременностью (22,2%). Низкие титры IgG NA выявлены у 88,9% женщин с третьей беременностью (11,1%), а также у 45,5% женщин с четвертой и более беременностями (все в низком титре).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что у беременных ВИЧ-инфицированных женщин, в отличие от здоровых беременных, острая ЭБВИ наблюдается чаще в возрасте до 19 лет, а в более старших возрастных группах она присутствует преимущественно в виде реинфекции.

Для выявления риска внутриутробного инфицирования изучены результаты определения маркеров ВЭБ у новорожденных. Антитела класса М отсутствовали у детей, рожденных от здоровых матерей, и были выявлены всего у одного ребенка (2%), рожденного от первой беременности у матери, находящейся в латентной стадии ВИЧ-инфекции (III стадия) с генерализованной лимфаденопатией.

Частота выявления IgG EA в группах детей, рожденных от здоровых и ВИЧ-инфицированных матерей, составила 3,2 и 6,1% соответственно ($p > 0,05$); IgG NA в высоких титрах — в 9,7 и 16,3% соответственно. У трех детей (6,1%), рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей, одновременно выявляли специфические антитела классов G EA и G NA. Высокие проценты суммарной инфицированности ВЭБ новорожденных (77,4 и 69,9%), а также обнаружение маркеров острой инфекции свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований с целью получения строгих доказательств вертикальной передачи ЭБВИ.

Современная эпидемиологическая ситуация по ЭБВИ в Российской Федерации характеризуется неблагополучием, связанным с широкой циркуляцией возбудителя среди населения, сложностью диагностики, особенностями клинического течения и отсутствием средств специфической профилактики. Единственной клинической формой ЭБВИ, учитываемой системой федерального статистического наблюдения в настоящее время, является ИМ, уровень и динамика заболеваемости которым в большей степени отражают проявления манифестно протекающего эпидемического процесса и свидетельствует о качестве диагностики. Повсеместный рост заболеваемости ИМ на фоне неблагополучия по ВИЧ-инфекции свидетельствует о высокой интенсивности эпидемического процесса ЭБВИ, особенно выраженной на территории УФО. Изучение манифестно и скрыто протекающего эпидемического процесса ЭБВИ, проведенное на неблагополучной территории, подтвердило наличие широкой циркуляции ВЭБ среди женщин фертильного

возраста. Максимальная частота активно текущей и реинфекции выявлена среди ВИЧ-инфицированных беременных, что повышает риск внутриутробного инфицирования плода и новорожденных. ЭБВИ у беременных протекает без клинических проявлений, острые формы чаще выявляются среди ВИЧ-инфицированных женщин в возрасте 15 — 19 лет, находящихся в латентной стадии течения ВИЧ-инфекции (III стадия) с заражением при внутривенном введении наркотиков. В более старших возрастных группах ЭБВИ проявляется преимущественно в виде реинфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асратян А.А., Даниленко Е. Д., Казарян С. М. и др. Выявление маркеров парентеральных гепатитов (В и С) и герпесвирусной инфекции у беременных женщин. Журн. микробиол. 2009, 5: 23-25.
2. Боковой А.Г. Герпетические инфекции как ведущий фактор формирования вторичных иммунодефицитов в детском возрасте. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2007, 6: 34-39.
3. Бошнян Р.Г. Инфекция, вызванная вирусом Эпштейна-Барр: эпидемиологические проявления и лабораторная диагностика. Дисс. канд. мед. наук. М., 2009.
4. Калугина М. Ю. Эпидемиологические характеристики инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа. Дисс. канд. биол. наук. М., 2009.
5. Каражас Н.В., Малышев Н.А., Рыбалкина Т.Н. и др. Современные аспекты герпесвирусной инфекции. Эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика. М., Спецкнига, 2012.
6. Лысенко А.Я. Турьянов М.Х., Лавдовская М.В., Подольский В.М. ВИЧ-инфекция и СПИД-ассоциируемые заболевания. М., Российская академия естественных наук, 1996.
7. Михайленко А.А., Покровский В.И. Вторичная иммунная недостаточность. Тер. архив. 1998, 11: 5-9.
8. Поляков В.Е., Алексеевских Ю.Г., Даабуль С.А. Болезнь Ходжкина (лимфогранулематоз) у детей. М., Мирт, 1993.
9. Покровский В.В. Организационные основы проведения мероприятий по профилактике ВИЧ-инфекции среди общего населения и уязвимых контингентов. В: ВИЧ-инфекция и СПИД. М., 2013.
10. Уразова О.И., Помогаева А.П., Новицкий В.В. и др. Особенности течения у детей инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2001, 4: 57-58.
11. Шелев М.В. Эпидемиологическая и иммунологическая характеристика инфекционной перинатальной патологии в Омской области. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Омск, 2011.

Поступила 30.03.17

Контактная информация: Каражас Наталья Владимировна, д.м.н., проф.,
123098, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)193-43-89

*В.А.Ковалев¹, Н.Н.Филатов^{1,2}, М.Н.Локтионова^{1,3}, Т.Г.Фроловская⁴,
А.В.Линок⁵, Г.А.Жукова⁴, А.А.Голиусов²*

СОВРЕМЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ГОРОДЕ МОСКВА

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова; ²НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ³Центральный НИИ эпидемиологии; ⁴Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по г. Москве в ЮВАО г. Москвы, ⁵Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по г. Москве в ЦАО г. Москвы

Цель. Оценка и выявление современных особенностей распространения норовирусной инфекции в г. Москва, на окружном и городском уровне. *Материалы и методы.* Проводился ретроспективный анализ динамики показателей заболеваемости НВИ по данным форм государственной статистической отчетности за период 2009 — 2016 гг. *Результаты.* Заболеваемость НВИ за период 2009 — 2016 гг. характеризуется тенденцией к росту как на городском, так и на окружном уровне г. Москва. Заболевание регистрируется преимущественно среди детей (78% в Юго-Восточном округе (ЮВАО) Москвы, 80% в Москве и 81% в РФ) на фоне увеличения доли взрослых (до 42,7% в Москве и 13,9% в РФ) в 2016 году. На динамику заболеваемости в различных возрастных группах детского населения оказывала влияние вспышечная заболеваемость. В 2011 — 2016 гг. в Москве было зарегистрировано 33 очага НВИ (24,3% от всех вспышек ОКИ в Москве за данный период), из них 64,3% обусловлены контактно-бытовым путем и 35,7% пищевым. Вспышки чаще регистрировались в детских организованных коллективах (69,7%). *Заключение.* В Москве наблюдается тенденция к росту заболеваемости НВИ с увеличением доли взрослого населения. Основной вклад в групповую заболеваемость вносят дети 7 — 14 и 15 — 17 лет. Подъем заболеваемости по НВИ в Москве в 2016 году, возможно, связан с отсутствием эффективных мер профилактики. Ввиду отсутствия средств рутинной диагностики, сохраняется тенденция к проведению обследования на НВИ, фактически только в очагах. Основной причиной формирования очагов групповой заболеваемости НВИ по-прежнему является нарушение санитарно-противоэпидемического режима.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 32—37

Ключевые слова: норовирусная инфекция, вспышки, эпидемиология, кишечные инфекции

*V.A.Kovalev¹, N.N.Filatov^{1,2}, M.N.Loktionova^{1,3}, T.G.Frolovskaya⁴,
A.V.Linok⁵, G.A.Zhukova⁴, A.A.Goliusov²*

MODERN EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF NOROVIRUS INFECTION IN MOSCOW

¹Sechenov First Moscow State Medical University, ²Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ³Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; ⁴Territorial Department of Rospotrebnadzor in Moscow in SEAD of Moscow, ⁵Territorial Department of Rospotrebnadzor in Moscow in CAD of Moscow, Russia

Aim. Norovirus infection (NVI) epidemiological characteristics evaluation in Moscow at municipal and district levels. *Materials and methods.* A retrospective analysis of NVI incidence rate was conducted according to the 2009 — 2016 state statistical reporting forms data. *Results.* In 2009 — 2016 NVI incidence rate has a trend to increase in Moscow, either at municipal and district levels. NVI cases were registered among children mostly (78% in the SEAD of Moscow, 80% in Moscow and 81% in Russia), at the same time adults proportion of NVI incidence rate increased significantly (up to 42,7% in Moscow and 13,9% in the Russian Federation) by 2016. The morbidity dynamics in different child population age groups was effected by the outbreaks cases. Totally

in 2011 — 2016 33 outbreaks were registered in Moscow (24,3% from all acute diarrheal infection outbreaks in Moscow for the same period), where 64,3% with nonpercutaneous channel of infection and 35,7% alimentary. Outbreaks were more often recorded in children's organized collectivity (69,7%). *Conclusion.* Nowadays in Moscow there is an NVI incidence increase trend is evidenced, with an increase of the adult population proportion in morbidity structure. At this stage, main contribution to group morbidity was made by children 7 — 14 and 15 — 17 years old. One of the reasons for the NVI incidence rate growth in Moscow (2016) could possibly be the lack of effective prevention measures. Actually, specific NVI diagnostics provided only in outbreaks, due to the lack of routine diagnostic tools. The main reason for the NVI group morbidity effective disease area formation is still sanitary and anti-epidemic regime violation at sites and facilities.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 32—37

Key words: norovirus infection, outbreaks, epidemiology, diarrheal infections

ВВЕДЕНИЕ

Норовирусная инфекция (НВИ) — одна из наиболее частых повсеместно распространенных вирусных кишечных инфекций [3, 4, 5]. В развивающихся странах антитела к ней выявляют у 58 — 70% взрослых людей. В развитых странах с НВИ связывают около 30% всех эпидемий вирусных диарей [1, 3]. Введение ротавирусной вакцинации в 2006 г. в США привело к значительному снижению ротавирусной инфекции у детей и увеличению доли норовирусной инфекции. В большинстве стран мира НВИ регистрируется преимущественно среди детей старшего возраста, пожилых и лиц с иммунодефицитами [2]. Широкому распространению НВИ способствует высокая жизнеспособность вируса во внешней среде, устойчивость к дезинфектантам, малая заражающая доза, а также отсутствие средств специфической профилактики [3, 6]. Важным фактором, влияющим на выявление случаев НВИ, по-прежнему остается высокая стоимость вирусологических методов обследования, высокая антигенная вариабельность норовирусов, а также отсутствие клеточных систем культивирования, что не позволяет проводить тестирование рутинно и обусловливает проведение специфической диагностики только в очагах или на коммерческой основе [6, 7].

Целью исследования было выявление современных особенностей норовирусной инфекции в городе Москва и в Юго-Восточном административном округе (ЮВАО) Москвы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались официальные данные форм: № 2 государственной статистической отчетности «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях», № 23-09 государственной статистической отчетности «Сведения о вспышках инфекционных заболеваний» за период 2009 — 2016 гг.; официальные данные Федеральной службы государственной статистики Российской Федерации (Росстат) за период 2009 — 2016 гг. (численность всего населения РФ и Москвы, численность взрослого и детского населения).

Анализировалась динамика интенсивных показателей заболеваемости норовирусной инфекцией среди детей и взрослых в сравнении Москвы и ЮВАО Москвы за изучаемый период. Для статистической обработки баз данных использованы методы эпидемиологического наблюдения: ретроспективный анализ заболеваемости, описательной статистики, анализа динамических

рядов с расчетом средних за период. Анализ проводился на персональном компьютере с применением программы Microsoft Excel 2007.

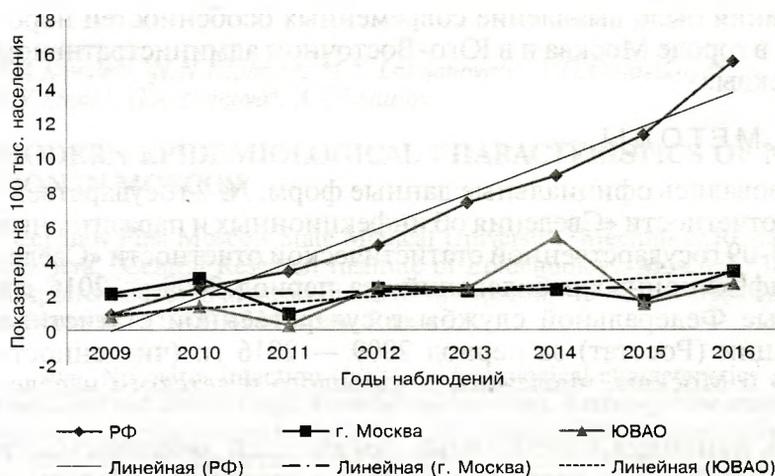
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период с 2009 по 2016 гг. в Москве зарегистрировано 2079 случаев заболевания НВИ, что составляет 2,6% от всей заболеваемости в целом по РФ — 79 233 случаев. За аналогичный период времени в ЮВАО Москвы зарегистрировано 223 случая заболевания НВИ, что составляет 10,7% от всей заболеваемости в целом по Москве.

Заболеваемость норовирусной инфекцией за период 2009 — 2016 гг. в России характеризуется выраженной тенденцией к росту, в то время как в Москве показатели характеризуются неравномерным распределением по годам и тенденцией к стабилизации с ростом заболеваемости в последние годы, а в ЮВАО — умеренной тенденцией к росту (рис.).

Одной из отличительных особенностей НВИ в Российской Федерации, в том числе в Москве и ЮВАО Москвы, является высокая доля новых случаев заболевания среди детей до 17 лет. Анализ возрастной структуры заболеваемости НВИ в ЮВАО Москвы, Москве и РФ за изучаемый период времени показал, что в среднем доля детей составляет 78% в ЮВАО Москвы, 80% в Москве и 81% в РФ. Данная ситуация значительно отличается от опыта других государств, в которых основная масса заболеваний регистрируется у взрослого населения [2]. Доля детей от общего количества заболевших на начало регистрации НВИ в 2009 г. составляла в РФ — 90%, в Москве — 99%, в ЮВАО Москвы — 100%. С 2012 г. в РФ и 2014 г. в Москве и ЮВАО Москвы произошел резкий подъем заболеваемости среди взрослых. К 2016 г. доля заболеваемости НВИ взрослых увеличилась до 42,7% в Москве и до 13,9% в России. Показатель заболеваемости увеличился в 32,7 раза среди взрослого населения в ЮВАО Москвы и Москве, в РФ в 19,8 раза (с 1,39 в 2009 г. до 27,57 на 100 тыс. населения в 2016 г.). Высокие показатели заболеваемости среди взрослых в последние годы связаны, в том числе, с групповой заболеваемостью во взрослых коллективах.

Наибольший вклад в возрастную структуру заболеваемости в РФ и Москве



вносят дети 1 — 2 года — 32,0% и 35,0%, в то время как в ЮВАО Москвы наибольший удельный вес составляют дети в возрасте 7 — 14 лет, доля которых составляет 34,0%. Рост заболеваемости в ЮВАО среди возрастной группы 7 — 14 лет объясняется регистрацией 4 вспышек НВИ в детских образовательных учреж-

Моголетняя динамика заболеваемости норовирусной инфекцией в РФ, Москве и ЮВАО Москвы за период 2009 — 2016 гг. (показатель на 100 тыс. населения).

дениях (школах) за годы наблюдения. Наибольшее количество случаев в Москве и в ЮВАО Москвы приходится на 3 возрастных группы: дети 1 — 2 лет, 3 — 6 лет, 7 — 14 лет. На долю детей до 1 года приходится в РФ и Москве по 13%, в ЮВАО Москвы — 11%. Наименьший удельный вес составляют подростки 15 — 17 лет. Однако в ЮВАО удельный вес в данной возрастной группе больше в 2 раза, чем в РФ, и в 4 раза, чем в Москве (8%, 4% и 2% соответственно).

Заболееваемость НВИ среди детского населения РФ имеет стабильную тенденцию к росту во всех возрастных группах. В отличие от РФ в Москве динамика заболеваемости НВИ среди различных возрастных групп детского населения отличается неравномерностью и ее уровень колеблется в разные годы в различных возрастных группах как в ЮВАО Москвы, так и в Москве.

За период 2009 — 2016 гг. отмечается снижение показателей заболеваемости в следующих возрастных группах: дети до 1 года в г. Москва в 4,1 раза (9,48 на 100 тыс.) и дети 1 — 2 лет в г. Москва в 2,1 раза (21,34 на 100 тыс. населения), среди которых на начало регистрации НВИ отмечались наибольшие показатели заболеваемости.

На динамику заболеваемости в различных возрастных группах детского населения оказывала влияние вспышечная заболеваемость в городе и округе. В годы регистрации только sporadicческой заболеваемости были высокие показатели среди неорганизованных детей до 1 года и 1 — 2 лет. В отличие от этого в годы регистрации групповой заболеваемости увеличивались показатели в возрастных группах 7 — 14 лет и 15 — 17 лет. Данная тенденция четко прослеживается на примере ЮВАО, что подтверждается самыми высокими показателями заболеваемости за все годы наблюдения в группе детей 7 — 14 лет (38,17 на 100 тыс.), 15 — 17 лет (39,75 на 100 тыс.) в 2014 г. С целью оценки данной ситуации был проведен анализ групповой заболеваемости за 6 лет.

В Москве за период 2011 — 2016 гг. зарегистрировано 33 очага НВИ в организованных коллективах, что составляет 24,3% от всех вспышек ОКИ в Москве за данный период. Наибольшее количество очагов ОКИ в Москве было зарегистрировано в 2013 г., НВИ в 2012 г. Возможно, данный рост, в том числе, связан с внедрением практики специфического обследования на НВИ в очагах [6].

В 2016 году в сравнении с 2015 годом число вспышечной заболеваемости острыми кишечными инфекциями не изменилось, но отмечено увеличение числа очагов НВИ по сравнению с прошлым годом. Всего в городе, как и в 2015 г., зарегистрировано 14 очагов групповой заболеваемости ОКИ, из них на долю НВИ приходится 42,9% в 2016 г. против 28,6% в 2015 г.

За период 2011 — 2016 гг. в Москве зарегистрировано 33 вспышки НВИ. В ЮВАО за аналогичный период времени было зарегистрировано 6 очагов групповых заболеваний острой гастроэнтеропатии, вызванной вирусом Норфолк 2 генотипа в организованных коллективах, что составляет 18,2% от количества всех вспышек НВИ, зарегистрированных в Москве (в 2011 — 2013 гг. вспышки в ЮВАО не регистрировались). При этом в 2014 — 2016 гг. на ЮВАО Москвы приходилось не только больше всего очагов НВИ (35,3%), но и самое большое количество пострадавших (99 человек из 229 — 43,2%). Среднее число случаев в очаге в ЮВАО также превышало аналогичный показатель по Москве (16,5 и 13,5 соответственно).

В эпидемический процесс в Москве были вовлечены дети 0 — 17 лет — 65,0% и взрослые — 35,0%.

По характеру вспышек в Москве 21 вспышка (64%) была связана с реали-

защитой контактно-бытового пути передачи инфекции, 12 вспышек (36%) обусловлены пищевым фактором. Проведенный эпидемиологический анализ позволил установить, что вспышки НВИ в городе чаще регистрировались в детских образовательных организациях (школах) — 14 вспышек (42,4%) и детских дошкольных организациях — 9 вспышек (27,3%), где группами риска являлись дети 3 — 6 лет, 7 — 14 лет и 15 — 17 лет. Реже вспышки регистрировались среди взрослых: в ЛПО города — 4 вспышки (12,1%) и прочих организованных коллективах — 6 очагов (18,2%).

По характеру вспышек в ЮВАО Москвы 3 вспышки (50,0%) связаны с реализацией контактно-бытового пути передачи инфекции, 3 вспышки (50,0%) обусловлены пищевым фактором.

Контактно-бытовой путь передачи в округе был зарегистрирован в 1 школе, в 1 ВУЗе и в 1 ЛПО (психиатрическая больница). Причинами распространения возбудителя при контактно-бытовом пути передачи послужили несоблюдение дезинфекционного режима, что подтверждается выявленными в ходе проверки нарушениями санитарного законодательства: неупорядоченное хранение уборочного инвентаря для уборки туалетов (33,3%), использование несертифицированного дезинфицирующего средства (33,3%), неправильный расчет расхода дезинфицирующего средства (16,7%), отсутствие мыла у раковин для мытья рук (16,7%), а также переуплотненность классов (16,7%).

Пищевой путь передачи в округе зарегистрирован в 3 школах. При пищевом пути передачи источником инфекции послужили в 1 случае 2 работника пищеблока, являющиеся носителями Норволк вируса, вероятным фактором передачи послужили салаты из сырых овощей, заправленные растительным маслом и приготовленные на пищеблоке школы, что является нарушением санитарного законодательства.

В двух других случаях источник инфекции не установлен, распространению инфекции способствовали следующие нарушения санитарного законодательства: не соблюдался температурный режим холодильного оборудования, бракеражные журналы велись не в соответствии с требованиями (не указывались сроки поступления сырья и пищевой продукции, изготовления блюда), не соблюдалась поточность технологического процесса в моечной, отсутствовали пробки у моечных ванн в помещении для мытья тары, что не обеспечивало соблюдение режима мытья кухонного инвентаря.

Проведенный эпидемиологический анализ позволил установить, что вспышки НВИ в округе чаще регистрировались в образовательных организациях (83,3%), реже в лечебно-профилактических организациях (16,7%).

Для всех вспышек характерна одномоментность заражения, преобладание средних и легких форм заболевания, кратковременность клинических проявлений, быстрое выздоровление. У всех заболевших наблюдалась сходная клиническая картина: слабость в 100% случаев, тошнота в 74% случаев, рвота (1 — 2 раза) в 93% случаев, неустойчивый жидкий стул (2 — 3 раз в сутки) в 20,0% случаев, повышение температуры (37,2 — 38,2°С) в 51,4% случаев, боли в животе в 100% случаев. Из общего количества заболевших — 99 чел. диагноз подтвержден лабораторно в 79,8%, в 20,2% случаев диагноз установлен клинически. Обращает на себя внимание тот факт, что при групповой заболеваемости в организованных коллективах выявляется много лиц со стертой симптоматикой или отсутствием клинических проявлений, которым в случае обнаружения возбудителя в фекалиях устанавливают диагноз носительства Норволк вируса (21,5%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев Б.Я., Васильева Р.И., Лобзин Ю.В. Острые кишечные заболевания: Ротавирусы и ротавирусная инфекция. СПб., Лань, 2000.
2. Дорошина Е.А. и др. Вирусные диареи в этиологической структуре ОКИ у детей, госпитализированных в стационар г. Москвы. Инфекционные болезни. 2009, 7 (3): 84-86.
3. Норовирусная инфекция: этиология, эпидемиология, диагностика. Аналитический обзор. Нижний Новгород, ННИИЭМ им. акад. И.Н.Блохиной, 2009.
4. Печеник А.С. Эволюция эпидемиологического процесса острых кишечных инфекций и пути оптимизации эпидемиологического надзора. Омск, 2012. <http://www.dissercat.com/content/evolyutsiya-epidemiologicheskogo-protsess-a-ostrykh-kishechnykh-infektsii-i-puti-optimizatsii-epid#ixzz4gnFOKA6J>.
5. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. WHO Press, 2015. Available online: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf?ua=1.
6. МУ 3.1.1.2969-11. Профилактика инфекционных болезней. Кишечные инфекции. Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика норовирусной инфекции, 2011.
7. МУК 4.2.2746-10. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Порядок применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью, 2010.

Поступила 13.06.17

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Н.А.Терентьева¹, Е.К.Псарева², Н.Ф.Тимченко², В.А.Голотин¹, В.А.Рассказов¹

ВЛИЯНИЕ ТОКСИНОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б.Елякова, ²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, Владивосток

Цель. Исследовать влияние термостабильного (ТСТ) и термолabileного (ТЛТ) летальных токсинов *Yersinia pseudotuberculosis* на формирование биопленки этими бактериями. *Материалы и методы.* Для выделения токсинов и проведения экспериментов использовали штамм *Y. pseudotuberculosis* 512 (pYV48МД, pVM82МД) и штамм 2517, несущий плазмиду вирулентности pYV и утративший ее. *Результаты.* В присутствии ТЛТ наблюдалась стимуляция образования биопленки при 20°C как штаммом 2517 (pYV+), несущим плазмиду вирулентности, так и бесплазмидным штаммом 2517 (pYV). При низкой положительной температуре (6 – 8°C) ТЛТ снижал количество сформированной биопленки. ТСТ ингибировал образование биопленки обоими исследуемыми штаммами *Y. pseudotuberculosis* при инкубации в течение 3 суток при 20°C и 6 – 8°C. Со снижением температуры степень ингибирования уменьшалась. *Заключение.* Оба белковых токсина *Y. pseudotuberculosis* влияют на формирование биопленки бактериями псевдотуберкулеза, однако воздействие ТЛТ и ТСТ на процессы образования биопленки различаются, и механизм такого действия токсинов предстоит выяснить.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 37–42

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, токсины, биопленка

EFFECT OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* TOXINS ON THE BIOFILM FORMATION

¹Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, ²Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

Aim. To study the effect of heat-labile (HLTY) and heat-stable (HSTY) lethal toxins of the of *Yersinia pseudotuberculosis* on the formation of biofilms by these bacteria. **Materials and methods.** For the isolation of toxins and the investigation their ability to effect on the biofilm formation there were used the strain of *Y. pseudotuberculosis* 512 (pYV48МД, pVM82МД) and strain 2517, carrying virulence plasmid pYV and lost it, correspondingly. **Results.** The stimulation of biofilm formation at 20°C by the strain 2517 (pYV+), carrying virulence plasmid as well as the strain 2517 (pYV-) without plasmid were observed In the presence of HLTY. At low positive temperature (6 – 8°C) HLTY reduces the amount of the formed biofilm. HSTY inhibited the biofilm formation by the both strains of *Y. pseudotuberculosis* tested during the incubation for 3 days at 20°C and 6 – 8°C. Moreover the extent of inhibition was decreased with temperature decreasing. **Conclusion.** The both of the *Y. pseudotuberculosis* protein toxins has been revealed to affect on the biofilm formation by *Y. pseudotuberculosis* bacteria, however, the impact of HLTY and HSTY in the processes of biofilm formation was shown to be different, and the mechanism of such action of toxins under way.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 37–42

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, toxins, biofilm

ВВЕДЕНИЕ

Биопленка представляет собой сообщество одного или нескольких видов бактерий, прикрепленных к поверхности или друг к другу и заключенных в матрикс, состоящий из экзополисахаридов, белков, внеклеточной ДНК и других веществ [3, 8, 9.]. Биопленка защищает бактерии от неблагоприятных абиотических факторов внешней среды, а также от факторов специфической и неспецифической защиты иммунной системы хозяина. Бактерии в биопленке могут «общаться» между собой посредством секреторных интермедиаторов, которые служат основой их «социального» поведения или «quorum sensing».

Многие хронические инфекции обусловлены бактериями, растущими в виде биопленок. Устойчивость бактерий к антибиотикам в биопленке в 1000 раз больше, чем у планктонных форм [3, 8]. Это вызывает необходимость исследования механизмов образования биопленок, а также поиск агентов, влияющих на этот процесс. Для разрушения бактериальной биопленки или ингибирования ее образования могут быть использованы различные низкомолекулярные вещества, ферменты, разрушающие матрикс, а также вещества, действующие на систему «quorum sensing».

Возбудитель псевдотуберкулеза человека — *Y. pseudotuberculosis* — широко распространен в окружающей среде. Он изолирован из органов и фекалий многих видов млекопитающих, птиц, земноводных, рыб, членистоногих, а также из почвы, воды и растительных субстратов. Эти бактерии способны образовывать биопленку, которая защищает их от неблагоприятных экологических условий и от поедания беспозвоночными хищниками [1, 4].

К настоящему времени известно, что *Y. pseudotuberculosis* в разных средах обитания (эндо- и эктотермные организмы, растения и другие объекты) про-

дуцируют факторы патогенности с инвазивной, антифагоцитарной и токсической функциями [6]. В частности, имеются сведения о нескольких токсинах этих микроорганизмов, их патогенетической роли [6, 7, 13] Однако нет данных о влиянии этих биомолекул на процесс формирования биопленки *Y. pseudotuberculosis*.

Целью работы было изучение действия двух белковых токсинов, вызывающих гибель эндотермных экспериментальных животных при парентеральном введении — термолабильного и термостабильного на образование биопленки *Y. pseudotuberculosis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы штаммы *Y. pseudotuberculosis* из коллекции НИИЭМ им. Г.П.Сомова: 512 (pVM82МД и pYV48МД) — 0Ib серовар, изолированный от больного ДСЛ в РФ, 2517 — 03 серовар (Институт Пастера, Франция), несущий плазмиду вирулентности pYV и утративший ее.

Бактерии для выделения термостабильного (ТСТ) и термолабильного (ТЛТ) летальных токсинов выращивали на питательном агаре при температуре соответственно 6 — 8°C и 36 — 37°C. Токсины выделяли по методам [6], применяя фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию. Биологическую активность этих токсинов определяли при парентеральном введении неинбредным мышам.

Для исследования действия токсинов на формирование биопленки *Y. pseudotuberculosis* ночную культуру бактерий, выращенных при температуре 20 — 22°C, разводили бульоном Хоттингера до 10^4 — 10^5 клеток в мл и инкубировали в 96-луночном планшете по 200 мкл на лунку в присутствии токсинов в течение 3 суток при 20 — 22°C или при 6 — 8°C. Конечная концентрация токсинов в разных экспериментах составляла 10 — 50 мкг/мл. После инкубации из лунок удаляли неприкрепленные клетки, трижды промывали лунки 0,85% NaCl и окрашивали биопленки 0,5% кристаллическим фиолетовым (CV) в течение 20 мин при комнатной температуре. Краситель удаляли из лунок, и несвязавшийся CV отмывали водопроводной водой. Планшеты высушивали на воздухе, в каждую лунку добавляли по 200 мкл 2% уксусной кислоты в 95% этаноле и определяли оптическую плотность при 600 нм.

Все эксперименты проводили в 4-кратной повторности. При статистической обработке использовали программу MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерии *Y. pseudotuberculosis* продуцируют нескольких токсинов, в том числе термолабильный летальный токсин и термостабильный летальный токсин [6, 7]. Эти токсины отличаются друг от друга по молекулярной массе, отношению к температуре, биологическим свойствам. Их мишени и механизм действия остаются малоизученными.

Ранее нами было показано [5], что летальные токсины *Y. pseudotuberculosis* проявляли эмбриотоксичность по отношению к развивающимся эмбрионам морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Кроме того, ТЛТ ингибировал биосинтез ДНК и РНК, определяемый по включению экзогенных [^3H]тимидина и [^3H]уридина клетками эмбрионов уже при 1 — 2 мкг/мл, а ТСТ не оказывал влияния на биосинтез нуклеиновых кислот даже в высоких концентрациях, но ингибировал биосинтез белка в эмбрионах морского ежа. ТЛТ не снижал уровня включения меченых аминокислот клетками эмбрионов (табл.).

Было показано, что ТЛТ ингибировал активность нуклеозидкиназ, тогда как ТСТ не влиял на активность этих ферментов биосинтеза предшественников нуклеиновых кислот. Однако роль этих летальных токсинов бактерий псевдотуберкулеза в патогенезе болезни не ясна.

Нами была показана способность четырех штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных из разных сред обитания, формировать биопленку на абиогенной поверхности [4]. Установлено также, что в процессе культивирования и формирования биопленки бактерии не утрачивали плазмиду вирулентности.

С помощью электронной микроскопии образцов *Y. pseudotuberculosis*, обработанных антителами к ТЛТ и конъюгатами коллоидного золота, показана возможность продукции этого токсина бактериями вне теплокровного организма (морская среда). Термолабильный летальный токсин вызывал значительные повреждения в организме морских животных [6]. Кроме того, получены данные о присутствии этого токсина во внеклеточном матриксе биопленки *Y. pseudotuberculosis* (рис. 1).

Для исследования воздействия токсинов на образование биопленки *Y. pseudotuberculosis* штаммы 2517 pYV- и 2517 pYV+ выращивали в присутствии токсина при 20°C и 6 — 8°C в течении 3 суток и измеряли количество образовавшейся биопленки. Данные приведены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, ТЛТ неодинаково действует на процесс образования биопленки *Y. pseudotuberculosis* при разной температуре. В присутствии этого токсина наблюдалась стимуляция образования биопленки при 20°C как штаммом 2517 (pYV+), несущим плазмиду вирулентности, так и бесплазмидным штаммом 2517 (pYV-). При низкой положительной температуре (6 — 8°C) количество биопленки снижалось в присутствии ТЛТ.

ТСТ ингибировал образование биопленки обоими исследуемыми штаммами *Y. pseudotuberculosis* при инкубации в течение 3 суток при 20°C и 6 — 8°C. Причем со снижением температуры степень ингибирования уменьшалась. Механизм такого действия токсинов предстоит выяснить.

Рекомбинантный цитотоксический некротизирующий фактор *Y. pseudotuberculosis* [2] в концентрации 30 мкг/мл стимулировал образование биопленки теми же штаммами в два раза.

В литературе есть данные об уча-

Биологическая активность токсинов *Y. pseudotuberculosis*

Показатели активности токсинов	ТЛТ	ТСТ
Спермиотоксичность	ЛД ₅₀ 1 мкг/мл	ЛД ₅₀ 2 мкг/мл
Биосинтез ДНК	Ингибирует (1—2 мкг/мл)	Не ингибирует (200 мкг/мл)
Биосинтез РНК	Ингибирует (1—2 мкг/мл)	Не ингибирует (200 мкг/мл)
Биосинтез белка	Не ингибирует (10 мкг/мл)	Ингибирует (10 мкг/мл)
Активность тимидинкиназы	Ингибирует	Не ингибирует
Активность уридинкиназы	Ингибирует	Не ингибирует

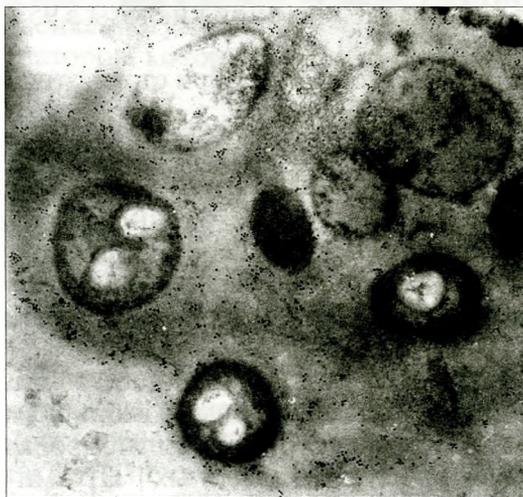


Рис. 1. Формирующаяся при 6 — 8°C в морской воде биопленка *Y. pseudotuberculosis* через 6 суток после инфицирования.

Видны гранулы термолабильного токсина.

стии в образовании биопленок пневмококков *in vitro* токсина — пневмолизина. Мутантные штаммы *Streptococcus pneumoniae* без пневмолизина не способны формировать такое же количество биопленки на абиогенных субстратах и клетках человека. Роль пневмолизина в образовании биопленки не связана с его гемолитической активностью, ответственной за повреждение ткани при пневмококковых заболеваниях. Предполагают, что пневмолизин может играть роль адгезина, скрепляющего клетки пневмококка друг с другом на ранних этапах формирования биопленки. Конфокальная и электронная микроскопия показали локализацию токсина на поверхности клеток пневмококков и во внеклеточном матриксе, что указывает на роль этого белка в фазе агрегации образования биопленки [14].

В состав внеклеточного матрикса входят различные белки, которые могут участвовать в прикреплении клеток друг к другу и к поверхности. Так, бета-токсин — фактор вирулентности *Staphylococcus aureus*, обладающий сфингомиелиназной активностью, играет роль в созревании биопленки [11]. В присутствии ДНК он образует ковалентные поперечные связи, формируя нерастворимый нуклеопротеидный матрикс, который способствует образованию биопленки *in vitro* и *in vivo* [10, 12].

Термолabileльный летальный токсин также обнаружен во внеклеточном матриксе биопленки *Y. pseudotuberculosis*, он стимулировал ее формирование при 20°C. Механизм этого действия белкового токсина возбудителя псевдотуберкулеза предстоит выяснить.

Одним из последних успехов молекулярной биологии стало открытие систем токсин-антитоксин, которые контролируют выживаемость бактерий и их вирулентность. Показано участие подобных систем в образовании биопленок [15].

Эти достижения открывают возможности для разработки новых способов лечения, поскольку высокая антибиотикорезистентность становится все более распространенной и критическая роль биопленок в вирулентности бактерий становится все очевидной. Терапевтическое воздействие на биопленки может быть направлено на различные этапы их формирования, такие как блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией, а также оно может сочетаться с собственно бактерицидными агентами. Такой подход будет более эффективным и требует углубления знаний о структуре и функциях биопленок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Изучение способности к образованию биопленок у штаммов *Y. pestis* основного и неосновного подвидов. Журн. микробиол. 2009, 5: 13-19.
2. Псарева Е.К., Собянин К.А., Ермолаева С.А., Тимченко Н.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика цитотоксического некротизирующего фактора *Yersinia pseudotuberculosis*. Российский иммунологический журнал. 2015, 9 (2): 602-603.
3. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма

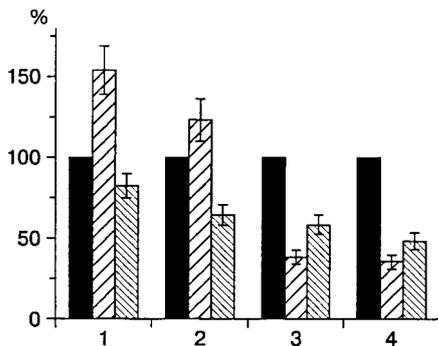


Рис. 2. Влияние токсинов на образование биопленки *Y. pseudotuberculosis*.

1 — влияние ТЛТ на штамм 2517+, 2 — влияние ТЛТ на штамм 2517-, 3 — влияние ТСТ на штамм 2517+, 4 — влияние ТСТ на штамм 2517-. В каждой группе столбиков слева направо: контроль, 20°C, 6 — 8°C.

- существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журн. микробиол. 2011, 33: 99-109.
4. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Балабанова Л.А., Рассказов В.А. Характеристика образования, ингибирования и разрушения биопленок *Yersinia pseudotuberculosis*, формирующихся на абиотических поверхностях. Журн. микробиол. 2015, 3: 72-78.
 5. Терентьева, Н.А. Тимченко Н.Ф., Голотин В.А., Рассказов В.А. Биологическая активность токсинов *Yersinia pseudotuberculosis*. Журн. микробиол. 2016, 6: 10-19.
 6. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток, 2004.
 7. Cornelis G.R. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. J. Cell. Biology. 2002, 158 (3): 401-408
 8. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999, 284: 1318-1322.
 9. Flemming H.C. EPS — then and now. Microorganisms. 2016, (4): 4. pii: E41 PMID: 27869702.
 10. Herrera A., Vu B.G., Stach C.S. et al. Staphylococcus aureus β -toxin mutants are defective in biofilm ligase and sphingomyelinase activity, and causation of infective endocarditis and sepsis. Biochemistry. 2016, 55 (17): 2510-2517. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00083.
 11. Huseby M.J., Kruse A. C., Digre J. et al. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010, 107: 14407-14412.
 12. Lister J.L., Horswill A.R. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014, 4: 178.
 13. Schweer J., Kulkarni D., Kochut A. et al. The cytotoxic necrotizing factor of *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY) enhances inflammation and Yop delivery during infection by activation of Rho GTPases. PLoS Pathog. 2013, 9 (11): e1003746. doi: 10.1371/journal.ppat.1003746.
 14. Shak J.R., Ludewick H.P., Howery K.E. et al. Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. MBio. 2013, 4 (5): e00655-13. doi: 10.1128/mBio.00655-13.
 15. Wen Y., Behiels E., Devreese B. Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. Pathog. Dis. 2014, 70 (3): 240-249. doi: 10.1111/2049-632X.12145.

Поступила 10.06.17

Контактная информация: Терентьева Наталья Александровна, к.б.н., 690022, Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159, р.т. (423)231-07-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Р.Б.Городничев, Д.В.Ракитина, А.И.Манолов, Ю.П.Байкова,
П.Л.Щербаков, Г.Б.Смирнов, Е.Н.Ильина*

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, Москва

Цель. Оценить пул *E.coli* внутри пораженной зоны кишечника пациентов с болезнью Крона. *Материалы и методы.* Клинические изоляты (28), а также контрольные образцы были протестированы относительно их возможной принадлежности к определенной филогенетической группе, способности к адгезии и инвазии на модели монослоя эпителиальных клеток CaCo2, способности к формированию биопленки и подвижности. *Результаты.* Было показано, что *E.coli*, высеченные из различного биоматериала, отличались по филогенетической принадлежности и способности образовывать биопленку. *E.coli*, относящиеся к типу адгезивно-инвазивных, обнаруживались преимущественно в материале биопсии слизистой кишечника пациентов с болезнью Крона. *Заключение.* Есть основания полагать, что тип адгезивно-инвазивных *E.coli* сложился на стыке экологических ниш просвета и стенки кишечника.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 42—49

Ключевые слова: болезнь Крона, адгезивно-инвазивные *E.coli*, гетерологические модели, биопленки, филогенетическое разнообразие *E.coli*

R.B.Gorodnichev, D.V.Rakitina, A.I.Manolov, Yu.P.Baykova, P.L.Scherbakov, G.B.Smirnov, E.N.Ilina

FEATURES OF *ESCHERICHIA COLI* CLINICAL STRAINS, ISOLATED FROM THE PATIENTS WITH CROHN'S DISEASE

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

Aim. To characterize pool of Crohn's disease-associated *E.coli* isolated from patients with Crohn's disease. *Materials and methods.* 28 clinical stains were selected. Clinical isolates, as well as control samples, were tested for their possible belonging to a certain phylogenetic group, the ability to adhere and invade on the model of a monolayer of CaCo2 epithelial cells, the ability to form biofilms and their mobility. *Results.* We have shown that *E.coli*, isolated from a different bio-material, belonged to different phylogenetic groups and differed in their ability to form biofilms. Adhesive-invasive *E.coli* were found mainly in the material of biopsy of the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Conclusion.* There are reasons to suppose that adhesive-invasive *E.coli* formed at the junction of ecological niches of the lumen and the intestinal wall.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 42—49

Key words: Crohn's disease, adhesive-invasive *E.coli*, heterological models, biofilms, phylogenetic diversity of *E.coli*

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) и, в том числе, болезнь Крона — это хронические рецидивирующие заболевания, от которых страдают по всему миру до 500 человек на 100 000 населения, особенно в развитых странах [1], [Agus A. et al., 2014]. Существует несколько точек зрения относительно механизмов патогенеза болезни Крона, но в самом общем виде болезнь Крона — это сложное многофакторное воспалительное заболевание кишечника, сопровождающееся чрезмерным иммунным ответом на фоне нарушения микрофлоры кишечника, генетической предрасположенности и неблагоприятных условий среды.

Одним из существенных особенностей патогенеза болезни Крона является нарушение баланса и состава кишечной микрофлоры — снижение доли Firmicutes и увеличение доли Proteobacteria и Bacteroidetes [Agus A. et al., 2014; Oberk A. et al., 2015], особенно за счет увеличения доли кишечной палочки в общем пуле микроорганизмов [3, 7]. Существенную роль нарушения микробного баланса микрофлоры кишечника подтверждают данные об успешном лечении пациентов с болезнью Крона методом трансплантации кала здоровых доноров и применением пробиотических штаммов *E.coli* [1, 4]

Особый интерес представляет тот факт, что из клинических образцов пациентов в острой фазе болезни Крона часто выделяют изоляты *E.coli*, которые не относятся к уже известным шести патоварам. Эти изоляты были выделены в отдельный патовар адгезивно-инвазивных *E.coli* (АИКП), благодаря их высокой способности к адгезии и инвазии *in vitro* в моделях с применением клеток CaCo2 и I-407, а также способности выживать и размножаться внутри J774-A1 макрофагов, не вызывая их гибели [7]. Молекулярные основы патогенности подобных изолятов до сих пор не установлены, т.к. эти изоляты обладают набором признаков, характерных для разных патоваров и не всегда обладают

известными факторами адгезии и инвазии [3], [Oberk A. et al., 2015]. Существуют данные о повышенной способности данного патогена образовывать биопленки [7]. Штаммы АИКП клонально разнообразны, но принадлежат, в основном, к филогенетической группе В2 [O'Brien C.L. et al., 2016].

Тот факт, что штаммы АИКП выделяют в 36 — 52% случаев у больных и лишь в 6 — 17% случаев у здоровых пациентов [7], с одной стороны, говорит о том, что этот тип *E.coli* ассоциирован с болезнью Крона, а с другой, что и в больном, и в здоровом кишечнике человека присутствует неоднородный пул штаммов *E. coli*.

Целью нашего исследования было оценить пул *E. coli* внутри пораженной зоны кишечника пациентов с болезнью Крона. Для более полного изучения пула *E.coli* у пациентов с диагностированной болезнью Крона был взят биоматериал двух типов: биопсия слизистой кишечника из мест, охваченных воспалительным процессом, и материал просвета кишечника над местами поражения. Для поиска различий в составе пула кишечной палочки все клинические изоляты и контрольные образцы были протестированы относительно принадлежности к определенной филогенетической группе, способности к адгезии и инвазии, способности к формированию биопленки и подвижности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные в работе изоляты *E.coli* были отобраны от 3 пациентов с подтвержденной болезнью Крона.

Критериями включения пациентов в исследование являлись: возраст от 18 до 65 лет, подтвержденная эндоскопически и гистологически болезнь Крона с поражением подвздошной кишки, исключение у них недифференцированного колита, отсутствие каких-либо инфекционных заболеваний, отсутствие в анамнезе оперативных вмешательств на кишечнике, отказ от приема антибиотиков за последние 6 мес.

Все пациенты были проинформированы об участии в исследовании и дали свое согласие.

В исследование были включены две женщины 29 и 40 лет с терминальным илеитом и мужчина 23 лет с илеоколитом, которые проходили амбулаторное лечение в Центральном научно-исследовательском институте гастроэнтерологии и Государственном научном центре колопроктологии в Москве с 2012 по 2014 гг.

Подготовку кишечника пациентов к колоноскопии проводили по стандартной методике. После соблюдения больными в течение 3 дней бесшлаковой диеты, они принимали раствор полиэтиленгликоля 4000. Стандартный объем полиэтиленгликоля рассчитывается как 1 литр раствора на 20 кг веса. Однако учитывая анамнез больных, наличие у них многократного (более 6 раз в день) стула, ограничились половинной дозой полиэтиленгликоля, который больные принимали накануне исследования. Данная схема подготовки позволила качественно провести колоноилеоскопию. Небольшое количество прозрачной жидкости, которое находилось у больных в просвете толстой кишки легко аспирировалось. В то же время, половинный объем принятого полиэтиленгликоля позволил сохранить кишечное содержимое в просвете подвздошной кишки.

Отбор биоматериала пациентов проводили во время проведения илеоскопии. В процессе эндоскопии из просвета подвздошной кишки аспирировали содержимое в стерильные контейнеры в объеме 20 — 40 мл. Биопсию слизи-

стой оболочки проводили после аспирации содержимого. Биоптаты брали из измененной периульцерозной слизистой оболочки. У каждого больного брали по 4 биоптата: 2 фрагмента СО помещались в стерильную сухую пробирку для проведения в дальнейшем исследования микрофлоры, 2 помещали в 10% раствор формалина для проведения гистологического исследования.

Жидкость, отобранную из просвета кишечника, разводили примерно $\times 10^6$ раз стерильным PBS (фосфатный буфер), образцы биопсии слизистой кишечника размещали в 0,2 мл стерильного PBS. Полученный инокулят в объеме 0,1 мл наносили на чашки с LB агаром (Amresco, USA). После инкубации в течение ночи при 37°C образовавшиеся колонии были идентифицированы с помощью Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Biotyper software (Bruker Daltonics, Germany) с использованием Microflex LT (Bruker Daltonics, Germany).

В исследование были включены 28 клинических изолятов *E.coli*, высеянных из материала трех пациентов с диагностированной болезнью Крона. Контрольную группу составили 5 образцов *E.coli*, 2 из которых были лабораторными штаммами (MG1655 и Nissle1917), а 3 были высеяны из кала здоровых пациентов.

Способность штаммов *E.coli* к адгезии и инвазии на модели клеточной линии CaCo2 оценивали аналогично стандартным методикам с небольшими модификациями [2, 6, 8]. Клеточную линию дифференцированных эпителиальных клеток кишечника CaCo2 выращивали в 24-луночном планшете в среде DMEM (DMEM, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) с добавлением 20% бычьей эмбриональной сыворотки до развития монослоя клеток (5×10^5 кл/лунку). Монослой заражали нормированной ($D_{620}=0,5$) суспензией *E.coli* и инкубировали 2 часа в термостате при температуре 37°C. После инкубации монослой промывали, лизировали 1% раствором NP40 (Sigma), а количество адгезированных клеток определяли методом посева на чашки с LB агаром. Параллельно над монослоем, инкубированным с суспензией *E.coli*, меняли культуральную среду на среду, содержащую 1мг/мл меропенема (BIOPHARM, Pvt. Ltd, Индия) для того, чтобы убить все внеклеточные бактерии. После часовой инкубации в присутствии антибиотика монослой промывали, лизировали 1% раствором NP40 (Sigma), и количество инвазированных клеток определяли методом посева на чашки с LB агаром.

Способность к инвазии определяли как отношение количества инвазированных клеток к исходному количеству *E.coli*, инокулированных в начале опыта, выраженное в процентах. Способность к адгезии определяли как разницу между количеством клеток на монослое после 2 часов инкубации и количеством инвазированных клеток, поделенную на количество клеток CaCo2 в монослое, и выражали в КОЕ *E.coli* на клетку CaCo2. Каждое измерение проводили троекратно.

Способность образовывать биопленку оценивали по методике определения формирования биопленки на абиогенных поверхностях [Coffey B. et al., 2014]. В эксперименте использовали ночные культуры кишечной палочки (18 часов инкубации в бульоне LB в термостате при температуре 37°C), приведенные к оптической плотности $D_{570}=0,5$. В лунку 96-луночного планшета добавляли 190 мкл бульона LB и инокулировали его 10 мкл подготовленной суспензии кишечной палочки, по 5 статистических повторов для каждого образца. Планшеты с инокулированной средой инкубировали в термостате при температуре 37°C в трех параллелях — 5, 9 и 24 часа. После инкубации среду убирала, лунки трижды промывали дистиллированной водой. Для окрашива-

ния биопленок в каждую лунку добавляли 180 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1% спиртового раствора кристаллического фиолетового и окрашивали в течение 45 минут. По истечении времени краситель сливали, лунки промывали дистиллированной водой 3 раза и добавляли 200 мкл 95% этанола на 45 минут для экстракции красителя. После экстракции количество красителя определяли на планшетном фотометре (Thermo Fisher Scientific Multiscan Ascent) при длине волны 570 нм. В качестве контроля использовали среду без бактерий.

Ночные культуры *E.coli*, выращенные на LB агаре, вкалывали стерильной зубочисткой в среду, содержащую 1% триптона и 0,25% NaCl и 0,3% агара [9]. Подвижность оценивали по диаметру ореола в мм на 5, 7, 9 и 12 час инкубации.

Определение филогенетической принадлежности изолятов *E.coli* проводили стандартным методом с применением ПЦП [5]. Праймеры на исследуемые гены: *ChuA.1* (5' TGGGCGAACTGAAAATCTGG 3') и *ChuA.2* (5' CGGCAAATAGAGTGG AACGG 3'), *YjaA.1* (5' AGACGCTGCCTTCAGTAACC 3') и *YjaA.2* (5' AACCTGTGACAAACCGCCC 3') и *TspE4C2.1* (5' ATTCAGaGGTGACACTATTCG 3') и *TspE4C2.2* (5' TTGCGGGTGAGACAGAAACG 3') были подобраны так, чтобы в процессе амплификации получались фрагменты длиной в 440, 181 и 131 пар нуклеотидов соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все проанализированные нами изоляты *E.coli* показали филогенетическое разнообразие и являлись представителями филогенетических групп А, В2 и D. Изоляты *E.coli*, высеянные из кала здоровых доноров, также принадлежали к филогенетическим группам А, В2 и D, что является свидетельством наличия в организме здорового человека неоднородного пула *E.coli* различного филогенетического состава.

При рассмотрении филогенетической принадлежности изолятов *E.coli*, высеянных из биоматериала пациентов с болезнью Крона, прослеживается зависимость филогенетической принадлежности *E.coli* от типа биоматериала. Так, 12 из 17 (76%) изолятов *E.coli*, высеянных из материала биопсий слизистой кишечника, взятых из воспаленной ткани вблизи язвы, принадлежали к филогенетической группе А, а 8 из 12 (67%) изолятов *E.coli*, высеянных из материала просвета кишечника, принадлежали к филогенетической группе В2. Изоляты *E.coli* коменсальной флоры кишечника, как правило, принадлежат к филогенетической группе А, а патогенные внекишечные штаммы чаще всего относятся к филогруппам В2 и D [5]. Это представляется значимым наблюдением в связи с тем, что в месте воспаления мы обнаруживаем доминирование изолятов *E.coli*, принадлежащих к филогенетической группе А, т.е. представителей коменсальной флоры, а изоляты *E.coli*, принадлежащие к филогенетической группе В2, наоборот, чаще доминируют в просвете кишечника.

Учитывая принцип Гаузе, подобное распределение филогенетической принадлежности со значительным превалированием одной филогенетической группы в одном типе биоматериала может являться косвенным свидетельством наличия двух экологических ниш в месте воспаленной ткани эпителия кишечника и в просвете кишечника.

Одним из основных признаков вирулентности бактерий считается способность к адгезии и инвазии при взаимодействии с эукариотическим клетками. Способность проникать и развиваться внутри человеческих клеток — одно из

свойств, способствующих возникновению воспалительного процесса, который, в свою очередь, является неотъемлемой частью патогенеза болезни Крона.

Способность к адгезии и инвазии *E.coli* была протестирована в модельных опытах *in vitro* с использованием монослоя эпителиальных клеток CaCo2. Мы ожидали увидеть разницу в способности к адгезии и инвазии между изолятами *E.coli*, высеянными из материала биопсии слизистой кишечника, и *E.coli*, высеянными из материала просвета кишечника, но изоляты *E.coli*, полученные из различного типа биоматериала, достоверно не отличались по способности к адгезии и проникновению в монослой эпителиальных клеток CaCo2.

Способность к адгезии изолятов *E.coli* с использованием монослоя эпителиальных клеток CaCo2 колебалась от 0,7 до 10 кл. *E.coli* на клетку CaCo2, способность к инвазии — от 0 до 0,25%. По способности к адгезии клинические изоляты в среднем слабо отличались от контрольной группы. Способность к инвазии клинических изолятов, напротив, в среднем, была несколько выше контрольных значений.

Способность образовывать биопленку является важной характеристикой клинических изолятов. Количество образованной биопленки, как правило, зависело от времени инкубации и было максимальным на 5 и 9 час инкубации, а к 24 часу клетки преимущественно переходили в планктонную форму. Количество образованной биопленки, измеряемое величиной светопоглощения, варьировало в пределах от 0 до 1 и в среднем равнялось 0,35 на 5 и 9 час инкубации, а на 24 час инкубации среднее значение биопленкообразования составляло всего 0,1.

Количество образованной биопленки на 5 и 9 час инкубации было в среднем достоверно выше в образцах *E.coli*, высеянных из материала биопсии слизистой кишечника, взятого из воспаленной ткани вблизи язвы, и образцах контрольной группы, чем в образцах *E.coli*, высеянных из материала просвета кишечника.

Подвижность — важный физиологический показатель, позволяющий оценить способность клеток активно перемещаться в сторону более благоприятных условий. Наличие у *E. coli* длинных полярных фибрилл и пилей является основным механизмом клеточного движения, а также может являться одним из факторов адгезии. Хотя логично было предположить более высокий показатель подвижности изолятов *E.coli*, высеянных из материала просвета кишечника, динамика подвижности всех изолятов *E.coli* имела вид линейной зависимости и зависела скорее от характеристик каждого конкретного образца, чем от типа биоматериала, из которого *E.coli* были высеяны.

Одним из возможных путей патогенеза при болезни Крона является наличие особого типа кишечной палочки — адгезивно-инвазивной кишечной палочки. Эту группу, не имеющую молекулярно-биологических маркеров, выделяют по нескольким физиологическим характеристикам, в т.ч. способности к адгезии на клетках монослоя эпителиалия CaCo2, превышающей 1 кл *E.coli* на клетку CaCo2, и способности к инвазии, превышающей 0,1% [7].

Среди исследованных изолятов *E.coli* критериям АИКП удовлетворяли 9 клинических изолятов, выделенных от пациентов с болезнью Крона. Изоляты *E.coli*, соответствующие критериям АИКП, были обнаружены у всех трех пациентов с болезнью Крона и не обнаружены среди контрольных образцов. Среди них преобладали изоляты, выделенные из материала биопсии слизистой кишечника (три от пациента P1, два от пациента P2 и три от пациента P3).

Один клинический изолят *E.coli*, удовлетворяющий критериям АИКП, был обнаружен в материале просвета кишечника пациента P1.

Сравнивая группу АИКП с общим пулом изолятов, можно наблюдать сближение средних значений способности к адгезии и инвазии оставшихся изолятов *E.coli*, выделенных из различного биоматериала пациентов с болезнью Крона, а также уменьшение разброса внутри отдельных групп.

Филогенетическая характеристика этих изолятов *E.coli* показала, что 4 из 9 (1 изолят *E.coli*, высеянный из материала просвета кишечника, и 3 изолята *E.coli* из материала биопсии слизистой кишечника) принадлежали к филогенетической группе B2, а 5 изолятов *E.coli*, высеянных из материала биопсии слизистой кишечника, принадлежали к филогенетической группе A. Таким образом, из 4 изолятов *E.coli*, высеянных из материала биопсии слизистой кишечника и принадлежащих к филогенетической группе B2, 3 отвечали критериям АИКП, а их доля среди всех изолятов *E.coli*, высеянных из материала биопсий слизистой кишечника и отвечающих критериям АИКП, составляла 44%. Доля изолятов *E.coli*, принадлежащих к филогенетической группе B2, в общем пуле изолятов *E.coli*, высеянных из материала биопсии слизистой кишечника, была ниже и составляла всего 29%. Это подтверждает наблюдения, что изоляты адгезивно-инвазивных *E.coli* чаще являются представителями филогенетической группы B2 [O'Brien C.L. et al., 2016].

Изоляты адгезивно-инвазивных *E.coli* не отличались от остальных изолятов подвижностью.

При сравнении изолятов *E.coli*, отвечающих критериям АИКП, с общим пулом изолятов *E.coli* можно наблюдать промежуточное положение группы АИКП между изолятами *E.coli*, высеянными из материала биопсии слизистой кишечника и просвета кишечника, по способности к формированию биопленки.

Ранее было показано, что способность к формированию биопленки достоверно разделяет изоляты *E.coli* по типу биологического материала, из которого они были получены. Промежуточное положение и большой разброс способности к образованию биопленки в группе АИКП может свидетельствовать о том, что *E.coli*, отвечающие критериям АИКП, существуют на стыке экологических ниш и экологическое преимущество от способности образовывать биопленку не постоянно во времени.

Косвенным свидетельством правомерности выделения группы адгезивно-инвазивных *E.coli* является наличие достоверных корреляционных связей между исследуемыми параметрами внутри этой группы и отсутствием подобных связей во всем пуле изолятов или в группах, выделяемых по типу исходного биоматериала. Так, внутри группы адгезивно-инвазивных *E.coli* между собой (с достоверностью $p=0,05$ и коэффициентом корреляции по Спирману выше 0,7) были связаны количество образуемой биопленки, подвижность и принадлежность к филогенетической группе. Высокая подвижность, как правило, коррелировала с высоким количеством образованной биопленки и филогенетической группой A. Связь между подвижностью и способностью образовывать биопленку ранее уже описывалась в литературе[9].

Принимая во внимание тот факт, что в группе адгезивно-инвазивных *E.coli* при доминировании изолятов, высеянных из материала биопсии слизистой кишечника, выше представленность *E.coli* филогенетической группы B2, а по количеству образуемой биопленки адгезивно-инвазивные *E.coli* занимают промежуточное положение между изолятами *E.coli*, высеянными из материала биопсии слизистой кишечника и просвета кишечника, а также принцип

Гаузе, ограничивающий возможность разным видам занимать одну экологическую нишу — есть основание предполагать, что формирование группы адгезивно-инвазивных *E.coli* происходило на стыке двух экологических ниш поверхности эпителия и просвета кишечника.

Авторы благодарят за помощь в подготовке и выполнении исследования Лазорева В.Н., Шитикова Е.С. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №16-15-00258.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmed I., Roy B. C., Khan S. A. et al. Microbiome, metabolome and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*. 2016, 4 (2): 20.
2. Baumgart M., Dogan B., Rishniw M. et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J*. 2007, 1 (5): 403-418.
3. Carrière J., Darfeuille-Michaud A., Nguyen H. T. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World J. Gastroenterol*. 2014, 20 (34): 12102-12117.
4. Comito D., Cascio A., Romano C. Microbiota biodiversity in inflammatory bowel disease. *Italian J. Pediatrics*. 2014, 40 (1): 1.
5. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied Environmental Microbiology*. 2000, 66 (10): 4555-4558.
6. Liang X., Ji Y. Comparative analysis of staphylococcal adhesion and internalization by epithelial cells. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols*. 2007, p. 145-151.
7. Martinez-Medina M., Garcia-Gil L.J. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J, Gastrointest. Pathophysiol*. 2014, 5 (3): 213-227.
8. Martinez-Medina M., Aldeguer X., Lopez-Siles M. et al. Darfeuille-michaud a molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009, 15 (6): 872-882.
9. Wood T.K., Barrios A.F.G., Herzberg M., Lee J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2006, 72 (2): 361-367.

Поступила 20.03.17

Контактная информация: Городничев Р.Б.,
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

А.М.Кудряшова¹, О.В.Борисова¹, Н.А.Михайлова¹, Д.В.Лоншаков², А.В.Катлинский²

ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgG К чЭПО В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ЖИВОТНЫХ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Биофармацевтическая компания ООО «Форт», Москва

Цель. Исследование влияния методов иммобилизации эритропоэтина на чувствительность выявления специфических IgG к человеческому эритропоэтину (чЭПО) в сыворотках крови экспериментальный животных. *Материалы и методы.* В работе использовали сыворотки крови кроликов и морских свинок, полученных после введения препаратов эритропоэтина. Схемы иммуноферментного метода включали варианты пассивной иммобилизации человеческого рекомбинантного эритропоэтина (чрЭПО) на планшете и два варианта иммунохимической иммобилизации: связывание биотинилированного чрЭПО в лунках планшета с пассивно иммобилизованным стрептавидином и связывание чрЭПО с пассивно иммобилизованными на планшетах антителами к эритропоэтину. *Результаты.* Показано, что иммунохимическая иммобилизация приводит к повышению чувствительности в диапазоне от 2 до 10 раз при выявлении антител к чЭПО по сравнению

с пассивной иммобилизацией. *Заключение.* Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии метода иммобилизации чрЭПО на чувствительность выявления антител к чЭПО. При выявлении антител к нативным конформационным эпитопам иммунохимическая иммобилизация является предпочтительной.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 49—55

Ключевые слова: сыворотки животных, твердофазный ИФА, антитела, эритропоэтин

A.M.Kudryashova¹, O.V.Borisova¹, N.A.Mikhailova¹, D.V.Lonshakov², A.V.Katlinsky²

EFFECT OF METHODS OF IMMOBILIZATION OF ERYTHROPOIETIN ON THE SENSITIVITY FOR THE DETECTION OF SPECIFIC IgG TO EPO IN EXPERIMENTAL ANIMALS SERA

¹ Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Biopharmaceutical company LLC «Fort», Moscow, Russia

Aim. The study of the effect of the erythropoietin coating procedure on sensitivity using the same secondary detection methods to quantify anti-EPO IgG positive animal sera. *Materials and methods.* Sera from experimental animals — rabbits and guinea pigs — after rhEPO injection were used. The methods includes directly coated ELISA and two types of immunochemical immobilization: capturing biotinylated rhEPO on streptavidin coated microtiter plates and capturing rhEPO via a specific antibody. *Results.* Immunochemical rhEPO immobilization results in a sensitivity from 2 to 10 of magnitude higher than direct coating of rhEPO. *Conclusion.* Our findings show that the method of rhEPO immobilization to microtiter plates is a critical determinant for the sensitivity of ELISA used for measuring anti-EPO antibodies. Assays in which rhEPO was captured via a specific mAb, or in which biotinylated rhEPO was captured via streptavidin, are preferred to detect serum antibodies to native structural state.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 49—55

Key words: serum of animals, ELISA, antibodies, erythropoietin

ВВЕДЕНИЕ

Терапия препаратами эритропоэтина проводится при хронической почечной недостаточности, онкозаболеваниях, при трансплантации органов и эритропоэтиндефицитных анемиях. Определение специфических антител к терапевтическим препаратам эритропоэтина является необходимым этапом оценки иммуногенности в ходе доклинических и клинических исследований, а также имеет важное значение для диагностики полной аплазии красного костного мозга (ПАККМ), вызываемой при длительном применении препаратов эритропоэтина [6, 8, 9]. Разработаны и описаны разные платформы для определения антител к эритропоэтину. Наиболее часто используются твердофазный иммуноферментный анализ, электрохемилюминесцентный метод, методы радиоиммунопреципитации и поверхностного плазмонного резонанса [1, 11, 13]. Преимуществами твердофазного иммуноферментного анализа являются отработанная технология, приборная оснащённость клинических лабораторий, обеспечивающих высокую пропускную способность и относительно дешёвизну постановки метода.

Важнейшим фактором, определяющим чувствительность твердофазного иммуноферментного анализа, является концентрация активных связывающих сайтов на поверхности твердой фазы. При пассивной сорбции белковая мо-

лекула изменяет свою конформацию и, как следствие, может измениться ее способность к биоаффинному взаимодействию [3, 10]. Для сохранения активности иммобилизуемых молекул и достижения высокой чувствительности используют ряд модификаций твердофазного иммуноферментного анализа. На модели иммуноферментного анализа, в котором выявляемые антитела одним сайтом связывались с эритропоэтином, иммобилизованным на планшете, а вторым — с меченым эритропоэтином, обеспечивающим детекцию сигнала, показано, что повысить чувствительность выявления антител к эритропоэтину можно, заменив пассивную иммобилизацию антигена связыванием биотинилированного антигена на планшетах, несущих на своей поверхности стрептавидин [5]. Однако данная модификация твердофазного иммуноферментного метода не позволяет выявлять специфические IgG4 [12], наличие которых было установлено в сыворотках крови пациентов с подтвержденным диагнозом ПАКМ [2, 13].

В соответствии с вышеизложенным, задачей данного исследования было изучение влияния метода иммобилизации эритропоэтина на чувствительность непрямого твердофазного иммуноферментного метода, позволяющего выявлять все классы иммуноглобулинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы: 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, стрептавидин (Сорбент-сервис, Москва). Для проведения ИФА использовались прозрачные 96-луночные планшеты (Costar). Эритропоэтин рекомбинантный человеческий (чрЭПО) предоставлен ООО «Форт», аффинно очищенные антитела кролика к эритропоэтину человека (ПАТ кролика к чЭПО, ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург), антитела козы к IgG кролика (H+L), конъюгированные с пероксидазой (ThermoScientific), антитела кролика к IgG морской свинки, конъюгированные с пероксидазой (ThermoScientific).

Сыворотки крови экспериментальных животных (кроликов и морских свинок) предоставлены ООО «Форт». Сыворотки получены после введения животным препаратов эритропоэтина бета, конъюгированного с полиэтиленгликолем (ПЭГ-ЭПО, ООО «Форт») [7], и метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтина бета (Мирцера, Hoffmann-La Roche Inc.) в течение 28 дней один раз в неделю подкожно (кролики) и внутривенно (кролики и морские свинки) в дозе 2,5 мкг/кг и 5 мкг/кг и последующего забора крови через 14 дней после последней инъекции (в каждую группу входили от 3 до 8 экспериментальных животных).

Результаты ИФА регистрировали на аппарате BioRadModel 680. Инкубацию планшетов проводили на термостатируемом планшетном встряхивателе (ELMI SkyLine) при 500 об/мин и температуре 37°C. После всех инкубаций проводили отмывку планшетов на планшетном промывателе (StatFax).

Получение препарата биотинилированного человеческого рекомбинантного эритропоэтина (Би-чрЭПО) проводили с использованием EZ-LinkSulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Scientific) при 20-кратном избытке биотина в соответствии инструкции производителя.

Выявление антител с пассивной иммобилизацией чрЭПО проводили путем внесения в лунки планшета по 100 мкл чрЭПО в концентрации 5 мкг/мл в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ), pH 9,6. Планшеты выдерживали в течение 19 — 22 часов при температуре (4 — 8)°C и на 1 час вносили блокирующий раствор — 0,02 М фосфатный буферный раствор pH 7,2, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20. Далее вносили

поликлональные антитела кролика к чЭПО или образцы сывороток в разведении 1:50 в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% БСА, 0,05% Tween 20 (PP). После инкубирования в течение 45 минут и отмывки вносили соответственно по 100 мкл конъюгированных с пероксидазой антител козы к IgG кролика (H+L) либо антител кролика к IgG морской свинки в разведении 1:15 т. Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

При выявлении антител непрямой метод с иммобилизацией биотинированного чрЭПО в лунки планшета вносили по 100 мкл стрептавидина в концентрации 10 мкг/мл в КББ. Планшеты выдерживали в течение 19 — 22 часов при температуре (4 — 8)°С. Далее вносили по 100 мкл Би-чрЭПО в PP в концентрации 0,5 мкг/мл. После инкубирования в течение 45 минут вносили по 100 мкл 0,02М фосфатного буферного раствора pH 7,2, содержащего 5% обезжиренного сухого молока (AppliChem) и 0,05% Tween 20. Стадию блокировки проводили в течение 45 минут. Внесение образцов сывороток и последующие процедуры проводили аналогично выявлению антител к чЭПО с проведением пассивной иммобилизации чрЭПО.

При выявлении антител с иммунохимическим связыванием чрЭПО в лунки планшета вносили поликлональные антитела кролика в 0,02 М фосфатном буферном растворе, pH 7,2, в концентрации 5 мкг/мл. Планшеты выдерживали в течение 19 — 22 ч при температуре (4 — 8)°С. После инкубации вносили блокирующий раствор, указанный при пассивной иммобилизации чрЭПО. Далее вносили по 100 мкл чрЭПО в концентрации 0,5 мкг/мл в PP и инкубировали в течение 90 минут. Образцы сывороток вносили по 100 мкл в разведении 1:50 в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 5% сыворотки кролика, 0,05% Tween 20 и инкубировали в течение 60 минут. Затем вносили по 100 мкл соответствующего конъюгата в PP в разведении 1:90 т. и инкубировали в течение 30 минут. Последующие процедуры проводили аналогично выявлению антител к чЭПО с проведением пассивной иммобилизации чрЭПО.

В каждом случае проводили подбор параметров ИФА с целью достижения максимальной чувствительности и специфичности. Чувствительность определения антител в сыворотках крови экспериментальных животных оценивали путем сравнения значения индексов позитивности анализируемых сывороток, определяемых как отношение ОПобразца/ОПпорог., где ОПпорог. = ОПср.К + 3σ, где ОПср.К — среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для нормальной пулированной сыворотки экспериментальных животных (6 — 10 повторов), σ — стандартное отклонение.

Результаты анализировали с помощью программного обеспечения OriginPro 9.1 (64-bit) SR3 b87 (OriginLab Corporation). Результаты для каждой группы экспериментальных животных выражали как среднее арифметическое ± стандартное отклонение. Критерий Манна-Уитни использовали для сравнения результатов, полученных для разных условий эксперимента. Величина $p \leq 0,05$ рассматривалась как статистически значимая.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение уровня антител к чЭПО в сыворотках кроликов проводили непрямой твердофазным иммуноферментным методом как при пассивной

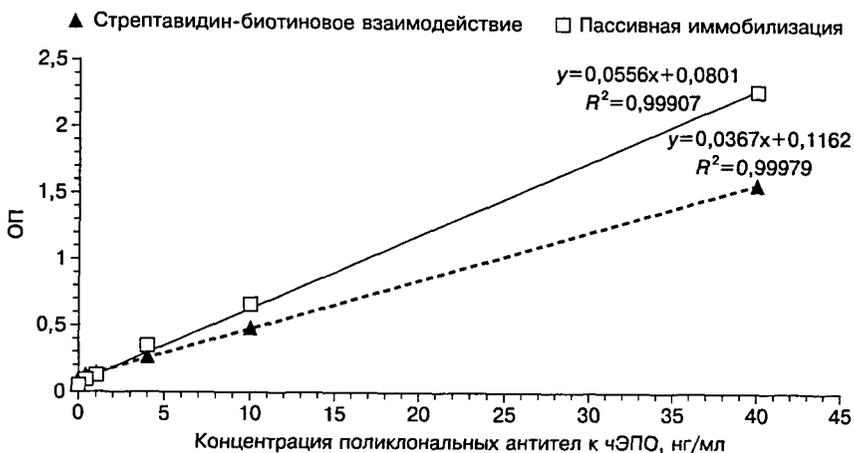


Рис. 1. Калибровочные графики, полученные для ИФА с пассивной иммобилизацией чрЭПО и для ИФА при стрептавидин-биотиновом взаимодействии.

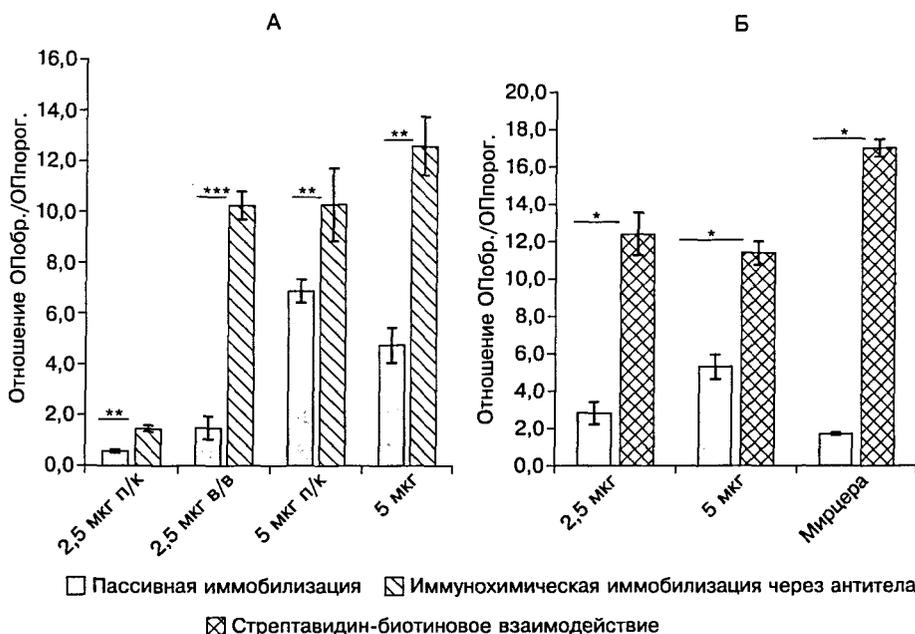


Рис. 2. Уровень антител к чЭПО в сыворотках морских свинок (А) при подкожном (п/к) и внутривенном (в/в) введении и кроликов (Б) при постановке разных вариантов ИФА.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ и *** $p \leq 0,001$ для критерия Манна-Уитни в каждой группе животных.

иммобилизации эритропоэтина в лунках иммуносорбента, так и при связывании биотинилированного чрЭПО на планшете с предварительно иммобилизованным стрептавидином

На первом этапе сравнивали калибровочные графики для двух видов ИФА, полученные с использованием в качестве калибратора антител кролика к эритропоэтину человека (рис. 1).

Тангенсы угла наклона линейного участка калибровочного графика к оси концентрации в координатах концентрация/поглощение характеризуют чувствительность метода (изменение регистрируемого сигнала на единицу из-

менения концентрации). Результаты свидетельствуют о более высокой чувствительности выявления поликлональных антител к эритропоэтину при пассивной иммобилизации. Иная картина наблюдается при определении уровня антител в сыворотках 3 групп кроликов, которым подкожно вводили препараты эритропоэтина — ПЭГ-ЭПО и Мирцера (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что иммобилизация чрЭПО через стрептавидин-биотиновое взаимодействие приводит к повышению чувствительности. Особенно выражено этот эффект проявлялся при выявлении антител у экспериментальных кроликов, которым вводили препарат Мирцера.

Сравнение уровня антител к чЭПО в сыворотках морских свинок проводили методами ИФА с пассивной иммобилизацией чрЭПО и с иммунохимической иммобилизацией чрЭПО на планшете с иммобилизованными поликлональными антителами кролика к чЭПО.

На рис. 2 представлены данные по определению индекса позитивности для сывороток морских свинок, показывающие, что при иммунохимической иммобилизации чрЭПО была достигнута более высокая чувствительность при определении уровня антител к эритропоэтину. Результаты показали, что сыворотки, в которых при пассивной иммобилизации чрЭПО не обнаруживаются специфические антитела, в условиях использования метода с иммунохимической иммобилизацией эритропоэтина выявляются как положительные.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии метода иммобилизации чрЭПО на чувствительность выявления антител к чЭПО. Иммунохимическая иммобилизация приводит к повышению чувствительности при выявлении антител к эритропоэтину в сыворотках крови экспериментальных кроликов и морских свинок. Как уже отмечалось, особенно ярко эффект повышения чувствительности проявляется при выявлении антител у экспериментальных кроликов, которым вводили препарат Мирцера. Более того, если сравнивать иммуногенность препаратов ПЭГ-ЭПО и Мирцеры в части генерации антител к чЭПО, то полученный результат при использовании двух типов иммуносорбентов оказывается противоположным: при пассивной иммобилизации чрЭПО обнаруживается большее количество антител к препарату ПЭГ-ЭПО, тогда как при использовании иммунохимической иммобилизации — к препарату Мирцера. Таким образом, метод иммобилизации чрЭПО на планшете не только влияет на чувствительность выявления антител в сыворотках экспериментальных животных, но использование ненадлежащего метода может привести к неверным представлениям об иммуногенности терапевтических белковых препаратов.

С другой стороны, более высокая чувствительность выявления поликлональных афинно очищенных антител кролика к эритропоэтину наблюдалась при пассивной иммобилизации, что может свидетельствовать о разном характере коммерческих антител к чЭПО и антител, находящихся в исследуемых сыворотках кроликов. Разница в чувствительности методов, вероятно, определяется конформацией иммобилизованного антигена. Пассивная сорбция может приводить к изменению конформации чрЭПО и соответственно к недоступности ряда эпитопов для связывания со специфическими антителами к конформационным эпитопам. При получении поликлональных антител процедура иммунизации обычно проводится в присутствии полного адьюванта Фрейнда, и, возможно, это вызывает частичную денатурацию белка. Кроме того, процесс очистки поликлональных антител проводился методом аффинной хроматографии, также включающей стадии денатурирующего воздействия

на белок. Соответственно значительную часть пула поликлональных антител могут составлять антитела к ненативным эпитомам, подобным тем, что формируются при пассивной иммобилизации антигена. Исследуемые сыворотки экспериментальных животных получены в условиях, когда велика вероятность образования антител к нативным эпитомам, и предпочтительным методом выявления антител является использование иммуносорбента с иммунохимически иммобилизованным чрЭПО. По литературным данным в сыворотках пациентов с полной аплазией красного костного мозга преимущественно были обнаружены антитела к нативным эпитомам эритропоэтина [4], что указывает на необходимость использования метода с иммунохимической иммобилизацией антигена при определении специфических антител к эритропоэтину у пациентов, проходящих терапию препаратами эритропоэтина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barger T.E., Kuck A.J., Chirmule N. et al. Detection of anti-ESA antibodies in human samples from PRCA and non-PRCA patients: an immunoassay platform comparison. *Nephrol Dial Transplant.* 2012, 27: 688-693.
2. Barger T.E., Wrona D., Goletz T.J. et al. A detailed examination of the antibody prevalence and characteristics of anti-ESA antibodies. *Nephrol. Dial Transplant.* 2012, 27 (10): 3892-3899.
3. Butler J.E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assays and other solid phase immunoassays. *Methods Mol. Med.* 2004, 94: 333-372.
4. Casadevall N., Nataf J., Viron B. et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *New Engl. J. Med.* 2002, 346: 469-475.
5. Gross J., Moller R., Henke W. et al. Detection of anti-EPO antibodies in human sera by a bridging ELISA is much more sensitive when coating biotinylated rhEPO to streptavidin rather than using direct coating of rhEPO. *J. Immunol. Methods.* 2006, 313 (1-2): 176-182.
6. Herrington W., Wieser C., Rosenkranz A.R. Pure red cell aplasia after treatment of renal anaemia with epoetin theta. *Clin. Kidney J.* 2013, 6 (5): 539-542.
7. Lonshakov D. V., Sheremet'ev S. V., Belosludtseva E. M. et al. Synthesis of 4-aminobenzoic acid esters of polyethylene glycol and their use for pegylation of therapeutic proteins. *RSC Adv.* 2015, 5 (53): 42903-42909.
8. Macdougall I.C., Casadevall N., Locatelli F. et al. Incidence of erythropoietin antibody-mediated pure red cell aplasia: the prospective immunogenicity surveillance registry (PRIMS). *Nephrol Dial Transplant.* 2015, 30 (3): 451-460.
9. Macdougall I.C., Roger S.D., de Francisco A. et al. Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis stimulating agents: new insights. *Kidney Int.* 2012, 81: 727-732.
10. Rabe M., Verdes D., Seeger S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances Colloid Interface Sci.* 2011, 162 (1-2): 87-106.
11. Shin S.K., Ha S.K., Lee K.W. et al. Application of a bridging ELISA for detection of anti-erythropoietin binding antibodies and a cell-based bioassay for neutralizing antibodies in human sera. *J. Pharm. Biomed Anal.* 2010, 52: 289-293.
12. Van Der Zee J.S., Van Swieten P., Aalberse R.C. Serologic aspects of IgG4 antibodies. II. IgG4 antibodies form small, nonprecipitating immune complexes due to functional monovalency. *J. Immunol.* 1986, 137: 3566-3571.
13. Weeraratne D.K., Kuck A.J., Chirmule N. et al. Measurement of anti-erythropoiesis stimulating agent IgG4 antibody as an indicator of antibody-mediated pure red cell Aplasia. *Clin. Vac. Immunol.* 2013, 20 (1): 46-51.

Поступила 27.07.17

Контактная информация: Кудряшова Александра Михайловна,
109044, Москва, 1-я Дубровская ул., 15, р.т. (495) 674-54-97

*А.С.Оксанич, Т.Г.Самарцева, Е.Б.Файзулов, Н.Ф.Гаврилова,
И.В.Яковлева, В.В.Свиридов, В.В.Зверев*

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЛАЗМИДНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХИМЕРНЫХ АНТИТЕЛ ЗАДАННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

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

Цель. Получение универсальных генетических конструкций, кодирующих синтез легкой и тяжелой цепей химерного антитела, а также методических подходов для получения химерных антител заданной специфичности на примере моноклональных антител к дифтерийному токсину (ДТ) DT-17 в культуре клеток CHO и оценка их иммунохимических и эффекторных свойств. *Материалы и методы.* Методом ПЦР были получены гены вариабельных областей легких и тяжелых цепей мышиноного антитела к дифтерийному токсину DT-17 и клонированы в плазмидном векторе pCI-neo. Генно-инженерными методами был получен «супервектор» SV DT-17neo, содержащий гены химерного антитела. С использованием культуральных методов «супервектором» была трансфицирована культура клеток CHO и получен высокопродуктивный клон, секретирующий химерные антитела к ДТ. Для оценки активности антител применяли иммунохимические методы, а для получения препаративного количества антител — аффинную хроматографию. *Результаты.* Были получены универсальные векторы pLK DT-17 и pHG DT-17, содержащие гены легкой и тяжелой цепей химерного антитела к ДТ DT-17, где гены вариабельных и константных областей были фланкированы сайтами рестрикции эндонуклеаз, что позволяет изменять специфичность антител, а в перспективе даст возможность перейти к исследованиям по изменению класса и видовой принадлежности химерного иммуноглобулина. При трансфекции культуры клеток CHO полученными векторами отмечалось накопление антител к ДТ в культуральной жидкости. Выход очищенных химерных антител DT-17 составил 4 мг с 1 л культуральной среды. Минимальная концентрация химерных антител, при которой наблюдалась нейтрализация ДТ в культуре клеток CHO, составила 30 мкг/мл среды. *Заключение.* Были сконструированы универсальные плазмиды, кодирующие синтез легкой и тяжелой цепей химерного антитела DT-17. На основе векторов был получен «супервектор» и высокопродуктивный клон, секретирующий специфические антитела, которые обладали нейтрализующей активностью в отношении ДТ.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 56—63

Ключевые слова: иммуноглобулиновые гены, «супервектор», химерные антитела, дифтерийный токсин, токсиннейтрализующая активность

*A.S.Oksanich, T.G.Samartseva, E.B.Faizulov, N.F.Gavrilova,
I.V.Yakovleva, V.V.Sviridov, V.V.Zverev*

PLASMID DESIGN FOR PRODUCTION OF CHIMERIC ANTIBODIES WITH DEFINED SPECIFICITY IN EUKARYOTES

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. In this study we aimed to design the universal genetic construction expressing the light and heavy chains of a chimeric antibody, to develop methodological approaches for the production of chimeric antibodies with defined specificity using the monoclonal antibodies to diphtheria toxin (DT) DT-17 in the CHO cells as an example and to evaluate their immunochemical and effector properties. *Materials and methods.* Variable region genes of the light and heavy chains of mouse antibodies DT-17 to diphtheria toxin were obtained by PCR method and cloned into pCI-neo plasmid vector. The SV DT-17neo «supervector» containing the genes of a chimeric antibody was constructed by using of genetic engineering techniques. CHO cells were transfected with «supervector» and a highly productive clone secreting chimeric antibodies to DT were collected.

Immunochemical methods were used to evaluate antibody activity, and affinity chromatography was used to prepare preparative amounts of the antibodies. *Results.* Universal vectors pLK DT-17 and pHG DT-17 containing light and heavy chain genes of the chimeric antibodies DT-17 to DT were constructed. The variable and constant region genes were flanked by endonuclease restriction sites, which allows to change the specificity of the antibodies. In the future it will make possible to study the modifications of the class and species specificity of the chimeric immunoglobulins. When the CHO cell culture was transfected with the designed vectors, the accumulation of antibodies to DT in the culture medium was detected. The yield of purified DT-17 chimeric antibodies was 4 mg per 1 liter of culture medium. The minimum concentration of chimeric antibodies necessary for DT neutralization in the CHO cells was 30 µg/mL. *Conclusion.* Universal plasmids encoding the synthesis of light and heavy chains of chimeric DT-17 antibody have been designed. On the basis of these vectors, a «supervector» and a highly productive clone secreting specific antibodies that had neutralizing activity against DT were obtained.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 56–63

Key words: immunoglobulin genes, «supervector», chimeric antibodies, diphtheria toxin, toxin neutralizing activity

ВВЕДЕНИЕ

Иммуноглобулины, благодаря своей уникальной способности специфически распознавать все многообразие антигенов, в настоящее время являются основой для широкого их применения как средства терапии и профилактики инфекционных заболеваний. Для антител, применяемых в терапии инфекционных заболеваний, отдается предпочтение изологичным препаратам, полученным от доноров. В то же время, препараты специфических антител получают также из крови иммунизированных животных, трансгенных животных с чужеродными генами иммуноглобулинов, из гибридных клеточных культур и др. [7].

Антисыворотки, полученные от животных, можно использовать для терапии различных заболеваний человека, но при этом возможны нежелательные побочные эффекты в виде аллергических реакций вплоть до анафилактического шока или образование собственных антител к белкам сыворотки животного [3].

Что касается человеческих антисывороток, то их использование ограничивается дефицитом сырьевой базы донорских сывороток, сложностью стандартизации, кроме того, существует риск заражения пациента редкими патогенами, такими как прионы или мало изученные вирусы.

С развитием технологии генетической инженерии открылись перспективы в области использования рекомбинантной ДНК для получения мини-антител, химерных и гуманизированных антител, широко используемых в научных исследованиях и медицине [1].

В настоящее время различными фармацевтическими компаниями производятся десятки препаратов на основе моноклональных гуманизированных антител. Как правило, эти антитела входят в состав препаратов для лечения онкологических заболеваний, таких как В-клеточный лейкоз, миелолейкоз, лимфома, рак молочной железы, рак кишечника. Кроме того, гуманизированные антитела используют для химиотерапии ревматоидного артрита, псориаза и при трансплантации внутренних органов для профилактики отторжения [2, 5, 6, 8, 9].

Целью настоящей работы была разработка универсальных генетических конструкций, кодирующих синтез легкой и тяжелой цепей химерного (мышь/

человек) антитела, а также методических подходов для получения химерных антител заданной специфичности на примере моноклональных антител к дифтерийному токсину DT-17 в культуре клеток CHO и оценка их иммунохимических и эффекторных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовалась гибридома DT-17, продуцирующая моноклональные антитела, которые обладают нейтрализующей активностью в отношении дифтерийного токсина.

Гибридомы-продуценты антител к дифтерийному токсину культивировали на среде RPMI 1640 с добавлением 10% сыворотки плода коровы и глутамина. После восстановления криоконсервированных гибридных клонов перед выделением из них мРНК их культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение нескольких суток. Морфологию клеток оценивали под инвертированным микроскопом, их антителообразующую способность и активность антител в культуральной среде — в ИФА. При сохранности специфичных для каждого клона характеристик, клетки, взятые на стадии экспоненциального роста, осаждали центрифугированием; осадок клеток использовали для выделения суммарной РНК с использованием набора реагентов RNeasy Mini Kit (Qiagen).

Праймеры для амплификации участков генов, кодирующих переменные фрагменты тяжелой и легкой цепей мышинных IgG, праймеры для амплификации генов константных фрагментов IgG1 человека подбирали, руководствуясь имеющимися в литературе данными и базами данных нуклеотидных последовательностей мРНК человека и мыши. Олигонуклеотиды синтезировали в компании «Синтол».

Обратную транскрипцию выделенной РНК с подобранными праймерами, амплификацию доменов переменных участков моноклональных иммуноглобулинов мыши, а также встраивание их в плазмиду, секвенирование ампликонов и плазмиды для контроля правильности полученной конструкции проводили в соответствии со стандартными методами генной инженерии.

Культуру клеток CHO культивировали на питательных средах RPMI (Панэко) или Opti-MEM (Invitrogen) с добавлением и без добавления фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco) в количестве 2,5 — 5%, для трансфекции использовали реактив Lipofectamine 2000 (Invitrogen), для аффинной очистки иммуноглобулинов — протеин-G сефарозу (Биалекса).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из гибридомы DT-17, продуцирующей моноклональные антитела к дифтерийному токсину, выделяли суммарную РНК и с использованием олигонуклеотинового праймера (T18) на ее матрице в реакции обратной транскрипции получали кДНК. Для амплификации участков, кодирующих переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина G мыши, использовали универсальные праймеры, описанные Imai S. et al. [4]. Полученные ПЦР-продукты секвенировали и на основании последовательностей генов переменных областей с использованием базы данных IMGT (International Immunogenetics Information System, www.imgt.cines.fr) подбирали нуклеотидные последовательности наиболее близких лидерных областей как для легкой, так и для тяжелой цепей.

Для получения генов константных областей тяжелой цепи человека из

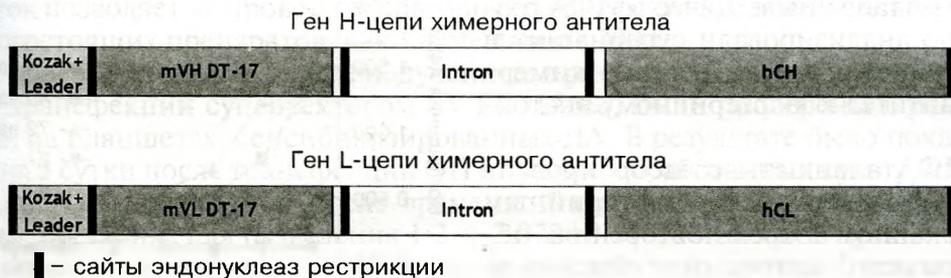


Рис. 1. Схематическое изображение структуры генов тяжелой и легкой цепей химерного антитела к дифтерийному токсину/анатоксину.

mVH и mVL — варибельные участки генов тяжелой и легкой цепей мышиноного моноклонального антитела DT-17; hCH и hCL — константные участки генов тяжелой и легкой цепей IgG1(γ) человека.

моноклеаров периферической крови донора была выделена суммарная РНК. С использованием праймера T18 и праймеров для получения генов константных областей тяжелой цепи IgG человека (hCH1f 5'-TTT CTA GAA TGG CCT CCA CCA AGG GCC CA-3'; hCH1r 5'-TTC TCG AGT CAT TTA CCC GGA GAC AGG GAG A-3'), в реакции ОТ и ПЦР были получены фрагменты ДНК, кодирующие константные области тяжелой цепи. Для получения фрагмента гена константной области легкой цепи каппа на матрице геномной ДНК из моноклеаров периферической крови донора проводили ПЦР с использованием специфических праймеров (hCLKf 5'-TTT CTA GAA TGC GAA CTG TGG CTG CAC CA-3'; hCLKr 5'-TTC TCG AGC TAA CAC TCT CCC CTG TTG AAG CTC-3').

На основе данных о нуклеотидных последовательностях генов лидерных и варибельных областей легкой и тяжелой цепей мышиноного моноклонального антитела DT-17 и константных областей легкой и тяжелой цепей IgG человека была спроектирована нуклеотидная последовательность, кодирующая синтез химерных легкой и тяжелой цепей, структура которых показана на рис. 1.

Согласно спроектированным последовательностям в компании Евроген (Россия) были синтезированы гены химерных легкой и тяжелой цепей. Для экспрессии спроектированных генов в клетках млекопитающих был использован эукариотический плазмидный вектор pCI-neo (Promega), который в своем составе содержит предранний цитомегаловирусный промотор, сайт полиаденилирования и ген устойчивости к антибиотику G418 (Geneticin). В результате клонирования были получены два вектора: первый кодировал легкую цепь химерного антитела (pLK DT-17) к дифтерийному токсину, а второй — тяжелую цепь (pHG DT-17).

С целью оценки продукции химерных антител к дифтерийному токсину проводили трансфекцию рекомбинантными плазмидами клеток CHO. Трансфекцию каждой плазмидой по отдельности и ко-трансфекцию обеими плазмидами проводили с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Для контроля эффективности трансфекции использовали плазмиду с геном красного флуоресцентного белка pTurboRFP-C (Евроген, Россия). Через одни, двое и трое суток после трансфекции соскребали монослой клеток и перенесли вместе с культуральной жидкостью в отдельные пробирки, центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость, а осадок суспендировали в фосфатно-солевом буфере и лизировали клетки трехкратным заморажива-

нием-оттаиванием. Далее в ИФА раздельно анализировали супернатант и лизат клеток — на наличие химерных антител к дифтерийному анатоксину.

ИФА планшеты с адсорбированным на поверхности дифтерийным анатоксином в трех повторениях обрабатывали 2-кратными разведениями препаратов, полученных в результате трансфекции, и проявляли конъюгатом, специфичным к Fc-фрагменту человеческих иммуноглобулинов G. В результате было показано, что на 2 и 3 сутки после трансфекции в культуральной жидкости имело место накопление антител, специфичных к дифтерийному анатоксину (ДА). При этом значение ОП в препаратах культуральной жидкости и лизата клеток, полученных в результате ко-трансфекции рекомбинантными плазмидами, достоверно превышало ОП в препаратах, полученных в результате трансфекции контрольной плазмидой рTurboRFP-C и К- (нетрансфицированная культура клеток СНО) до разведения 1:64 (рис. 2).

В образцах лизатов нетрансфицированных клеток, а также в препаратах, полученных в результате трансфекции каждой плазмидой по отдельности, проанализированных методом ИФА, достоверной разницы в ОП между опытными и контрольными образцами выявлено не было. При проявлении реакции ИФА антимишиным конъюгатом разницы между ОП в опытных и контрольных образцах также выявлено не было, что подтверждает химерность полученных антител.

Химерные антитела также были проверены в реакции латекс-агглютинации и конкурентном ИФА с мышинными материнскими моноклональными антителами DT-17, где также была подтверждена их специфичность к ДА и антигенсвязывающая способность (данные не приводятся).

На следующем этапе из двух рекомбинантных плазмид, кодирующих последовательности легкой и тяжелой цепей химерного антитела, был получен «супервектор» SV DT-17neo, объединяющий в одной плазмиде гены обеих цепей иммуноглобулина.

Наличие в «супервекторе» гена устойчивости к антибиотику G418 (Geneticin) позволило получить стабильно трансфицированную плазмидой SV DT-17neo культуру клеток СНО путем ее выращивания в токсичной концентрации антибиотика G418. Использование подобной культуры

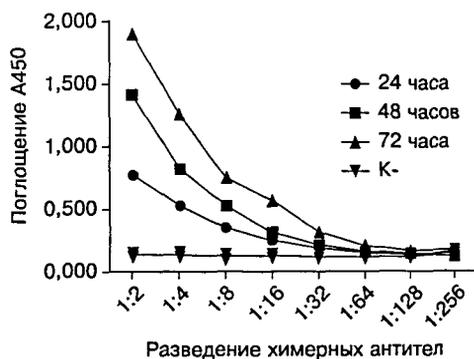


Рис. 2. Динамика накопления химерных антител к дифтерийному анатоксину в культуральной жидкости через 24, 48 и 72 часа после временной ко-трансфекции клеток СНО плазмидами rLKG DT-17 и rHG DT-17, кодирующими легкую и тяжелую цепи химерного антитела DT-17 соответственно.

К- нетрансфицированная культура клеток СНО.

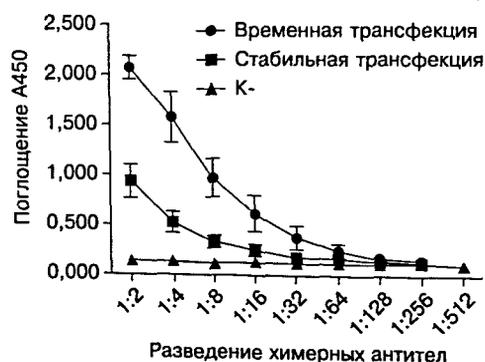


Рис. 3. Продукция химерных антител клетками СНО после временной и стабильной трансфекции «супервектором» SV DT-17neo.

клеток позволяет не проводить повторную трансфекцию с применением таких дорогостоящих препаратов, как Lipofectamine 2000.

Химерные антитела к ДА, полученные в результате временной и стабильной трансфекции супервектором SV DT-17neo, были проверены в реакции ИФА на планшетах, сенсифицированных ДА. В результате было показано, что на 3 сутки после трансфекции ОП в лунках, обработанных культуральной жидкостью, полученной после временной трансфекции вектором SV DT-17neo, составила для разведения 1:2 — $2,072 \pm 0,119$, тогда как в лунках, обработанных препаратами, полученными от стабильно трансфицированной культуры клеток СНО — $0,939 \pm 0,168$ (рис. 3). Также было обнаружено, что в лизатах стабильно трансфицированных супервектором клеток СНО химерные антитела практически не выявляются.

Получение стабильно трансфицированной вектором SV DT-17neo культуры клеток СНО позволило на следующем этапе приступить к клонированию с целью выведения высокопродуктивного клона СНО, секретирующего в большом количестве специфические химерные антитела к ДА. Для этого в культуре клеток СНО, стабильно трансфицированной вектором SV DT-17neo и образовавшей монослой, проводили подсчет клеток. Затем доводили концентрацию клеток с использованием ФСБ (рН 7,4) до одной клетки в микролитре. Разносили по 1 мкл суспензии клеток в 96-луночный планшет и под микроскопом отмечали те лунки, где визуализировалось по 1 клетке. В лунки вносили по 100 мкл RPMI с 5% фетальной бычьей сывороткой и столько же аналогичной кондиционированной среды. Ежедневно под световым микроскопом контролировали состояние клеток и рН среды (по цвету), через 5 — 7 дней клетки трипсинизировали и заменяли питательную среду. Примерно на 12 — 14 день во всех лунках формировался монослой на 80 — 100%. Из лунок планшета, где сформировался монослой, отбирали среду для анализа содержания химерных антител к ДА методом ИФА. По результатам ИФА отбирали самые высокопродуктивные клоны СНО и переносили их в культуральные флаконы для размножения и формирования музея. Было отмечено, что если за 14 дней до клонирования СНО увеличить токсическую дозу G418 в 2 раза, происходит 3 — 6-кратное увеличение доли высокопродуктивных клонов относительно посеянных на клонирование клеток, эта процедура существенно снизила трудоемкость клонирования.

Всего было проанализировано 319 клонов, трансфицированных супервектором SV DT-17neo. Для дальнейшей работы был отобран один клон-продуцент химерных антител DT-17 с титром антител 1:512, который был использован для накопления антитело-содержащей культуральной жидкости. Культуральную жидкость осветляли центрифугированием, фильтровали через бумажный фильтр и проводили аффинную очистку на протеин-G сефарозе. Сконцентрированные антитела диализовали и стерилизовали фильтрованием через фильтр с мембраной PES и диаметром пор 0,22 мкм. Выход антител в элюате составил 4 мг/л культуральной среды. Очищенные антитела использовали для оценки токсиннейтрализующей активности в реакции нейтрализации дифтерийного токсина (ДТ) в культуре клеток СНО. Для этого химерные антитела DT-17 разводили с 2-кратным шагом, после чего смешивали с ДТ и смесь вносили в 96-луночные планшеты к монослою культуры клеток СНО. Результаты оценивали по изменению окраски культуральной среды. Нейтрализующая активность химерных антител DT-17 с ДТ в культуре клеток СНО наблюдалась при концентрации антител не менее 30 мкг на 1 мл культуральной среды.

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа была направлена на получение универсальных генетических конструкций, которые позволяют в короткие сроки получать химерные антитела из гибридомы, продуцирующей мышинные моноклональные антитела нужной специфичности, с использованием стандартного комплекса методов. Для реализации цели при проектировании генов химерного антитела переменные и константные области иммуноглобулина, а также гены лидерных последовательностей были фланкированы сайтами рестрикции редкощепящих эндонуклеаз, что дает принципиальную возможность на основе созданных конструкций получать моноклональные антитела различной специфичности, разных классов и изотипов. Для повышения уровня экспрессии генов химерных иммуноглобулинов между константными и переменными областями обеих цепей была интегрирована нуклеотидная последовательность химерного интрона, а перед переменными областями — участок, кодирующий лидерный пептид и сайт Козака. Особенностью разработанных конструкций является то, что сайты рестрикции были интегрированы непосредственно в 5'-концы генов лидерных пептидов легкой и тяжелой цепей без потери секретирующей способности иммуноглобулинов из комплекса Гольджи, а также в 3'- и 5'-концы интрона с сохранением узнавания его сигнальных последовательностей для мРНК. Таким образом, модификации, внесенные в гены легкой и тяжелой цепей химерного иммуноглобулина, не затрагивают непосредственно переменные и константные участки, что позволяет создавать химеры любой не только антигенной, но в перспективе классовой и видовой специфичности, что может быть актуально, в том числе и для ветеринарных нужд в племенном животноводстве.

В работе были получены рекомбинантные векторы pLK DT-17 и pHG DT-17, при ко-трансфекции которыми клеток СНО в культуральной жидкости получали полноразмерные химерные антитела, обладающие антигенной специфичностью мышинного моноклонального антитела DT-17. С использованием полученного «супервектора» SV DT-17neo была создана стабильно трансфицированная культура клеток СНО, продуцирующая антитела к дифтерийному токсину. Показано, что получаемые антитела являются химерными, то есть содержат мышинные антиген-распознающие переменные фрагменты и человеческий Fc-фрагмент, они секретируются из клеток и обладают специфичностью к дифтерийному токсину/анатоксину. Также было обнаружено, что в лизатах стабильно трансфицированных супервектором клеток СНО химерные антитела практически не выявляются, то есть они в основном секретируются во внешнюю среду, а не накапливаются в клетках, как наблюдалось при ко-трансфекции клеток двумя плазмидными векторами pLK DT-17 и pHG DT-17. Несмотря на то, что выход специфических антител к ДТ в культуральной жидкости стабильно трансфицированной культуры клеток СНО оказался ниже в 2 раза, чем при временной трансфекции, что закономерно, этот этап необходимо проводить для дальнейшего получения высокопродуктивных клонов.

Для получения готовых очищенных и сконцентрированных препаратов были предложены стандартные общепринятые простые и недорогие методики, что позволило получить высокий выход и активность конечного препарата химерных антител. Предполагается внести модификации в некоторые методики, использованные в работе, что позволит увеличить выход антител в единице объема культуральной среды и удешевить процедуру очистки антител.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-15-01525.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения. *Acta Naturae*. 2009, 1: 32-50.
2. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габитов А.Г., Кирпичников М.П. Неприродные антитела и иммуноконъюгаты с заданными свойствами: оптимизация функций через направленное изменение структуры. *Успехи химии*. 2015, 84 (1): 1-26.
3. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М., Мир, 2000.
4. Imai S., Mukai Y., Nagano K. et al. Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 29 (7): 1325-1330.
5. Kreitman R.J. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J.* 2006, 8 (3): 532-551.
6. Pai L.H., Wittes R., Setser A. et al. Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: an antibody linked to Pseudomonas exotoxin. *Nat. Med.* 1996, 2: 350-353.
7. Redwan R.M. Animal-derived pharmaceutical proteins. *J. Immunoassay Immunochem.* 2009, 30 (3): 262-290.
8. Teicher B.A., Chari R.V. Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clin. Cancer. Res.* 2011, 17 (20): 6389-6397.
9. Witzig T.E. Radioimmunotherapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2006, 19: 655-668.

Поступила 10.07.17

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Г.И.Алаторцева¹, А.В.Сидоров¹, Л.Н.Нестеренко¹, Л.Н.Лухверчик¹,
М.В.Жукина¹, И.И.Амиантова¹, А.В.Милованова¹, Д.С.Воробьев¹,
Ю.И.Амур¹, М.И.Михайлов^{1,2}, К.К.Кюрегян^{1,2}, В.С.Кичатова^{1,2},
И.А.Потемкин^{1,2}, О.В.Исаева^{1,2}, Е.Ю.Малинникова^{1,2},
А.А.Карлсен^{1,2}, В.М.Блинов¹, З.Ш.Нурматов³, А.З.Нурматов³,
О.Т.Касымов³, С.В.Жаворонок⁴, В.В.Зверев¹*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ORF3 ВИРУСА ГЕПАТИТА Е 1 ГЕНОТИПА С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ОПТИМИЗАЦИИ КОДОНОВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия; ³НПО «Профилактическая медицина», Бишкек, Кыргызская Республика; ⁴Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Цель. Получение рекомбинантного аналога полноразмерного белка ORF3 вируса гепатита Е (ВГЕ) 1 генотипа. **Материалы и методы.** Штаммы *Escherichia coli*, плазмидные векторы, серологический и клинический материал, иммуноферментные тест-системы. Молекулярно-биологические, биоинформационные, биотехнологические, биохимические и серологические методы. **Результаты.** Из препарата РНК ВГЕ 1 генотипа, выделенного от больного из Киргизии, получена рекомбинантная плазида, содержащая ДНК копию субгеномной вирусной РНК. С использованием данной плазмиды получены штаммы *E.coli* — продуценты рекомбинантного антигена ORF3 ВГЕ 1 генотипа в виде слитного с β-галактозидазой *E.coli* полипептида, содержащего полноразмерную копию белка ORF3. Для повышения уровня экспрессии рекомбинантного белка проведена оптимизация кодонов клонированного фрагмента кДНК. Рекомбинантный белок ORF3 выделен из телец-включений биомассы штамма-продуцента и очищен методом эксклюзионной хроматографии. Антигенная специфичность полученного полипептида подтверждена методами иммуноферментного анализа и вестерн-блоттинга со специфическими сыворотками. **Заключение.** Разработан рекомбинантный антиген ORF3 ВГЕ 1 генотипа и экспериментально показана возможность его применения в диагностических тестах.

Ключевые слова: вирус гепатита E, ВГЕ 1 генотипа, ген orf3, рекомбинантный антиген ORF3, ИФА, вестерн-блоттинг

G.I. Alatortseva¹, A.V. Sidorov¹, L.N. Nesterenko¹, L.N. Luhverchik¹,
M.V. Zhukina¹, I.I. Amiantova¹, A.V. Milovanova¹, D.S. Vorobev¹,
Yu. I. Ammur¹, M.I. Mikhailov^{1,2}, K.K. Kyuregyan^{1,2}, V.S. Kichatova^{1,2},
I.A. Potemkin^{1,2}, O.V. Isaeva^{1,2}, E. Yu. Malinnikova^{1,2},
A.A. Karlsen^{1,2}, V.M. Blinov¹, Z.Sh. Nurmatov³, A.Z. Nurmatov³,
O.T. Kasymov³, S.V. Zhavoronok⁴, V.V. Zverev¹

DESIGN OF HEPATITIS E VIRUS GENOTYPE 1 RECOMBINANT ORF3 PROTEIN BY CODON OPTIMIZATION METHOD

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia; ³Scientific Production Association «Preventive Medicine», Bishkek, Kyrgyz Republic; ⁴Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Aim. The development of the hepatitis E virus (HEV) genotype 1 full-size ORF3 recombinant polypeptide. *Materials and methods.* *Escherichia coli* strains, plasmid vectors, serological and clinical samples, ELISA reagent kits, molecular biological, bioinformatic, biotechnological, biochemical and serological methods. *Results.* HEV genotype 1 RNA had been isolated from clinical samples collected in Kyrgyzstan. DNA copy of subgenomic virus RNA had been cloned and used for further development of *E. coli* strains producing full-size recombinant protein ORF3 fused to *E. coli* beta-galactosidase. Codons optimization method was used in aim to increase expression level of recombinant protein. Recombinant protein ORF3 had been isolated from the inclusion bodies of the *E. coli* biomass and purified by size exclusion chromatography. Antigenic specificity of recombinant polypeptide had been confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting with the specific sera. *Conclusion.* HEV genotype 1 ORF3 recombinant antigen had been designed, and its applicability in diagnostic tests had been experimentally confirmed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 63—72

Key words: hepatitis E virus, genotype 1 HEV, orf3 gene, recombinant ORF3 antigen, ELISA, Western blotting

ВВЕДЕНИЕ

Основным лабораторным показателем инфицирования вирусом гепатита E (ВГЕ) является выявление в сыворотке крови больных специфических антител методом иммуноферментного анализа. Из-за трудностей, связанных с культивированием ВГЕ, известные к настоящему времени диагностические тест-системы основаны главным образом на использовании рекомбинантных антигенов.

Геном ВГЕ представляет собой одноцепочечную полиаденилированную РНК положительной полярности размером 7,3 тысяч нуклеотидных остатков (т.н.о.), содержит три открытых рамки считывания orf1, orf2 и orf3, а также недавно обнаруженную четвертую открытую рамку считывания orf4 [17], трансляция которой происходит через внутренний сайт связывания рибосом. В процессе репликации синтезируется кодирующая основные антигенно значимые белки ORF2 и ORF3 субгеномная бицистронная РНК размером 2,2 т.н.о. [9]. Одним из диагностически значимых антигенов является продукт

гена *orf3* — белок ORF3, или VP13, с молекулярной массой 13 kDa и протяженностью 113 — 114 аминокислотных остатков (а.о.). ORF3 — мультифункциональный регуляторный белок, отвечающий за уклонение вируса от иммунного ответа хозяина, регуляцию репликации вируса, сборку и созревание вирионов, выход вируса из инфицированной клетки [23]. Установлено, что в составе белка ORF3 имеется 3 антигенных домена в области 31 — 40 а.о., 63 — 76 а.о. и С-концевого участка, который содержит основные иммунодоминантные эпитопы [11, 21]. Известно также, что в положении 63 — 76 а.о. присутствует обогащенный пролином мотив «РХХР», содержащий линейные и поверхностно-ориентированные генотип-специфические антигенные сайты [22]. Диагностически важная особенность белка ORF3 — его способность взаимодействовать с сыворотками крови больных на поздних сроках острой фазы инфекции и в ранней фазе реконвалесценции [16].

Применение антигенов, в полной мере содержащих иммунодоминантные участки данного белка, представляется перспективным не только с точки зрения возможности выявления генотип-специфических антител, но и для определения давности инфицирования и стадии заболевания гепатитом E (ГЕ). Заболевание, вызываемое ВГЕ 1 генотипа, является строгим антропонозом и распространено на территории стран постсоветского пространства Центральной Азии. В данной работе была поставлена задача получения рекомбинантного аналога полноразмерного белка VP13 ВГЕ 1 генотипа штамма, циркулирующего в странах СНГ и имеющего эпидемиологическую значимость с точки зрения возможного завоза в Россию в связи с увеличением международной трудовой миграции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Праймеры и пробы для ПЦР и секвенирования синтезировали в Институте биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова. Получение фекальных экстрактов, выделение из них нуклеиновых кислот и подтверждение наличия РНК ВГЕ методом вложенной ПЦР проводили по ранее разработанным методикам [7].

ДНК-копию вирусной РНК (кДНК) получали на матрице очищенной из фекальных экстрактов РНК, содержащих РНК ВГЕ 1 генотипа, с использованием 18-членных олиго-dT-праймеров и обратной транскриптазы SuperScript III («Life Technologies», США). Вирусную кДНК амплифицировали с помощью высокоточной ДНК-полимеразы «Phusion» («Finnzymes», Финляндия) в соответствии с рекомендациями производителя. Реакции проводили на термоблокере «TProfessional Gradient» («Biometra», Германия).

ПЦР-продукты необходимого размера выделяли из агарозных гелей после электрофоретического разделения ампликонов, затем проводили еще один цикл ПЦР-амплификации с Taq-полимеразой, полученные ПЦР-продукты очищали на спин-колонках «Micro Bio-SpinBio-Gel P-30» («BioRad», США) и использовали в А/Т-клонировании. Лигирование полученных ДНК-вставок в плазмидные векторы pGEM-Teasy («Promega», США) и pEL5a [1] и трансформацию компетентных клеток *E.coli* CC001 генотипа XL-Blue (ООО «Евроген», Россия) и штамма *E.coli* PLT90 (F-, Ion::Tn10(TetR), endA1, malPpr::[PR, C1857](Mal-, λ imm) thi, hsdR17) [2] лигазной смесью осуществляли по общепринятому методу [6].

Определение нуклеотидной последовательности ДНК после очистки проводили в Институте биоорганической химии. Для анализа и обработки нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайна праймеров

использовали пакеты программ «Vector NTI», AS [19] и MEGA [14]. Потенциальные иммунодоминантные участки вирусных белков определяли по результатам расчета гидрофильных и гидрофобных профилей [15]. Анализ коротких пептидных гомологий между ВГЕ 1 генотипа и герпесвирусами человека 1 — 8 типов проводили, используя ранее описанные алгоритмы [13].

Получение биомасс культур клеток *E.coli* PLT90, трансформированных векторной или рекомбинантными плазмидами, выделение и очистку рекомбинантных полипептидов проводили по ранее опубликованным методикам [4, 5].

В работе использовали сыворотки крови и фекалии больных гепатитом из инфекционных больниц г. Ош (Киргизия) и сыворотки крови больных гепатитом, предоставленные БГМУ (Минск, Беларусь). Сыворотки крови условно здоровых лиц и контрольной группы (содержащие серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и инфекционных патологий печени иной этиологии: инфекционный мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ-инфекция) были получены из МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского и Клинико-диагностического центра НИИВС им. И.И.Мечникова (Москва). В качестве положительного контрольного образца использовали рекомбинантный полипептид ORF3 ВГЕ штамма Бирма из коллекции Лаборатории клонирования вирусных геномов НИИВС им. И.И.Мечникова [3]. IgG к ВГЕ в образцах сывороток крови выявляли с помощью иммуноферментной тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы»). Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и возбудителями инфекционной патологии печени иной этиологии определяли с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HAV-G-РЕКОМБ», «ДС-ИФА-НВsAg-подтверждающий тест», «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ/АТ Скрин» (НПО «Диагностические системы»), «Вектогеп В-НВs-антиген-2», «Гепабест анти-НВс-IgG», «Бест анти-ВГС-авто», «Бест анти-ВГС-подтверждающий тест», «Бест анти-ВГС-подтверждающий тест», «ВектоЦМВ-IgG-авидность», «ВектоВЭБ-ЕА-IgG», «ВектоВЭБ-NA-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест»), «БЛОТ ВИЧ 1/2+0» (ЗАО БТК «Биосервис»). Иммуноферментный анализ выполняли в соответствии с инструкциями производителей соответствующих тест-систем.

Вестерн-блоттинг и твердофазный непрямой иммуноферментный анализ проводили с помощью ранее описанных методик [4, 20].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из образцов фекалий пациентов из Киргизии с клиническими признаками гепатита, содержащих РНК ВГЕ 1 генотипа, выделили тотальную РНК, которую использовали для получения кДНК в реакциях обратной транскрипции с применением олиго-dT-праймеров. Для клонирования фрагментов субгеномной РНК использовали 5 полученных образцов кДНК и 5 пар специфических праймеров, рассчитанных на основе последовательности генома вируса ВГЕ 1 генотипа (NCBI AV369689), выбранного в качестве консенсуса по данным биоинформационного анализа. С целью получения необходимого ПЦР-продукта отработали условия проведения реакции: состав буфера, концентрация реагентов, продолжительность элонгации, температура отжига матрицы. После оптимизации условия ПЦР были следующими: 40 сек. при +98°C, затем 30 циклов амплификации (денатурация в течение 5 сек при +98°C, отжиг матрицы в течение 20 сек при +67,5°C, синтез второй цепи в течение 2

мин при +72°C) и финальная элонгация 5 мин при +72°C. В результате были получены ПЦР-продукты размером от 2200 до 2300 п.н. в количестве, достаточном для клонирования в векторе pGEM-Teasy («Promega», США) (рис. 1).

При последующем А/Т-клонировании получили клоны *E.coli* СС001 (XL-Blue), содержащие в составе рекомбинантной плазмиды pGEMeasy-HE1 фрагменты ДНК размером 2,3 т.п.н., соответствующие субгеномной РНК вируса, что было подтверждено секвенированием. Сравнительный анализ показал совпадение аминокислотной последовательности белка, кодируемого клонированным фрагментом ДНК, с белком ORF3 референсного штамма вируса за исключением одной аминокислотной замены (Ala₃₄ на Val₃₄).

Последовательность белка ORF3 дополнительно проанализировали с помощью исследования профиля его гидрофобности/гидрофильности, рассчитанного по индексу гидропатичности [15], где более высокие значения индекса соответствуют более гидрофобным участкам полипептидов. Провели анализ коротких пептидных гомологий

— мотивов потенциальных линейных эпитопов — между белком ORF3 ВГЕ 1 генотипа и белками семейства герпесвирусов человека 1 — 8 типов с использованием доступных в базах данных аминокислотных последовательностей. В аминокислотной последовательности полученного белка ORF3 не было обнаружено совпадений с последовательностями структурных белков герпесвирусов, за исключением фрагмента Gln₆₃-Pro₆₉, подобного участку ядерного белка EBNA-2 вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), однако большая часть этой последовательности находится вне экспериментально картированной иммунодоминантной области Ser₆₇-Gly₇₆ [4], совпадая лишь по трем аминокислотным остаткам Ser₆₇-Pro₆₉-Pro₆₉.

Фрагмент кДНК гена *orf3* из рекомбинантной плазмиды pGEMeasy-HE1 переклонировали в экспрессирующий вектор pEL5a с помощью ПЦР по сайтам рестрикции BamHI и PstI. Таким образом, были получены плазмиды, кодирующие полноразмерную копию белка ORF3 в виде слитного с β-галактозидазой *E.coli* полипептида. Наличие вставки и рамки считывания слитного белка подтверждали секвенированием. Белковый состав лизатов клонов рекомбинантного штамма-производителя *E.coli* PLT90 исследовали методами электрофореза в SDS-полиакриламидном геле и вестерн-блоттинга с пулом образцов сывороток крови, содержащих IgG к ВГЕ (рис. 2). В качестве положительного контрольного образца использовали ранее полученный [3] рекомбинантный белок, содержащий С-концевой фрагмент белка ORF3 ВГЕ 1 генотипа (штамм Бирма), в качестве контроля специфичности реакции — лизат биомассы штамма *E.coli* PLT90, трансформированного векторной плазмидой без вставки вирусоспецифической ДНК. Несмотря на специфическое

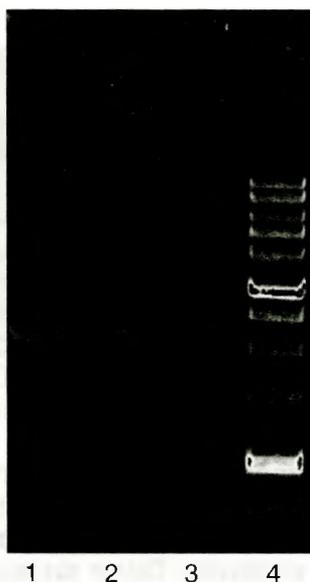


Рис. 1. Электрофорез ПЦР-продуктов в 0,8% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

Дорожки: 1, 2 — ПЦР-продукты, 3 — отрицательный контроль (ПЦР без ДНК), 4 — маркеры молекулярных масс (сверху вниз: 10 000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 500 пар нуклеотидных остатков).

взаимодействие с положительными сыворотками в реакции вестерн-блоттинга, в лизате биомассы полученного штамма-продуцента рекомбинантный антиген присутствовал в недостаточном для препаративного выделения количестве.

Для увеличения продукции рекомбинантных белков в бактериальных системах экспрессии в настоящее время широко применяется метод оптимизации кодонов, в котором используется подход синонимичных (без изменения кодируемой аминокислоты) замен соответствующих триплетов [8]. С целью повышения уровня синтеза слитного белка в клонированном фрагменте гена *orf3* была проведена замена 51 триплета нуклеотидов на более часто встречающиеся в бактериях *E. coli* синонимичные кодоны. Фрагмент ДНК с оптимизированными кодоном *orf3s*, синтезированный в Институте биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, переклонировали в экспрессирующий вектор *pEL5a* по схеме, аналогичной примененной для клонирования фрагмента гена *orf3* дикого штамма вируса. Наличие вставки и рамки считывания слитного белка было подтверждено секвенированием.

Рекомбинантные клоны *E. coli*, полученные после проведения оптимизации кодонов, были вновь протестированы на способность синтезировать целевой белок. На рис. 2 представлены результаты электрофоретического анализа белкового состава лизатов биомасс рекомбинантных штаммов *E. coli* до и после оптимизации кодонов и результаты исследования методом вестерн-блоттинга взаимодействия рекомбинантного белка в составе лизатов с пулом сывороток больных ГЕ.

Степень очистки рекомбинантного антигена ORF3 и β -галактозидазы *E. coli* контролировалась на отдельных стадиях процесса выделения с помощью электрофореза в 10% SDS-полиакриламидном геле. Исследование фракций

белка после хроматографической очистки подтвердило отделение рекомбинантных полипептидов от основной массы примесных белков (рис. 3А). Тестирование антигенной активности полученных фракций белка методом ИФА показало снижение оптической плотности в лунках с иммобилизованным рекомбинантным белком ORF3 в реакциях с пулом положительных по ВГЕ сывороток и рост неспецифического сигнала с пулом отрицательных (донорских) сывороток в 11 — 13 фракциях (рис. 3В). Для дальнейшей работы использовали лучшие по показателям двух методов фракции.

Молекулярная масса полученного рекомбинантного белка, определенная по ре-

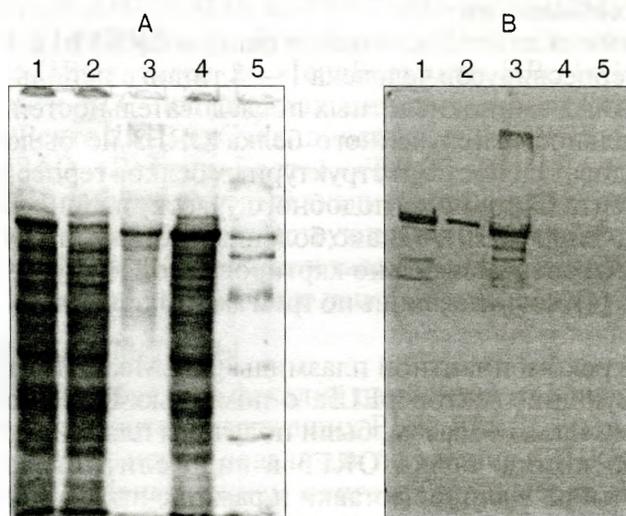


Рис. 2. Электрофорез в 10% SDS-полиакриламидном геле (А) и вестерн-блоттинг с пулом сывороток крови больных ГЕ (В).

1, 2 — лизаты культур клонов *E. coli* POP2136, экспрессирующих рекомбинантный полипептид ORF3 после (1) и до (2) оптимизации кодонов; 3 — ранее полученный рекомбинантный полипептид ORF3 ВГЕ штамма Бирма (92 — 123 а.о.); 4 — лизат клеток POP2136, трансформированных плазмидой *pEX1* без вставки; 5 — маркеры молекулярных масс (193, 112, 64, 30, 26, 12,8, 6,5 кД).

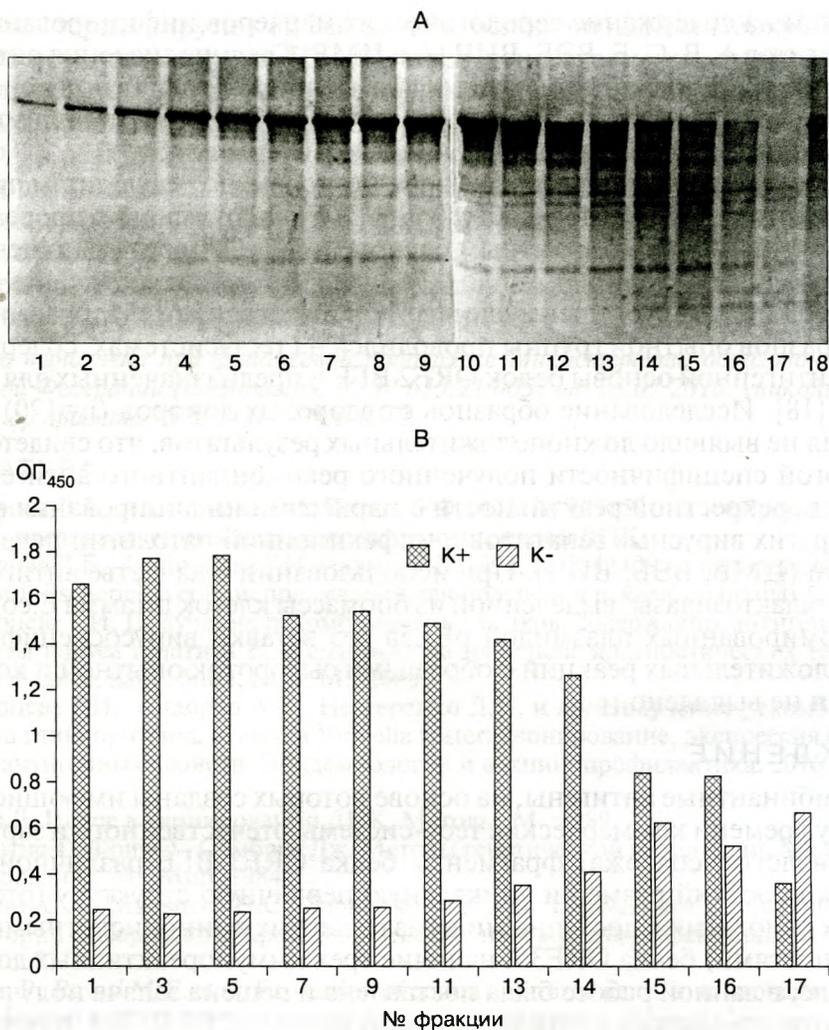


Рис. 3. Результаты тестирования методами электрофореза в SDS-полиакриламидном геле (А) и иммуноферментного анализа (В) фракций рекомбинантного белка ORF3 ВГЕ 1 генотипа после хроматографической очистки.

К+ пул сывороток крови больных ГЕ; К- пул сывороток крови здоровых доноров.

Результатам электрофоретического профиля лизатов штамма-продуцента и препаратов выделяемого из них целевого продукта, составила 128,5 кДа, что соответствует расчетной величине. Продуктивность штамма составила не менее 500 мкг рекомбинантного белка на 1 мл клеточной суспензии при плотности культуры 5×10^8 кл/мл, степень очистки белка по данным электрофореза — 95%.

Для оценки антигенной специфичности полученного рекомбинантного белка ORF3 ВГЕ 1 генотипа были сформированы контрольные панели образцов сывороток крови, протестированных с помощью коммерческих

Исследование рекомбинантного антигена ORF3 ВГЕ 1 генотипа методом ИФА

Серологические маркеры инфекционной патологии печени в обследуемых образцах сывороток	Количество исследованных образцов	Средняя величина оптической плотности при $\lambda=450$ нм, ОП _{сред} (M \pm m)
IgG к ВГЕ	50	0,334 \pm 0,02
IgG к ВГА	15	0,030 \pm 0,003
HBsAg, IgG к HBcAg	18	0,027 \pm 0,001
IgG к ВГС	15	0,027 \pm 0,002
IgG к ВИЧ-1	20	0,068 \pm 0,004
IgG к ВЭБ	15	0,052 \pm 0,004
IgG к ЦМВ	15	0,072 \pm 0,006

тест-систем на содержание серологических маркеров инфицирования вирусами гепатитов А, В, С, Е, ВЭБ, ВИЧ $1/2$ и ЦМВ. Средние значения оптической плотности в обследованных методом ИФА группах образцов при использовании в качестве антигена рекомбинантного белка ORF3, иммобилизованного в лунках полистироловых планшетов, представлены в табл.

84% обследованных образцов сывороток крови, по результатам предварительного тестирования содержащих IgG к ВГЕ, положительно прореагировали с полученным рекомбинантным белком ORF3. Относительно невысокую оптическую плотность (от 0,210 до 0,763 о.е./мл) можно объяснить тем, что белок ORF3 индуцирует преимущественно образование IgM и ранних IgG, а отбор образцов опытной группы проводился на тест-системах, содержащих в составе антигенной основы белок ORF2 ВГЕ и предназначенных для выявления IgG [18]. Исследование образцов от здоровых доноров (n=120) и групп сравнения не выявило ложноположительных результатов, что свидетельствует о строгой специфичности полученного рекомбинантного антигена и отсутствии перекрестной реактивности с маркерами инфицирования возбудителями других вирусных гепатитов и инфекционной патологии печени иной этиологии (ЦМВ, ВЭБ, ВИЧ). При использовании в качестве антигена препарата β -галактозидазы, выделенной из биомассы клеток штамма E.coli PLT90, трансформированных плазмидой pEL5a без вставки вирусоспецифической ДНК, положительных реакций с образцами сывороток опытной и контрольных групп не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные антигены, на основе которых созданы имеющиеся к настоящему времени коммерческие тест-системы отечественного и зарубежного производства, содержат фрагменты белка ORF3 ВГЕ различной длины. Учитывая короткий размер и уникальную первичную структуру (отсутствие заметных гомологий с доступными в базах данных аминокислотными последовательностями) белка ORF3 и наличие трех иммунореактивных доменов в его составе, в данной работе была поставлена и решена задача получения рекомбинантного аналога полноразмерного белка ORF3 ВГЕ 1 генотипа. По результатам анализа профиля гидропатичности гидрофобный участок ORF3, а именно его N-концевая область, должен содержать основную часть антигенных детерминант, однако прогноз, сделанный с помощью данного метода, не совсем совпадает с результатами экспериментов по картированию эпитопов, согласно которым именно в С-концевой области данного белка локализован основной иммунодоминантный домен [21]. Несоответствие литературных данных и результатов биоинформационного анализа служит дополнительным аргументом в пользу важности и необходимости получения полноразмерного рекомбинантного антигена ORF3. Предполагаемая некоторыми авторами возможность конформационной «маскировки» эпитопов в составе рекомбинантных аналогов полноразмерного белка ORF3 [12] в данном случае не должна иметь места, поскольку применяемая процедура очистки белка из нерастворимых телец-включений содержит этапы денатурации. В первичной структуре полученного рекомбинантного белка выявлена одна аминокислотная замена, затрагивающая N-концевой иммунодоминантный домен, что может приводить к штаммоспецифичной вариабельности антигенных свойств ВГЕ и свидетельствовать об уникальности антигена, полученного на основе природного изолята вируса. Поскольку в научной литературе имеются сообщения о перекрестной иммунореактивности при выявлении антител к ВГЕ и

некоторым герпесвирусам (ВЭБ, ЦМВ), осложняющей интерпретацию результатов серодиагностики ГЕ [10], проведено сравнение аминокислотных последовательностей полученного белка и белков герпесвирусов, показавшее отсутствие протяженных гомологичных участков. Методами иммуноблоттинга и ИФА в реакциях с сыворотками крови больных ГЕ и групп сравнения, включающими образцы с маркерами инфицирования ЦМВ и ВЭБ, показана антигенная специфичность полученного рекомбинантного полипептида. Однако для более надежного обоснования возможности применения в диагностических тестах требуется дополнительное расширенное и более детальное исследование его иммунореактивных свойств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.613.21.0057 от 28.07.2016, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61316X0057).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ, 1992, № 2071501 на изобретение «Вектор рEL5a, предназначенный для экспрессии чужеродной ДНК».
2. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ, 1992, № 2043409 на изобретение «Штамм бактерий *Escherichia coli*, используемый для получения рекомбинантных белков».
3. Алаторцева Г.И. Получение рекомбинантных белков, содержащих антигенные детерминанты вируса гепатита Е, и создание на их основе диагностических тест-систем: Автореф. дисс. канд. биол. наук. М., 2000.
4. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Получение рекомбинантного аналога гликопротеина е вируса *Varicella zoster*: клонирование, экспрессия и исследование антигенных свойств. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 15, 1 (86): 77-85.
5. Гловер Д. Новое в клонировании ДНК. Методы. М., 1989.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
7. Солонин С.А., Мальцева Н.С., Троценко О.Е. и др. Циркуляция вируса гепатита Е на территории Хабаровского края. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2010, 16: 31-36.
8. Claudia P., Ravasi M.E. et al. Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives. *Front. Microbiol.* 2014, 5: 2-8.
9. Graff J., Torian U. et al. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* 2006, 80: 5919-5926.
10. Hyams C., Mabayoje D.A., Copping R. et al. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J. Med. Virol.* 2014, 86 (3): 478-483.
11. Khudyakov Y.E., Khudyakova N.S., Fields H.A. et al. Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus. *Virology.* 1993, 194 (1): 89-96.
12. Khudyakov Y.E., Khudyakova N.S., Jue D.L. et al. Comparative characterization of antigenic epitopes in the immunodominant region of the protein encoded by open reading frame 3 in burmese and mexican strains of hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 1994, 75 (3): 641-646.
13. Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A. et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992, 89 (17): 8259-8263.
14. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings Bioinformatics.* 2004, 5: 150-163.
15. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1983, 157 (1): 105-132.
16. Ma H., Song X., Li Z. et al. Varying abilities of recombinant polypeptides from different regions of hepatitis E virus ORF2 and ORF3 to detect anti-HEV immunoglobulin M. *J. Med. Virol.* 2009, 81 (6): 1052-1061.
17. Nair V.P., Anang S., Subramani C. et al. Endoplasmic reticulum stress induced synthesis of a

- novel viral factor mediates efficient replication of genotype-1 hepatitis E. PLoS Pathol. 2016, 12 (4): e1005521.
18. Obriadina A., Meng J.H., Ulanova T. et al. A new enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus. J. Gastroenterol Hepatol. 2002, Suppl 3: 360-364.
 19. Resenchuk S.M., Blinov V.M. Alignment service: creation and processing of alignments of sequences of unlimited length. Comput. Appl. Biosci. (CABIOS). 1995, 11 (1): 7-11.
 20. Towbin H., Staehlin T., Gordon Y. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979, 76 (9): 4350-4359.
 21. Yarbough P.O., Tam A.W., Fry K.E. et al. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. J. Virol. 1991, 65 (11): 5790-5797.
 22. Yonglin Yang, Shaoli Lin, Yuchen Nan et al. A linear surface epitope in a proline-rich region of ORF3 product of genotype 1 hepatitis E virus. Viruses. 2016, Aug 18;8 (8): pii: E227.
 23. Zhou Y., Zhao C., Tian Y. et al. Characteristics and functions of HEV proteins. Adv. Exp. Med. Biol. 2016, 948: 17-38.

Поступила 05.07.17

Контактная информация: Алаторцева Галина Ивановна, к.б.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)674-77-95

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Г.И.Алаторцева¹, А.В.Сидоров¹, Л.Н.Нестеренко¹, Л.Н.Лухверчик¹,
В.В.Доценко¹, И.И.Амиантова¹, В.Ю.Кабаргина¹, А.В.Милованова¹,
Д.С.Воробьев¹, Ю.И.Аммур¹, В.М.Блинов¹, А.З.Нурматов³,
З.Ш.Нурматов³, Д.А.Байытбекова³, О.Т.Касымов³,
К.К.Кюрегян^{1,2}, М.И.Михайлов^{1,2}, С.В.Жаворонок⁴, В.В.Зверев¹*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА КАПСИДНОГО БЕЛКА ВИРУСА ГЕПАТИТА Е 1 ГЕНОТИПА: КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА, ОЦЕНКА АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия; ³НПО «Профилактическая медицина», Бишкек, Кыргызская Республика; ⁴Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Цель. Разработка рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита Е (ВГЕ) 1 генотипа и исследование его антигенных свойств. *Материалы и методы.* Штаммы *Escherichia coli*, плазмидные векторы, серологический и клинический материал, иммуноферментные тест-системы. Молекулярно-биологические, биоинформационные, биотехнологические, биохимические и серологические методы. *Результаты.* С использованием рекомбинантной плазмиды, содержащей ДНК-копию субгеномной бицистронной РНК ВГЕ 1 генотипа, получен штамм *E.coli* — продуцент рекомбинантного антигена ORF2, содержащего С-концевой фрагмент капсидного белка ВГЕ в виде слитного с β-галактозидазой *E.coli* полипептида. Рекомбинантный белок выделен из телец включений биомассы штамма-продуцента и очищен методом эксклюзионной хроматографии. С помощью вестерн-блоттинга показано взаимодействие полученного полипептида с пулом сывороток крови больных гепатитом Е (ГЕ). Антигенная специфичность белка подтверждена методом иммуноферментного анализа с сыворотками крови больных ГЕ и реконвалесцентов и групп сравнения: здоровых доноров, больных гепатитами А, В, С, ВИЧ-инфицированных, больных инфекционным мононуклеозом и цитомегаловирусной инфекцией. *Заключение.* Разработан рекомбинантный антиген ORF2 ВГЕ 1 генотипа и экспериментально показана возможность его применения в диагностических тестах.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 72—80

Ключевые слова: вирус гепатита E, ВГЕ 1 генотипа, ген *orf2*, капсидный белок, рекомбинантный антиген ORF2, ИФА, вестерн-блоттинг

G.I. Alatorseva¹, A.V. Sidorov¹, L.N. Nesterenko¹, L.N. Luhverchik¹, V.V. Dotsenko¹, I.I. Amiantova¹, V. Yu. Kabargina¹, A.V. Milovanova¹, D.S. Vorobev¹, Yu. I. Ammur¹, V.M. Blinov¹, A.Z. Nurmatov³, Z.Sh. Nurmatov³, D.A. Baiyzbekova³, O.T. Kasymov³, K.K. Kyuregyan^{1,2}, M.I. Mikhailov^{1,2}, S.V. Zhavoronok⁴, V.V. Zverev¹

DESIGN OF HEPATITIS E VIRUS GENOTYPE 1 RECOMBINANT CAPSID PROTEIN: CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION, EVALUATION OF THE ANTIGENIC PROPERTIES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia; ³Scientific Production Association «Preventive Medicine», Bishkek, Kyrgyz Republic; ⁴Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Aim. The development of the hepatitis E virus (HEV) genotype 1 recombinant capsid protein. *Materials and methods.* *Escherichia coli* strains, plasmid vectors, serological and clinical samples, ELISA reagent kits, molecular biological, bioinformatic, biotechnological, biochemical and serological methods. *Results.* Using HEV genotype 1 DNA copy of subgenomic virus RNA we made *E. coli* strains producing recombinant capsid protein, containing C-terminal fragment of ORF2 protein fused to *E. coli* beta-galactosidase. Recombinant protein ORF2 had been isolated from the inclusion bodies of the *E. coli* biomass and purified by size exclusion chromatography. By Western blotting it had been shown specific interaction of the recombinant polypeptide with anti-HEV IgG from pool of positive sera. Antigenic specificity of the recombinant polypeptide had been confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay with sera of hepatitis E patients and reference groups: healthy donors, patients with hepatitis A, B, C, infectious mononucleosis and cytomegalovirus infection, HIV-infected patients. *Conclusion.* HEV genotype 1 ORF2 recombinant antigen had been developed, and its possible use in diagnostic tests had been experimentally shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 72—80

Key words: hepatitis E virus, genotype 1 HEV, *orf2* gene, capsid protein, recombinant ORF2 antigen, ELISA, Western blotting

ВВЕДЕНИЕ

Осуществление эпидемиологического надзора за гепатитом E (ГЕ) невозможно без применения диагностических тестов для определения специфических серологических маркеров инфекции. Сложный антигенный состав, генетическая неоднородность ВГЕ и особенности эпидемиологии ГЕ в разных географических регионах требуют совершенствования методов серодиагностики.

Наибольшую диагностическую ценность имеет кодируемый геном *orf2* капсидный белок ORF2 ВГЕ с молекулярной массой 72 kDa. Являясь основным структурным компонентом вирусной частицы, белок ORF2 ВГЕ содержит мажорные антигенные детерминанты вируса и отвечает за индукцию протективного гуморального иммунного ответа организма-хозяина. Иммунодоминантный домен в структуре белка ORF2, содержащий взаимодействующие со специфическими IgG и IgM эпитопы, локализован в С-концевом участке белка, по данным разных исследователей в области с 454 по 606 а.о. [12] или с 432 по 660 а.о. [13]. По результатам изучения мутантных форм ВГЕ этот домен включен в процесс связывания вируса с чувствительными клетками и содержит нейтрализующие эпитопы [18].

Трудности, связанные с выделением протяженных фрагментов геномной РНК из вирусосодержащего клинического материала и малоэффективным культивированием ВГЕ, объясняют использование многими авторами для разработок рекомбинантных антигенов синтетических аналогов фрагментов вирусного генома, содержащих теоретически рассчитанные нуклеотидные последовательности, кодирующие иммунодоминантные области диагностически значимых белков ВГЕ определенных генотипов [16]. Однако данная стратегия не всегда способствует получению белкового продукта, в полной мере обладающего свойствами природного антигена, поэтому в настоящей работе в качестве источника материала для клонирования нами были использованы клинические образцы от больного из эндемичного региона с лабораторно подтвержденным диагнозом ГЕ.

ВГЕ 1 генотипа, вызывающий у человека заболевание с тяжелыми клиническими проявлениями, циркулирует на территории стран с жарким климатом, включая государства Центральной Азии, расположенные на бывшей территории СССР. Применение антигенов ВГЕ 1 генотипа для создания диагностических тест-систем является актуальным в связи с существующей угрозой более широкого распространения данного генотипа вируса из-за увеличения международной трудовой миграции. В данной работе была поставлена задача получения не имеющего коммерческих аналогов рекомбинантного антигена, содержащего С-концевой фрагмент белка ORF2 циркулирующего на территории СНГ штамма ВГЕ 1 генотипа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Праймеры и пробы для ПЦР и секвенирования синтезировали в Институте биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова. Выделенную из фекальных экстрактов РНК использовали в реакции обратной транскрипции для получения ДНК-копии (кДНК) с применением обратной транскриптазы SuperScript III («Life Technologies», США) и dT18-праймеров. кДНК амплифицировали высокоточной ДНК-полимеразой «Phusion» («Finzymes», Финляндия) с использованием специфических праймеров. Реакции проводили на термоциклере «TProfessional Gradient» («Biotetra», Германия).

ПЦР-продукты выделяли из агарозных гелей после электрофоретического разделения ампликонов, затем проводили еще один цикл ПЦР-амплификации с Taq-полимеразой, полученные ПЦР-продукты очищали на колонках Евроген и использовали в А/Т-клонировании. Лигирование полученных ДНК-вставок в плазмидные векторы pGEM-Teasy («Promega», США) и pEL5a [1] и трансформацию компетентных клеток *E.coli* CC001 генотипа XL-Blue (ООО «Евроген», Россия) и штамма *E.coli* PLT90 (F-, lon::Tn10(TetR), endA1, malPpa::[PR, C1857] (Mal-, λimm) thi, hsdR17) [2] лигазной смесью или рекомбинантными плазмидами выполняли по общепринятому методу [7].

Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов ДНК определяли проводили в Институте биоорганической химии. Для анализа и обработки нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайна праймеров использовали пакеты программ «Vector NTI», AS [14] и MEGA [10]. Потенциальные иммунодоминантные участки вирусных белков определяли по результатам расчета гидрофильных и гидрофобных профилей [11]. Анализ коротких пептидных гомологий между ВГЕ 1 генотипа и герпесвирусами человека 1 — 8 типов проводили, используя ранее описанные алгоритмы [9].

Получение биомасс культур клеток *E.coli* PLT90, трансформированных

векторной или рекомбинантными плазмидами, выделение и очистку рекомбинантных полипептидов проводили по ранее опубликованным методикам [4 — 6].

В работе использовали сыворотки крови и фекалии больных гепатитом E из инфекционных больниц г. Ош (Киргизия) и сыворотки крови больных гепатитом E, предоставленные БГМУ (Минск, Беларусь). Сыворотки крови условно здоровых лиц и контрольной группы (содержащие серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов A, B, C и инфекционных патологий печени иной этиологии: инфекционный мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ-инфекция) были получены из МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского и Клинико-диагностического центра НИИВС им. И.И.Мечникова (Москва). В качестве положительного контрольного образца использовали рекомбинантный полипептид ORF2 ВГЕ штамма Бирма из коллекции Лаборатории клонирования вирусных геномов НИИВС им. И.И.Мечникова [3]. IgG к ВГЕ в образцах сывороток крови выявляли с помощью иммуноферментной тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы»). Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов A, B, C и возбудителями инфекционной патологии печени иной этиологии определяли с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем (см. предыдущую статью этих авторов в номере).

Результаты электрофореза документировали и анализировали на приборе «Gel Doc» (BioRad, США).

Вестерн-блоттинг и твердофазный непрямой иммуноферментный анализ проводили с помощью ранее описанных методик [4, 15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На матрице РНК ВГЕ, выделенной от больного с лабораторно подтвержденным диагнозом GE из Киргизии, с использованием олиго-dT-праймеров получена ДНК-копия. С помощью специфических праймеров проведена ПЦР-амплификация с последующим А/Т клонированием и получением клонов *E.coli* ССО01 (XL-Blue), содержащих в составе рекомбинантной плазмиды фрагменты ДНК-копии бицистронной субгеномной РНК ВГЕ 1 генотипа размером 2,3 т.п.н. При сравнении нуклеотидных последовательностей полученных клонов с последовательностью соответствующего участка генома референсного штамма ВГЕ 1 генотипа (NCBI AB369689) обнаружено множество (более 60) точечных мутаций, что свидетельствует о высокой вариабельности генома ВГЕ и возможности существования более широкого спектра серовариантов вируса, чем это предполагалось ранее. Так, сравнительный анализ аминокислотных последовательностей полноразмерного *orf2* продукта клонированного фрагмента кДНК и референсного штамма ВГЕ выявил 8 аминокислотных замен, в том числе одну (Ile₅₁₉ на Thr₅₁₉) в С-концевом участке, выбранном для получения рекомбинантного антигена. Соответствующий ему фрагмент гена *orf2*, кодирующий последовательность капсидного белка с 406 по 660 а.о., был выбран по результатам анализа литературных дан-

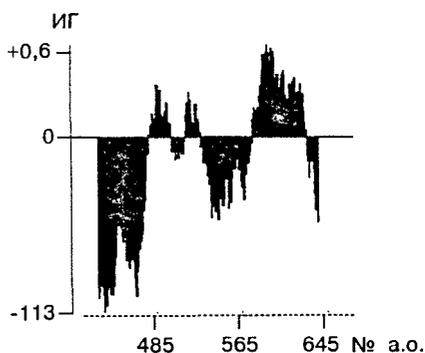


Рис. 1. Профиль гидрофильности/гидрофобности выбранного фрагмента белка ORF2, рассчитанный по индексу гидропатичности (ИГ).

ных и исследования профиля гидрофобности/гидрофильности капсидного белка, рассчитанного по индексу гидропатичности [11] (рис. 1).

Группой авторов установлена высокая перекрестная иммуореактивность используемых в диагностических тест-системах антигенов при выявлении IgM к ВГЕ и некоторым герпесвирусам (вирусу Эпштейна-Барр, цитомегаловирусу), что существенно осложняет интерпретацию результатов серодиагностики острого ГЕ [8]. Поэтому для исключения возможности перекрестных реакций антигенных детерминант рекомбинантного полипептида и белков герпесвирусов был проведен анализ коротких пептидных гомологий мотивов потенциальных линейных эпитопов между выбранным фрагментом капсидного белка ВГЕ 1 генотипа и белками герпесвирусов человека 1 — 8 типов. Поиск и множественное сравнение соответствующих мотивов по доступным в базах данных аминокислотным последовательностям показали отсутствие значимых гомологий.

Клонированный фрагмент ДНК использовали в качестве ДНК-матрицы для получения рекомбинантного антигена ORF2 ВГЕ 1 генотипа в системе экспрессии *E.coli*. Для этого были сконструированы праймеры, фланкирующие переклонированную последовательность и содержащие на 5'-концах сайты рестрикции: *Bam*HI (прямой праймер) и *Pst*I (обратный праймер), искомым фрагмент амплифицировали с помощью высокоточной полимеразы *Phusion* и клонировали в вектор *pEL5a* с последующей трансформацией клеток *E.coli* *PLT90* и селекцией клонов на устойчивость к ампициллину. Наличие вставки фрагмента ДНК-копии гена *orf2* в составе рекомбинантной плазмиды и рамки считывания белка, содержащего слитный с β -галактозидазой *E.coli* C-концевой фрагмент белка ORF2, подтверждали с помощью рестрикционного анализа (рис. 2) и последующего секвенирования.

Клоны штаммов-продуцентов культивировали в условиях термоиндукции синтеза рекомбинантного белка. По результатам контроля уровня синтеза целевого продукта в лизатах культур методами электрофореза и вестерн-блоттинга с пулом сывороток крови больных ГЕ отобрали клон с максимальной продукцией рекомбинантного белка.

Для получения рекомбинантного белка ORF2 и дальнейшего изучения его антигенных свойств была использована методика выделения рекомбинантных белков из биомассы бактерий *E.coli*, включающая разрушение клеток, отмывку телец включений, их солюбилизацию и последующую очистку с помощью эксклюзионной хроматографии. Результаты хроматографической очистки рекомбинантного белка ORF2 анализировали, изучая электрофоретический профиль белкового состава полученных фракций, а также оценивая специфическую активность фракций методом ИФА с пулом сывороток крови больных ГЕ и пулом отрицательных сывороток, полученных от здоровых доноров

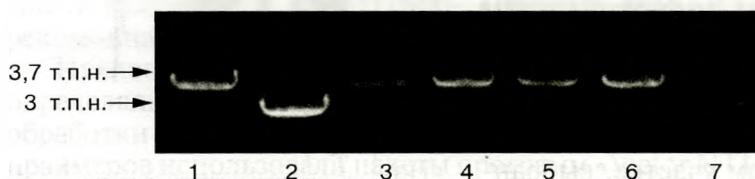


Рис. 2. Электрофорез в 0,8 % агарозном геле ДНК плазмид, обработанных рестриктазой *Bam*HI.

Представлены линейные формы плазмид, содержащих (дорожки №№ 1, 3, 4, 5, 6) и не содержащих (дорожки №№ 2, 7) вставку ДНК-копии гена *orf2* размером 0,75 т.п.н.

(рис. 3). В исследуемых пробах фракций оценивали весь спектр белков, концентрацию суммарного белка, а также количество целевого продукта относительно суммарного белка. При объединении фракций учи-

ывались образцы, содержащие наибольшее количество целевого белка и проявляющие наиболее выраженную антигенную специфичность при взаимодействии со специфическими и контрольными образцами сывороток. В результате был получен рекомбинантный белок, молекулярная масса которого, оцененная с помощью электрофореза, соответствовала величине (144,1 кДа), теоретически рассчитанной с помощью программы Vector-NTI.

Оценка антигенных свойств полученного рекомбинантного белка ORF2 была проведена с применением нескольких предварительно сформированных контрольных панелей образцов сывороток крови: от больных ГЕ и реконвалесцентов, здоровых доноров, больных гепатитами А, В, С, ВИЧ-инфицированных, больных инфекционным мононуклеозом (ИМ) и цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ). По результатам предварительного тестирования, проведенного с помощью коммерческих тест-систем, все отобранные образцы от пациентов с ГЕ и реконвалесцентов содержали IgG к ВГЕ, образцы из групп сравнения были отрицательными на антитела к ВГЕ и содержали соответствующие серологические маркеры возбудителей инфекционной патологии печени

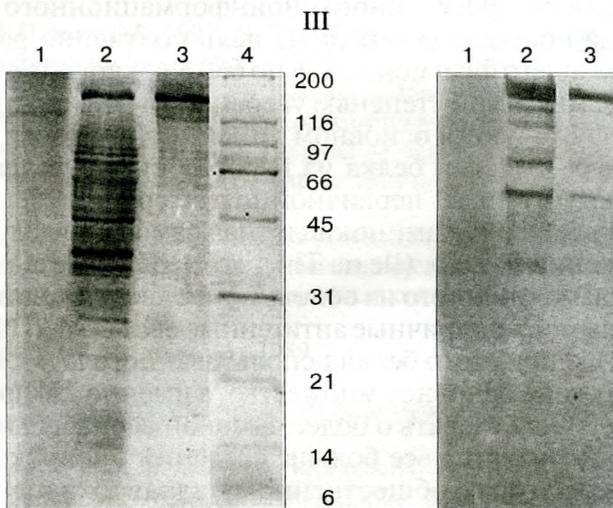
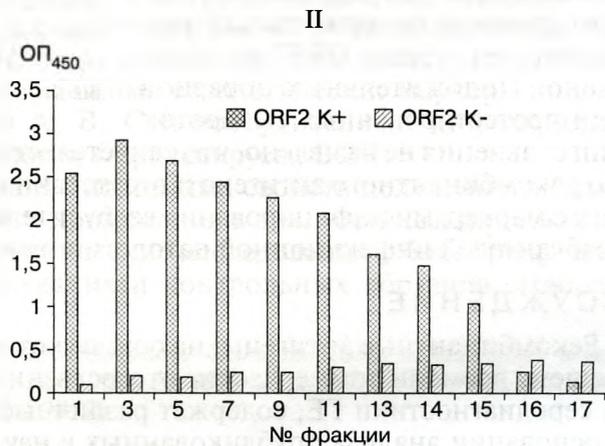
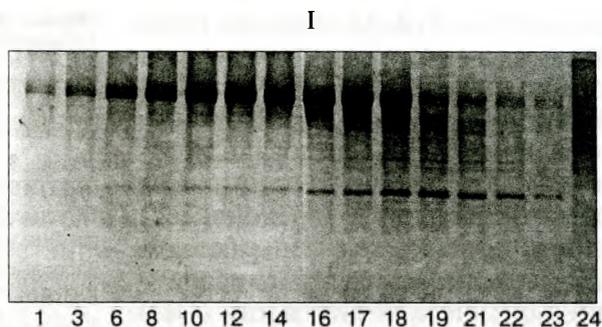


Рис. 3. Результаты тестирования фракций рекомбинантного белка методами электрофореза в SDS-полиакриламидном геле (I; дорожки: 1 — 23 — фракции после хроматографической очистки, 24 — растворенные тельца включения перед хроматографией) и иммуноферментного анализа (II) (ORF2 K+ пул сывороток крови больных ГЕ; ORF2 K- пул сывороток крови здоровых доноров); анализ (III; дорожки: 1 — β -галактозидаза *E.coli*, 2 — лизат биомассы штамма-продуцента рекомбинантного полипептида ORF2, 3 — рекомбинантный белок ORF2, 4 — маркеры мол. масс, kDa) очищенного рекомбинантного белка ВГЕ 1 генотипа с помощью электрофореза в SDS-полиакриламидном геле (III, слева) и вестерн-блоттинга (III, справа) с пулом сывороток больных ГЕ.

(HBsAg, IgG к HBsAg, вирусам гепатитов А и С, вирусу Эпштейна-Барр, цитомегаловирусу, ВИЧ-1). Взаимодействие образцов с рекомбинантным белком ORF2 исследовали методом ИФА в непрямом формате. Все пробы от больных ГЕ и реконвалесцентов при взаимодействии с белком ORF2 были положительными, и величина оптической плотности (ОП) колебалась от 0,350 до 2,820. В образцах от здоровых доноров специфических антител к белку ORF2 не обнаружено. Положительных образцов среди протестированных сывороток

групп сравнения не выявлено, что свидетельствует о специфичности полученного рекомбинантного антигена и отсутствии перекрестной иммунореактивности с маркерами инфицирования возбудителями других вирусных гепатитов и возбудителей инфекционной патологии печени иной этиологии (табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные антигены, на основе которых созданы имеющиеся к настоящему времени коммерческие отечественные и зарубежные тест-системы для серодиагностики ГЕ, содержат различные фрагменты белка ORF2 ВГЕ. На основании анализа опубликованных в научной литературе данных и результатов проведенного биоинформационного исследования в данной работе была поставлена и решена цель получения рекомбинантного антигена, содержащего фрагмент с 406 по 660 а.о. капсидного белка ORF2 ВГЕ 1 генотипа. С достаточной степенью уверенности можно предположить, что в его составе присутствуют в основном линейные эпитопы, поскольку применяемая процедура очистки белка из нерастворимых телец включений содержит этапы денатурации. В первичной структуре полученного рекомбинантного белка выявлена одна аминокислотная замена в иммунодоминантном домене в положении 519 а.о. (Ile на Thr), которая свидетельствует об уникальности антигена, полученного на основе природного изолята вируса и может влиять на его штаммоспецифичные антигенные свойства. В N-концевом фрагменте (1 — 290 а.о.) капсидного белка использованного для клонирования штамма было обнаружено основное множество, а именно 7 аминокислотных замен, что может свидетельствовать о более высокой вариабельности этого участка белка.

Появляется все больше сведений о широком спектре хозяев ВГЕ, создающем угрозу общественному здравоохранению в глобальном масштабе. Результаты экспериментов по исследованию взаимодействия рекомбинантных антигенов ВГЕ 1 и 3 генотипов с гомологичными и гетерологичными специфическими антителами показали, что эпитопы С-концевого иммунодоминантного домена отвечают за генотип-специфичную иммунореактивность антигена ORF2 [13]. С другой стороны, в экспериментах по подробному картированию эпитопов в составе С-концевого участка ORF2 показано наличие двух линейных В-клеточных эпитопов в области 411 — 415 а.о. и 427 — 430 а.о. общих для штаммов ВГЕ различных генотипов, хозяевами которых являются птицы, свиньи или человек [17]. Полученный в настоящей работе рекомбинантный белок обладает антигенной специфичностью ВГЕ 1 гено-

Оценка антигенной специфичности рекомбинантного антигена ORF2 ВГЕ методом ИФА

Исследуемая группа	Количество исследованных образцов	Средняя величина оптической плотности при $\lambda=450$ нм, ОП _{сред.} (M \pm m)
Больные ГЕ и реконвалесценты	50	1,105 \pm 0,113
Здоровые доноры	120	0,072 \pm 0,009
Больные ГА	15	0,115 \pm 0,013
Больные ГВ	18	0,072 \pm 0,009
Больные ГС	15	0,057 \pm 0,008
ВИЧ-инфицированные	20	0,069 \pm 0,012
Больные ИМ	15	0,106 \pm 0,027
Больные ЦМВИ	15	0,072 \pm 0,009

типа — источника антропоноза, тем не менее, наличие в его структуре общих для разных генотипов вируса эпитопов обеспечивает возможность применения не только в медицинской практике, но также в ветеринарии и, с большой долей вероятности, для изучения циркуляции вируса среди широкого спектра его природных резервуаров.

В научной литературе имеются сообщения о перекрестной иммунореактивности при выявлении антител к ВГЕ и некоторым герпесвирусам (ВЭБ, ЦМВ), осложняющей интерпретацию результатов серодиагностики ГЕ [8]. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей полученного белка и белков герпесвирусов не выявил гомологий, что теоретически свидетельствует об отсутствии идентичных эпитопов в их составе. Методом ИФА показано взаимодействие полученного рекомбинантного полипептида с сыворотками крови больных ГЕ и реконвалесцентов и отсутствие кросс-реактивности с образцами, содержащими серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и возбудителями инфекционной патологии печени другой этиологии (герпесвирусы, ВИЧ).

Для более глубокого изучения антигенных свойств полученного белка и подтверждения возможности его применения в диагностических тестах планируются дальнейшие иммунологические исследования с более репрезентативными выборками специфических и контрольных образцов сывороток крови людей и животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.613.21.0057 от 28.07.2016, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61316X0057).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ, 1992, № 2071501 на изобретение «Вектор рEL5a, предназначенный для экспрессии чужеродной ДНК».
2. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ, 1992, № 2043409 на изобретение «Штамм бактерий *Escherichia coli*, используемый для получения рекомбинантных белков».
3. Алаторцева Г.И., Гринев А.А., Амиантова И.И. и др. Получение рекомбинантных полипептидов, содержащих антигенные детерминанты вируса гепатита Е. Вопросы вирусологии. 1998, 43 (6): 266-269.
4. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Получение рекомбинантного аналога гликопротеина е вируса *Varicella zoster*: клонирование, экспрессия и исследование антигенных свойств. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 15, 1 (86): 77-85.
5. Гловер Д. Новое в клонировании ДНК. Методы. М., 1989.
6. Практическая химия белка. М., 1989.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
8. Huams C., Mabayoje D.A., Copping R. et al. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. J. Med. Virol, 2014, 86 (3): 478-483.
9. Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A. et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992, 89 (17): 8259-8263.
10. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics. 2004, 5: 150-163.
11. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. 1983, 157 (1): 105-132.
12. Li S.W., Zhang J., He Z.Q. et al. Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid. J. Biol. Chem. 2005, 280 (5): 3400-3406.

13. Osterman A. et al. Systematic screening for novel, serologically reactive Hepatitis E Virus epitopes. *Virology J.* 2012, 9: 28-32.
14. Resenchuk S.M., Blinov V.M. Alignment service: creation and processing of alignments of sequences of unlimited length. *Comput. Appl. Biosci. (CABIOS).* 1995, 11 (1): 7-11.
15. Towbin H., Staehlin T., Gordon Y. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979, 76 (9): 4350-4359.
16. Ulanova T.I., Obriadina A.P., Talekar G. et al. A new artificial antigen of the hepatitis E virus. *J. Immunoassay Immunochem.* 2009, 30 (1): 18-39.
17. Xinjie Wang, Qin Zhao, Lu Dang et al. Characterization of two novel linear B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (HEV) that are common to avian, swine, and human HEVs. *J. Virol.* 2015, 4, 89 (10): 5491-501.
18. Yamashita T., Mori Y., Miyazaki N. et al. Matsuura biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009, 106 (31): 12986-12991.

Поступила 26.07.17

Контактная информация: Алаторцева Галина Ивановна, к.б.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)674-77-95

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

О.В.Рыбальченко^{1,2}, О.Г.Орлова^{1,2}, Л.Б.Захарова¹, О.Н.Вишневецкая^{1,2}, А.Г.Марков¹

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ И ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ НА ПЛОТНЫЕ КОНТАКТЫ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫС

¹Санкт-Петербургский государственный университет, ²ГосНИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Цель. Исследование влияния пробиотических бактерий *Lactobacillus plantarum* 8PA3 и *Escherichia coli* M17 и липополисахаридов на ультраструктуру плотных контактов энтероцитов слизистых оболочек тощей кишки крыс. *Материалы и методы.* В работе применяли липополисахарид *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, Германия) и пробиотические бактерии *L. plantarum* 8PA3 и *E. coli* M17. Исследование выполняли на крысах самцах линии Wistar. Сравнительный анализ ультратонкого строения энтероцитов и плотных контактов проводили при последовательной инкубации тощей кишки крыс с пробиотическими бактериями *L. plantarum* 8PA3 и *E. coli* M17, липополисахаридами и комплексом указанных бактерий с липополисахаридами. *Результаты.* Воздействие *L. plantarum* 8PA3 на слизистую оболочку тощей кишки крыс по ряду признаков оказалось сходным с действием *E. coli* M17, что проявлялось в сохранении интактной структуры межклеточного пространства и плотных контактов. При этом обнаруженные в цитоплазме энтероцитов полые сферические включения с фрагментами бактерий, окруженных мембранами, свидетельствовали о возможности проникновения пробиотических бактерий через слизистую оболочку тощей кишки трансцеллюлярным путем. При одновременном воздействии на энтероциты тощей кишки комплекса из пробиотических бактерий с липополисахаридами деструктивных изменений в структуре плотных контактов не отмечали, однако в значительном числе случаев бактериальные клетки обнаруживались в межклеточном пространстве рядом с бокаловидными клетками. *Заключение.* Выявлен сходный характер воздействия грамположительных бактерий *L. plantarum* 8PA3 и грамотрицательных бактерий *E. coli* M17 и их комплексов с липополисахаридами на плотные контакты эпителиоцитов тощей кишки. На основании морфологического анализа высказано предположение о возможном влиянии липополисахаридов на участие пробиотических бактерий в парацеллюлярном транспорте, однако в отсутствие липополисахаридов пробиотические бактерии, возможно, проникали через слизистую оболочку тощей кишки крыс трансцеллюлярным путем.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 80—87

Ключевые слова: пробиотические бактерии, *L. plantarum* 8PA3, *E. coli* M17, липополисахариды, энтероциты, плотные контакты, транслокация

O.V.Rybalchenko^{1,2}, *O.G.Orlova*^{1,2}, *L.B.Zakharova*¹, *O.N.Vishnevskaya*^{1,2}, *A.G.Markov*¹

EFFECT OF PROBIOTIC BACTERIA AND LIPOPOLISACCHARIDES ON EPITELIOCYTES TIGHT JUNCTIONS OF RAT JEJUNUM

¹St. Petersburg State University, ²Research Institute of Highly Pure Biopreparations. St.Petersburg, Russia

Aim. The present study has been undertaken with the main objective the influence of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 8PA3 and *Escherichia coli* M17 and lipopolysaccharide on the ultrastructure of enterocytes tight junctions of mucous membranes of rat jejunum. **Materials and methods.** The study was carried out on *E. coli* lipopolysaccharide (Sigma-Aldrich, Germany) and probiotic bacteria *L. plantarum* 8PA3 and *E. coli* M17. Male Wistar rats were used. A comparative analysis of the ultrathin structure of enterocytes and tight junctions were carried out by successive incubation of rat jejunum with probiotic bacteria *L. plantarum* 8PA3 and *E. coli* M17, with lipopolysaccharide and a complex of bacteria with LPS. **Results.** The effect of *L. plantarum* 8PA3 on the mucosa of rats jejunum on a number of characters was similar to *E. coli* M17. It manifested by preservation of the intact structure of the intercellular space and tight junctions. At the same time, hollow spherical inclusions with fragments of bacteria surrounded by membranes detected in the cytoplasm of enterocytes testified to the possibility of penetration of probiotic bacteria through the mucous membrane of the jejunum by a transcellular pathway. With simultaneous action on enterocytes of rats jejunum of probiotic bacteria and lipopolysaccharide complex no destructive changes in the structure of dense contacts were observed, however, in a significant number of cases, bacterial cells were found in the intercellular space next to the goblet cells. **Conclusion.** A similar effect of Gram-positive bacteria *L. plantarum* 8PA3 and Gram-negative bacteria *E. coli* M17 and their complexes with lipopolysaccharide on the jejunum epitheliocytes was revealed. Morphological analysis showed that lipopolysaccharide might influence on paracellular transport by probiotic bacteria. In the absence of LPS, probiotic bacteria can possibly penetrate the mucosa of rats jejunum by a transcellular pathway.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 80—87

Key words: probiotic bacteria, *L. plantarum* 8PA3, *E. coli* M17, lipopolysaccharide, enterocytes, tight junctions, translocation

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям о процессе взаимодействия между микроорганизмами и клетками хозяина, пробиотические бактерии выполняют важную роль в формировании микробных сообществ в виде биопленок на поверхности практически всех открытых полостей организма человека и животных, в том числе желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [9]. Известно, что формирование биопленок представителями нормальной микрофлоры, а также патогенными и условно патогенными бактериями (УПБ) происходит при регуляции системой Quorum Sensing (QS) только в тех случаях, когда плотность их популяции достигает определенного уровня, что предполагает наличие соответствующих межклеточных коммуникативных связей [4, 11]. При хронических заболеваниях и при дисбактериозе кишечника условно патогенные микроорганизмы, колонизируя слизистые оболочки, образуют биопленки, которые могут стать источником распространения бактерий по всему организму. Возможно, именно при нарушении структуры эпителиаль-

ного пласта начинается транслокация бактерий и их токсинов в лимфатическую и кровеносную системы. На проницаемость эпителиального кишечного барьера для различных молекул, в том числе и для бактерий, оказывают влияние самые различные факторы: состояние клеток в слизистой оболочке кишечника, клеточная гипоксия, окислительный стресс, увеличение кислотности и уровня провоспалительных цитокинов [2].

Барьерная функция эпителия является ключевой при развитии воспалительных заболеваний кишечника, при этом нормальное функционирование эпителия требует постоянного поддержания баланса между реактивностью и толерантностью к микроорганизмам просвета кишечника. Регуляция проницаемости эпителия становится наиболее важным звеном в осуществлении избирательного транспорта ионов, веществ и воды в различных органах.

В этой связи, белки плотных контактов (БПК) — апикальные межклеточные комплексы, обеспечивающие развитие эпителиального транспортного фенотипа и создающие барьер для движения ионов и веществ по межклеточному пути, стали наиболее важным объектом исследования при анализе возможных механизмов регуляции парацеллюлярного транспорта. Показано, что избирательная проницаемость эпителия напрямую зависит от молекулярного состава плотных контактов эпителия [7]. К основным белкам плотных контактов относятся: окклюдин и клаудины [10, 15]. По своим функциям эти белки можно подразделить на две группы: порообразующие клаудины -2, -7, -12, -15, -16 формируют селективные ионные поры и клаудины -1, -3, -4, -5, -8, -14, -18, -19, напротив, способны снижать проницаемость эпителия [14]. Особое внимание должно вызывать взаимодействие БПК с различными веществами, в том числе с бактериальными токсинами, приводящее к изменению количественного и качественного состава данных белков в плотных контактах, а также их локализацию [8]. Действие бактериальных токсинов на структурный комплекс плотных контактов эпителия кишечника свидетельствует о том, что вещества, содержащиеся в химусе, могут являться источником регулирующих проницаемость эпителия соединений. При этом показано, что термолabile энтеротоксины кишечных палочек и других условно патогенных энтеробактерий, вызывая повышение проницаемости слизистых оболочек кишечника, стимулируют его сокращение и обильную секрецию [6]. Показано, что эндотоксины или липополисахариды (ЛПС), естественным путем постоянно образующиеся в просвете ЖКТ как при физиологической гибели грамотрицательных бактерий на стадии их отмирания, так и при воздействии различных антимикробных факторов (например, антимикробных препаратов), также могут оказывать токсическое действие на организм хозяина, например, экспрессируя гены, индуцирующие синтез провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления [1]. До настоящего времени остается неясной роль самого ЛПС, пробиотических бактерий, а также их комплексов с ЛПС в изменении качественного состава и структуры плотных контактов. Соответственно не выяснен вклад ЛПС в транслокацию через эпителий тонкой кишки УПБ — представителей нормальной микробиоты, которые при определенных условиях могут стать причиной воспалительного процесса.

Исследование роли плотных контактов в осуществлении транслокации бактерий из ЖКТ в лимфу и системный кровоток в настоящее время является объектом пристального внимания и одним из наиболее приоритетных направлений развития микробиологии и висцеральной физиологии.

Участие плотных контактов в транслокации бактерий из просвета кишечника в лимфу и системный кровоток с учетом изменения барьерных свойств эпителиоцитов на ультраструктурном уровне до настоящего времени не рассматривалось. Для решения этого вопроса в настоящей работе необходимо выяснить, каким образом пробиотические бактерии *L. plantarum* 8PA3 и *E. coli* M17 влияют на эпителий тощей кишки и структуру плотных контактов, а также сравнить действие представителей двух эволюционно различающихся групп: грамотрицательных и грамположительных бактерий на электронно-микроскопическом уровне.

Цель настоящей работы — сравнительный анализ морфологических свойств клеток и плотных контактов энтероцитов тощей кишки крыс при воздействии пробиотических бактерий *L. plantarum* 8PA3 и *E. coli* M17 по отдельности и при их совместном применении с липополисахаридами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали пробиотические бактерии *L. plantarum* 8PA3 и *E. coli* M17 из коллекции института Н.Ф.Гамалеи и липополисахариды из *Escherichia coli* 0111:B4 производства Sigma-Aldrich (Германия) в концентрации 20 мкг/мл. Бактериальные культуры выращивали на питательных средах: бульон MRS (HiMedia, Индия) для лактобацилл и сердечно-мозговой бульон (HiMedia, Индия) для *E. coli* M17. Исследование проводили на крысах самцах линии Wistar ($n=18$), с массой тела 250 — 300 г. Схема опыта для работы с тканью тощей кишки описана в нашей предыдущей статье [3]. В эксперименте участвовали 6 групп животных: в первой группе в полость тощей кишки вводили суспензию лактобацилл *L. plantarum* 8PA3 в концентрации 10^8 КОЕ/мл, во второй группе крысам вводили суспензию *E. coli* M17 в концентрации 10^8 КОЕ/мл, в третьей и четвертой группах животных к указанным выше пробиотическим бактериям в той же концентрации добавляли по 20 мкг/мл ЛПС соответственно. В пятой группе крысам вводили по 20 мкг/мл ЛПС, в шестой группе в качестве контроля использовали физиологический раствор. После 2 часов инкубации с исследуемыми суспензиями пробиотических бактерий и их комплексами с ЛПС фрагменты тощей кишки фиксировали 2,5% раствором глутаральдегида в растворе Хенкса (pH=7,0) в течение 2 часов при температуре 4°C для получения ультратонких срезов. Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100C (JEOL, Япония) [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологический анализ контрольной ткани показал, что после инкубации тощей кишки крыс в физиологическом растворе клетки эпителиоцитов имели характерную цилиндрическую форму, при этом со стороны апикальной мембраны они покрыты микроворсинками, цитоплазма насыщена митохондриями, комплекс плотных контактов представлен в виде компактной структуры.

Следует отметить, что при сравнительном анализе контрольных образцов с эпителиоцитами, проинкубированными с клетками *L. plantarum* 8PA3, удалось обнаружить множество общих морфологических признаков. К наиболее важным из них следует отнести нативную структуру плотно прилегающих друг к другу клеток, апикальная поверхность которых покрыта плотным слоем

микроворсинок. Наблюдаемое в эпителиоцитах, контактировавших с лактобациллами, близкое прилегание микроворсинок друг к другу и нерасширенное межклеточное пространство отмечали одновременно с отсутствием деструктивных изменений в области плотных контактов. Основное отличие от контрольных образцов заключалось в насыщенности цитоплазмы эпителиоцитов после контакта с лактобациллами множеством полостей округлой формы. Большая часть этих включений содержала достаточно хорошо сохранившиеся фрагменты бактериальных клеток, окруженные мембранными структурами. Фрагменты мембран находились также и в пустотах цитоплазмы. Необходимо подчеркнуть, что в просвете кишки бактериальные клетки располагались, в основном, в мукозной части полости, прилегающей к апикальной поверхности эпителиоцитов на расстоянии около 20 — 30 мкм.

Контакт слизистых оболочек тощей кишки крыс с суспензией кишечных палочек *E. coli* M17 приводил к аналогичному эффекту появления в цитоплазме эпителиоцитов округлых полостей, в отдельных случаях включающих фрагменты бактериальных клеток в окружении мембранных структур или же только фрагменты мембран. Число микроворсинок на апикальной поверхности клеток оставалось таким же, как в контроле, при этом межклеточное пространство было не расширено, деструктивные изменения в области плотных контактов отсутствовали.

При действии ЛПС (в качестве контроля) на клетки слизистой оболочки тощей кишки в ряде случаев наблюдали увеличение межклеточного пространства по сравнению с контролем. Однако деструктивных изменений в структуре плотных контактов не отмечали, при этом у большей части клеток в области плотных контактов отсутствовали десмосомы. На апикальной поверхности клеток число микроворсинок оставалось таким же, как в контроле. Округлых полостей, включающих фрагменты бактериальных клеток в окружении мембранных структур, в клетках при воздействии ЛПС не обнаружено.

Инкубация эпителиоцитов с суспензией лактобацилл *L. plantarum* 8PA3 и ЛПС не вызывала изменений в структуре межклеточного пространства и плотных контактов, при этом не менялась плотность расположения микроворсинок на апикальной поверхности клеток слизистой оболочки.

Бактериальные клетки, находящиеся в просвете кишки, обнаруживались большей частью рядом или в глубине слизи, выделяющейся из бокаловидных клеток. В ряде случаев отмечено проникновение лактобацилл *L. plantarum* 8PA3 в присутствии ЛПС через межклеточное пространство на границе с бокаловидными клетками.

В результате контакта эпителиоцитов в течение двух часов с суспензией *E. coli* M17 совместно с ЛПС морфологических изменений как в самих клетках, так и в структуре плотных контактов, а также межклеточного пространства не выявлено. Плотность расположения микроворсинок на апикальной поверхности клеток слизистой оболочки не менялась. Насыщенность цитоплазмы округлыми полостями с остатками бактериальных клеток была несколько меньше, чем в случае контакта с клетками *L. plantarum* 8PA3. Чаше всего в просвете тощей кишки клетки кишечных палочек обнаруживали рядом с бокаловидными клетками, зачастую окруженные выделяющейся из них слизью. В данном случае также наблюдали проникновение клеток *E. coli* M17 в комплексе с ЛПС через пограничное с бокаловидными клетками межклеточное пространство. При этом, часть кишечных палочек оказывалась

прикрепленной материалом слизи бокаловидных клеток к поверхности эпителиоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время предполагают, что повышенная проницаемость слизистых оболочек в кишечнике является основным фактором риска развития инфекции транслокационным путем. Нормальное функционирование эпителия требует постоянного поддержания баланса между реактивностью и толерантностью к микроорганизмам просвета кишечника — пробиотическим бактериям. Нарушение этого баланса ведет к развитию воспалительного процесса в кишечнике. Увеличение численности грамотрицательных бактерий в ЖКТ, как правило, сопровождается наводнением кровотока ЛПС (эндотоксином), который может проявлять себя, в первую очередь, в качестве иммуномодулирующего фактора патогенности [1]. Для нейтрализации действия бактериальных эффекторов необходима разработка новых стратегических решений, позволяющих оказывать воздействие на эти процессы на молекулярно-генетическом уровне. Одним из путей решения поставленной задачи видится построение модели, основанной на избыточных, синергидных или антагонистических отношениях эффекторов, работающих в различных органеллах клеток-хозяина в период развития инфекционного процесса.

Источником таких эффекторов могут служить представители нормальной микробиоты ЖКТ, при этом наиболее информативными и показательными являются бактерии родов *Lactobacillus* и *Escherichia*.

Для оценки роли слизистой оболочки при контакте с пробиотическими бактериями и их комплексами с ЛПС (эндотоксином) проводили сравнительный анализ ультратонкой организации клеток эпителия и их плотных контактов. С этой целью исследовали ультраструктуру слизистой оболочки, ее мукозного слоя и содержимого просвета тощей кишки при воздействии разных видов пробиотических бактерий и смесью пробиотических бактерий с ЛПС.

Сравнительный морфологический анализ показал, что действие суспензионной культуры *L. plantarum* 8PA3, а также суспензии кишечных палочек *E. coli* M17 на плотные контакты и структуру эпителиоцитов тощей кишки было практически одинаковым. Клетки слизистой оболочки сохраняли интактную структуру, при этом основное отличие от контрольных образцов заключалось в появлении в цитоплазме эпителиоцитов после контакта с лактобациллами и кишечными палочками множества полостей округлой формы с фрагментами мембран и бактериальных клеток — возможно, остатков фаголизосом.

Однако при сравнении влияния пробиотических бактерий одновременно с ЛПС на плотные контакты и структуру эпителиоцитов тощей кишки крыс оказалось, что их действие не было идентичным с действием чистых бактериальных культур, несмотря на значительную общность ответных реакций (сохранность плотного слоя микроворсинок и структуры плотных контактов на фоне неизмененного межклеточного пространства). В значительном числе случаев клетки *L. plantarum* 8PA3 и *E. coli* M17 при добавлении ЛПС обнаруживали в межклеточном пространстве на границе с бокаловидными клетками. Следует подчеркнуть, что действие раствора ЛПС в чистом виде на клетки слизистой оболочки тощей кишки крыс приводило к более выраженным деструктивным изменениям, чем его контакт в комплексе с пробиотиками. Ранее в нашей работе было показано, что в ряде случаев эффект влияния ЛПС вы-

ражался в увеличении межклеточного пространства на фоне отсутствия деструктивных изменений в области плотных контактов, при этом обращала на себя внимание слабо развитая система десмосом [3]. Действие ЛПС на эпителиоциты проявлялось также в увеличении ядер и более выраженном развитии эндоплазматической сети (ЭПС). Нами ранее было отмечено, что особое влияние ЛПС выражалось также в увеличении численности тучных клеток [3]. Известно, что роль тучных клеток в ответной реакции на действие микробных токсинов проявляется в выбросе содержимого из гранул [12]. Следует отметить, что при действии ЛПС численность бокаловидных клеток в слизистой оболочке тощей кишки не увеличивалась, как это обычно происходит при действии энтеротоксинов.

Таким образом, исследование морфофизиологических свойств клеток эпителиоцитов при контакте с пробиотическими бактериями и их комплексами с ЛПС может помочь в получении предварительного ответа на основной вопрос о влиянии ЛПС на проницаемость эпителия в сторону усиления транслокации микроорганизмов: возможно, ЛПС является одним из основных факторов поддержания парацеллюлярного транспорта пробиотических бактерий в слизистой оболочке кишки. Однако обнаруженные в цитоплазме при инкубации тощей кишки с лактобациллами и кишечными палочками полые сферические включения показали, что при отсутствии ЛПС пробиотические бактерии, возможно, проникают через слизистую оболочку тощей кишки трансцеллюлярным путем.

Найти подтверждение данному предположению можно при исследовании соотношения белков плотных контактов — клаудинов методом вестерн-блотта. Предположительно, при трансцеллюлярном передвижении лактобацилл и кишечных палочек соотношение БПК в клетках эпителиоцитов должно оставаться в норме, а при парацеллюлярном транспорте — измениться в направлении увеличения порообразующих клаудинов -2, -7, -12, -15, -16.

Установлено, что одним из важнейших этапов для предотвращения развития инфекционного процесса является поддержание парацеллюлярного транспорта в слизистой оболочке кишки. Исследования, направленные на выявление способности молочнокислых бактерий противодействовать повышению кишечной проницаемости, были начаты около десяти лет назад. В настоящее время накоплено много данных, касающихся, в основном, экспериментов на различных моделях животных и на клеточных культурах [13]. Известно, что пробиотические бактерии способствуют повышению общей барьерной функции кишечника за счет увеличения продукции муцина, путем иммуномодуляции и ингибирования патогенных микроорганизмов, а также вследствие воздействия на всю микробиоту организма-хозяина. Однако молекулярные механизмы этих явлений остаются не достаточно изученными. Численность представителей УПБ в ЖКТ в норме должна составлять не более 10 тыс. клеток/1см². Образование биопленок УПБ, концентрация клеток в которых достигает более 10 млн клеток/см², сопряжено с началом продукции факторов патогенности [9]. При исследовании роли тканевых барьеров как при нормальном функционировании кишечника, так и при различных патологиях (например, при действии бактериальных токсинов) необходимо оценивать барьерные свойства эпителия, а также анализировать вклад в этот процесс белков плотных контактов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-074-64 и гранта СПбГУ 0.37.218.2016.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль транслокации кишечной бактериальной аутофлоры и ее токсических биомолекул в патологии человека. Эксперим. клин. гастроэнтерол. 20076, 5: 86-93.
2. Бондаренко В.М., Лиходед В.Г. Диагностика, лечение и профилактика эндотоксинемии. Лечение и профилактика. 20126, 2 (3): 70-76.
3. Вишневская О.Н., Рыбальченко О.В., Ларионов И.В., Орлова О.Г., Марков А.Г. Сравнительный анализ плотных контактов эпителия тощей кишки крыс при действии липополисахарида и холерного токсина. Журн. микробиол. 2016, 2: 3-9.
4. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития. Генетика. 2004, 40 (11): 1-12.
5. Рыбальченко О.В. Электронно-микроскопическое исследование межклеточных взаимодействий микроорганизмов при антагонистическом характере взаимоотношений. Микробиология. 2006, 75 (4): 550-555.
6. Alzamora R., O'Mahony F., Harvey B.J. Estrogen inhibits chloride secretion caused by cholera and Escherichia coli enterotoxins in female rat distal colon. Steroids. 2011, 76: 867-876.
7. Amasheh M., Schlichter S., Amasheh S. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. J. Nutr. 2008, 138 (6): 1067-1073.
8. Berkes J., Viswanathan V. K., Savkovic S.D., Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. Gut. 2003, 52 (3): 439-451.
9. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15: 167-193.
10. Furuse M., Fujita K., Hiiragi T. et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. J. Cell Biol. 1998, 141 (7): 1539-1550.
11. Gera C., Srivastava S. Quorum-sensing: the phenomenon of microbial communication. Current Science. 2006, 90 (5): 666-677.
12. He S.H. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. World J. Gastroenterol. 2004; 10 (3): 309-318.
13. Lee S.K., Yang K.M., Cheon J.H. et al. Anti-inflammatory mechanism of Lactobacillus rhamnosus GG in lipopolysaccharide-stimulated HT-29 cell. Korean. J. Gastroenterol. 2012, 60 (2): 86-93.
14. Mineta K., Yamamoto Y., Yamazaki Y. et al. Predicted expansion of the claudin multigene family. FEBS Lett. 2011, 585 (4): 606-612.
15. Tsukita S., Furuse M., Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2001, 2 (4): 285-293.

Поступила 01.08.17

Контактная информация: Рыбальченко Оксана Владимировна, д.б.н., проф.,
199106, С.-Петербург, ВО, 21 линия, 8а

С.Н.Жданова¹, О.Б.Огарков^{1,2,3}, В.В.Синьков¹, П.А.Хромова¹,
Е.А.Орлова¹, М.Е.Кошечев⁴, Е.Д.Савилов^{1,2}

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ОСНОВНЫХ КЛОНОВ ГЕНОТИПА BEIJING MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск; ²Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования; ³Иркутский государственный университет; ⁴Иркутская областная клиническая туберкулезная больница

Цель. Оценка динамики изменения структуры популяции возбудителя туберкулеза в Иркутской области на основе сравнительной характеристики генотипов микобактерий туберкулеза, полученных от больных из контрастных возрастных групп. *Материалы и методы.* С помощью 24-локусного MIRU-VNTR типирования были охарактеризованы 588 эпидемически не связанных штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ), выделенных от 567 больных туберкулезом (ТБ), из которых 160 штаммов принадлежали пациентам из контрастных возрастных групп. Из них 59 штаммов были выделены от «молодых» больных ТБ, родившихся после 1990 года, и 101 изолят от родившихся до 1955 года включительно. *Результаты.* Две трети выборки образцов МБТ (427/567) принадлежало генотипу Beijing с доминированием двух его субтипов, принадлежащих современным эпидемически распространяющимся в мире клональным комплексам CC1 и CC2. Высокий уровень кластеризации профилей этих вариантов генотипа Beijing у «пожилых» и «молодых» пациентов в Иркутской области свидетельствует о наличии стойкого очага инфекции и активной трансмиссии на протяжении последних 50 лет.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 88—94

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, генотип Beijing, эпидемические субтипы

S.N.Zhdanova¹, O.B.Ogarkov^{1,2,3}, V.V.Sinkov¹, P.A.Khromova¹,
E.A.Orlova¹, M.E.Kosheev⁴, E.D.Savilov^{1,2}

EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF MAIN CLONES DISTRIBUTION GENOTYPE BEIJING OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS WITHIN IRKUTSK REGION

¹Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction, Irkutsk; ²Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education; ³Irkutsk State University; ⁴Irkutsk Regional Clinical Tuberculosis Hospital, Russia

Aim. To estimate the dynamics changes in the population structure of the tuberculosis (TB) pathogen in the Irkutsk region by comparison of genotypes of *M. tuberculosis* from patients of different age groups. *Materials and methods.* 588 epidemiologically unrelated strains of *M. tuberculosis* isolates from 567 TB patients were characterized using 24-locus MIRU-VNTR typing. 160 strains belonged to patients of different age groups. 59 strains were isolated from the «young» people with TB who were born after 1990 and 101 isolates from people who were born before 1955. *Results.* Two-thirds of the samples (427/567) were genotype Beijing with the dominance of two subtypes belonging to the modern epidemic clonal complexes CC1 and CC2. The high level of clustering profiles of CC1 and CC2 genotype Beijing in «older» and «young» patients in the Irkutsk region indicates the presence and active transmission of epidemic CC1 and CC2 subtypes over the past fifty years.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No 6, P. 88—94

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, the genotype Beijing, epidemic subtypes

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение в России множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) возбудителя туберкулеза (ТБ) связывают со значительным распространением наиболее «успешных» современных клонов генотипа Beijing, доминирующего в Северной и Восточной Азии [5, 6, 14]. Кроме потенциала антибиотикорезистентности штаммы этого генотипа несут способность усугублять течение ТБ как на уровне инфекционного процесса (изменение патологических реакций, развитие внутриорганной и внелегочной диссеминации) [8, 9, 12, 17], так и путем активизации эпидемического процесса (эпидемические вспышки болезни) [13, 16]. Глобальное распространение и формирование устойчивых очагов инфекции, вызванных штаммами Beijing, ассоциировано с массовыми миграционными волнами и особенностями иммунного ответа, сформировавшегося у местного населения в процессе адаптации к разным генетическим вариантам возбудителя ТБ [3, 13].

Иркутская область стабильно занимает одно из ведущих мест по заболеваемости и распространенности ТБ в Сибирском федеральном округе и в Азиатской части России, которая всегда имела более высокий градиент бремени туберкулеза по сравнению с Европейской частью страны [2]. Кроме того, в Восточносибирском регионе широкомасштабно развивается эпидемия ВИЧ-инфекции, обеспечивающая немалый вклад в заболеваемость ТБ [4]. Наряду с вышеуказанными проявлениями эпидемиологического неблагополучия по ТБ, Иркутская область является территорией с активными миграционными процессами на протяжении всего периода существования Российской империи, СССР и последующего периода развития Российской Федерации. Поэтому рассматриваемый регион может выступать в качестве модели, где по следам прежних экспансий ТБ могут быть отслежены основные динамические изменения популяции возбудителя этого заболевания и установлены основные тенденции распространения его «современных» вариантов.

Цель настоящего исследования — оценка динамики изменения структуры популяции возбудителя туберкулеза в Иркутской области на основе сравнительной характеристики генотипов микобактерий туберкулеза, полученные от больных из контрастных возрастных групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ включена выборка из 588 эпидемически не связанных штаммов МБТ, выделенных от 567 больных туберкулезом легких из различных районов Иркутской области, находившихся на лечении в Иркутской областной клинической туберкулезной больнице в 2010 — 2015 гг. Из этой выборки были дополнительно отобраны 160 штаммов из контрастных по возрасту групп, которые значимо не отличались по национальной принадлежности. Штаммы выделены преимущественно от лиц славянской (156 штамма) национальности. Большинство штаммов — 111 образцов были выделены от мужчин. Когорту «молодых» составляли 59 пациентов, родившихся, начиная с 1990 года, а группу «пожилых» (101) — родившихся до 1955 года включительно.

Экстракцию ДНК штаммов МБТ проводили из инактивированных культур. Перед выделением образцы центрифугировали, ДНК выделяли из осадка бором ДНК-сорб В (Интерлабсервис, Россия) согласно протоколу производителя. MIRU-VNTR генотипирование проводили по протоколу сайта MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/miruinfo.faces;jsessionid=>

89112F274226E781C7B0B0D9118FDD70). С помощью пакета филогенетических программ сайта осуществляли первичное определение генотипов МБТ. Для уточнения распространенности штаммов также использовался ресурс открытой базы данных SITVIT (URL: http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/query). Генотипы семейства Beijing дополнительно субтипировались по участкам генома RD105/RD207, как описано ранее [1]. Для выявления субтипа B0/W148 генотипа Beijing использован принцип, предложенный в работе [12]. Для обнаружения вставки инвертированного повтора IS6110 между генами Rv2664 и Rv2665 использованы праймеры и зонды собственного дизайна (табл. 1). ПЦР проводили с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе LightCycler Nano (Roche) с использованием всех приведенных в табл. 1. олигонуклеотидов в одной реакции. Праймеры и зонды синтезированы НПФ «Синтол», реагенты для ПЦР приобретали в компании Интерлабсервис.

Профили штаммов, верифицированные как генотип Beijing вышеуказанными методами, по 24 локусам MIRU-VNTR сравнивали с базой данных, приведенной в [11]. В качестве рефересных профилей генотипа Beijing использовали 1550 уникальных MIRU-VNTR паттернов, распределенных по семи клональным комплексам (clonal complexes — CCs) [11]. Уровень кластеризации (clustering rate) оценивали по формуле: $CR = (n_c - c) / n$ [19], где n_c — общее количество кластеризованных штаммов, c — количество кластеров, n — общее количество штаммов. При этом кластером считали филогенетическую группу, состоящую из двух или более идентичных по 24 локусам штаммов. Для анализа полученных MIRU-VNTR паттернов использовали пакеты программ MIRU-VNTRplus. Матрица генетических дистанций между исследуемыми и рефересными профилями клональных комплексов из базы данных [11] получена с помощью пакета программ сайта MIRU-VNTRplus. Статистическую обработку данных проводили в редакторе электронных таблиц MS Excel 7.0 и пакетом программ статистического анализа R. Значимость различий между параметрами оценивали с помощью непараметрического критерия χ^2 , возрастно-половые различия в группах устанавливали с помощью критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом MIRU-VNTR по 24 локусам оценена популяционная структура *M. tuberculosis* в Иркутской области. За период наблюдения наибольшее количество штаммов — 75,3% (427/567) принадлежало к генотипу Beijing. Штаммы генотипа LAM обнаружены в 10,2% (58/567) случаев, T и Ural занимали соответственно третье и четвертое место по распространенности —

Таблица 1. Структура праймеров и зондов для обнаружения вставки инвертированного повтора IS6110 между генами Rv2664 и Rv2665 *M. tuberculosis*

Название	Структура олигонуклеотида 5'→3'	Примечание
W139F	GCGACCCGCCGTCTCCTGA	
Rv2665R	TCGGCCGTACGGACGACGAT	
TnsR	CGAGGCTGCCTACTACGCTC	
Probe 37	(FAM)-TT (C-LNA)CTCTGACAGCAACA (C-LNA)CAGTT-(RTQ1)	Для индикации штаммов поп-B0/W148
Probe 48	(R6G)-AGACTCTCTGATCT(G-LNA)AGAC (C-LNA)TCA-(BHQ2)	Для индикации штаммов кластера B0/W148

Таблица 2. Генотипы МБТ, выделенные от больных ТБ легких в Иркутской области

Генотип (субтип)	Число кластеров по 24-локусному профилю			Общее число кластеризованных изолятов			Частота кластеризации, CR			Штаммы с МЛУ, %		
	Общая выборка	«Пожи- лые»	«Моло- дые»	Общая выборка	«Пожи- лые»	«Моло- дые»	Общая выборка	«Пожи- лые»	«Моло- дые»	Общая выборка	«Пожи- лые»	«Моло- дые»
Beijing	27	6	3	324	44	22	0,70	0,54	0,48	41,5	28,6	23,1
(Beijing CC1)	6	2	2	151	23	12	0,84	0,70	0,67	29,7	16,7	20,0
(Beijing CC2 (B0/W148))	4	1	1	115	13	10	0,82	0,63	0,64	58,2	42,1	42,9
Другие субтипы Beijing	17	3	0	58	8	—	0,34	0,24	—	39,3	33,3	—
T	1	—	—	3	—	—	0,08	—	—	24,0	25,0	—
Ural	1	1	—	2	2	—	0,05	0,13	—	30,0	12,5	—
LAM	7	—	—	18	—	—	0,19	—	—	36,2	12,5	—
H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	33,3	—	—
X	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16,7	—	—
Общий показатель	36	7	3	347	46	22	0,56	0,39	0,36	45,4	24,8	18,9

4,4% (25/567) и 3,5% (20/567) соответственно. Изоляты всех этих семейств отличались значительной генетической гетерогенностью. Также большим генетическим разнообразием отличались минорные генотипы X, H, S, Uganda и Haarlem — от 3 до 6 изолятов в выборке. В 3,7% случаев были выявлены микст-генотипы МБТ. Используемыми методами не были идентифицированы 2,5% (14/567) штаммов.

Из генотипов Beijing самыми распространенными в рассматриваемой выборке были штаммы CC1 (167/427). Этот субтип имел все проявления лекарственной устойчивости от сохраненной чувствительности до широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) без значимых отличий от других представителей Beijing и non Beijing. Наряду с этим разнообразие профилей MIRU-VNTR 24 штаммов субтипа Beijing CC1 свидетельствует о накоплении большого резервуара инфекции в течение определенного времени его существования и, вероятно, активной роли миграционной трансмиссии инфекта из других территорий. Эту гипотезу подтверждает обнаружение идентичного профиля Beijing CC1 (244233352644425153353823) у 70,6% (122/172) штаммов этого варианта, что может быть связано с активностью очага инфекции в регионе. В группе CC1 в 11 случаях были обнаружены специфические для B0/W148 инсерции инвертированной IS6110, в большинстве случаев (7/11) несшие МЛУ или ШЛУ.

Субтип Beijing CC2 (113/134) в популяции МБТ Иркутской области представлял в основном варианты, также отвечающие классификации B0/W148 по наличию специфической инвертированной инсерции IS 6110 [12], за исключением только двух обнаруженных нами случаев несовпадения систематизации B0/W148 и CC2 (2/113). Среди доминирующих вариантов генотипа Beijing было выявлено значимое преобладание МЛУ и ШЛУ только у штаммов Beijing MIT17 (67/134) — второго по частоте встречаемости варианта по сравнению с другими генотипами ($\chi^2=3,182$ $p=0,03$). При этом Beijing CC2 non B0/W148 в трети случаев имел также МЛУ и ШЛУ (3/8).

Следующий этап анализа включал в себя сравнительное изучение 160 изолятов, полученных от больных разных поколений из Иркутской области (табл. 2). С этой целью путем MIRU-VNTR генотипирования по 24 локусам и классификации паттернов по клональным комплексам из работы [11] проанализирована структура популяции *M.tuberculosis* и определено сходство срав-

ниваемых структур. Исследование показало, что высокотрансмиссивные субтипы, представленные клональными группами CC1 и CC2, несущие антибиотикорезистентность, одинаково часто проявлены ($\chi^2=1,056$; $p=0,152$) у больных из контрастных по возрасту групп. Не обнаружено различий в частоте выявления клона B0/W148 у пациентов из сравниваемых групп ($\chi^2=0,021$; $p=0,442$). Единственным значимым отличием ($\chi^2=3,0$; $p<0,05$) выборки «пожилых» от «молодых» было наличие других (неэпидемических) субтипов генотипа Beijing, в то время как у рожденных после 1990 г. встречались только высокоэпидемические CC1 и CC2 субтипы (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка глобального распространения штаммов генотипа Beijing на территории Евразии позволила сформулировать ряд концепций о вероятной истории его экспансии на территорию России и стран, входивших в СССР [3, 13]. Ранее представленная нами гипотеза на основе модели взрывообразного распространения штаммов этого генотипа в XX веке, связанного с их заносом с территории Китая [3, 15], согласуется с полученными нами данными по CC1 кластеру. Однако отсутствие субтипа B0/W148 генотипа Beijing в Китае [13] предполагает другой сценарий появления его в России. В качестве возможного источника данного варианта возбудителя ТБ рассматривается территория Западной Сибири [13], откуда с волнами послевоенной миграции он мог распространиться по территории СССР, а в постсоветское время — в другие регионы мира. Для доказательства предполагаемой истории экспансии субтипа B0/W148 генотипа Beijing было осуществлено MIRU-VNTR генотипирование по 24 локусам штаммов МБТ, циркулирующих на территории Иркутской области, а также в контрастных по возрасту группах больных ТБ (до 25 лет и после 55).

Гипотеза, положенная в основу исследования, состоит в том, что момент заноса и недавнего эпидемического распространения наиболее «успешных» вариантов генотипа Beijing на изучаемой территории может быть отслежен путем сравнения структуры популяции штаммов МБТ в разных поколениях больных ТБ. Принимая во внимание концепцию о подавляющем заражении МБТ в детском возрасте, особенно на территориях с высоким бременем ТБ [10], выборка генотипов «пожилых» людей, в целом, отражает генетическое разнообразие возбудителя туберкулеза, сформировавшегося на изучаемой территории более пятидесяти лет назад, а штаммы, выделенные от «молодых» пациентов, соответствуют текущей эпидемической ситуации [7, 18].

В целом, мы не обнаружили какие-либо кластеры, состоящие исключительно из штаммов, принадлежащих «пожилым» больным ТБ в Иркутской области. К тому же, в рассматриваемой популяции МБТ среди «молодых» больных не было ожидаемого увеличения частоты субтипа Beijing CC2 (B0/W148). Уровень его встречаемости не имел значимых различий в когорте «молодых» (11/59) и «пожилых» (24/101) пациентов ($\chi^2=0,311$; $p=0,288$). Частота кластеризации штаммов (CR) среди «пожилых» пациентов оказывается достаточно высокой (CR=0,39), не имеющей значимых отличий от показателя «молодых» пациентов (CR=0,36), ($\chi^2=0,949$; $p=0,165$). В сравниваемых возрастных группах, как и в общей выборке, кластеризующиеся штаммы значительно чаще обнаруживались среди субтипов генотипа Beijing ($\chi^2=39,6$; $p<0,01$), их CR была наивысшей в общей структуре МБТ — 0,70, на этом фоне CR штаммов nonBeijing была равна 0,10. Внутри выборки штаммов генотипа

Beijing среди «молодых» пациентов CR была незначительно ниже (0,48), чем среди «пожилых» (0,55).

Такая ситуация может свидетельствовать об устойчивом резервуаре инфекции за счет уже сформировавшейся популяции МБТ, отличающейся разнообразием циркулирующих вариантов в основном за счет субтипов Beijing, среди которых ведущую роль в активной передаче и распространении МЛУ играет один из клонов Beijing CC1. Филогенетический анализ профилей Beijing CC1 из Иркутской области в сопоставлении с данными глобальной базы из работы [11] позволил установить, что подобные иркутским профили циркулируют в Центральной Азии и Европе, где описана МЛУ эпидемия ТБ, вызванного CC1 штаммами [12, 14]. Вместе с тем, присутствующие в глобальной базе Beijing российские профили CC1 в большинстве случаев отличаются от полученных нами, что может указывать на возникшее разнообразие в процессе недавней эволюции этого клона на обширной территории России после заноса из Северного Китая и эпидемического распространения его во второй половине XX века [3].

Штаммы Beijing B0/W148, также отвечающие классификации CC2 и одинаково часто встречающиеся у больных ТБ разных поколений, являются филогенетически самыми молодыми представителями Beijing. Недавнее распространение штаммов Beijing CC2 (B0/W148) в иркутской популяции подтверждается низким разнообразием профилей на фоне более высокой кластеризации по сравнению с Beijing CC1. При этом самый большой кластер с идентичными характеристиками MIRU-VNTR 24 имел полное сходство с европейским CC2 (244233352644425173353723) — 109/134. Значительно меньшие по величине два кластера Beijing CC2 из Иркутской области (4/134 и 5/134 изолятов) отвечали профилям CC2 из Центральной Азии. В совокупности полученные данные согласуются с гипотезой массовой трансмиссии B0/W148 по всей территории бывшего СССР. Отсутствие полностью совпадающих с российскими Beijing CC2 представителями в базе Merker M. et al [11] может свидетельствовать, как и в случае Beijing CC1, о возникшей вариации, носящей незначительный характер и, вместе с тем, давшей самостоятельный очаг инфекции на изучаемой территории.

Работа поддержана РФФИ (грант 15-04-00632 А).

ЛИТЕРАТУРА

1. Жданова С.Н., Огарков О.Б., Степаненко Л.А. и др. Применение делеционного анализа по RD105 для выявления генотипа Пекин Mycobacterium tuberculosis. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2011, 2:194-197.
2. Краснов В.А., Ревякина О.В., Филимонов П.Н. и др. Влияние отдельных демографических и географических факторов на оказание противотуберкулезной помощи в регионах Сибири и Дальнего Востока. Туберкулез и болезни легких. 2012, 8: 10-15
3. Синьков В.В., Савилов Е.Д., Огарков О.Б. Эпидемиология туберкулеза в России: молекулярные и исторические доказательства в пользу сценария распространения пекинского генотипа M. tuberculosis в XX в. Туберкулез и болезни легких. 2012, 3: 57-62.
4. Туберкулез в Российской Федерации, 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. М., 2015.
5. Borgrell S., Gagneux S. Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Clin. Microbiol. Infect. 2011, 17: 815-820.
6. Casali N., Nikolayevskyy V., Balabanova Y. et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. Nat. Genet. 2014, 46: 279-286.

7. Groenheit R., Ghebremichael S., Pennhag A. et al. Mycobacterium tuberculosis strains potentially involved in the TB epidemic in Sweden a century ago. *PLOS One*. 2012, 7(10):e46848.
8. Hanekom M., Gey van Pittius N.C., McEvoy C. et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011, 91 (6): 510-523.
9. Lasunskaja E., Ribeiro S.C., Manicheva O. et al. Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes Infect*. 2010, 12 (6): 467-475.
10. Marais B.J., Gie R.P., Schaaf H.S. et al. The natural history of childhood intra-thoracic tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2004, 8 (4): 392-402.
11. Merker M., Blin C., Mona S. et al. Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. *Nat. Genet*. 2015, 47 (3): 242-249.
12. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A. et al. Russian «successful» clone B0/W148 of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J. Clinical Microbiology*. 2012, 50 (11): 3757-3759.
13. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev*. 2013, 26 (2): 342-360.
14. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015, 95 (1): S167-76.
15. Ogarkov O., Mokrousov I., Sinkov V. et al. «Lethal» combination of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and human CD209 –336G allele in Russian male population. *Infect. Genet. Evol*. 2012, 12 (4): 732-736.
16. Parwati I., van Crevel R., van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains. *Lancet Infect. Dis*. 2010, 10 (2): 103-111.
17. Reed M.B., Domenech P., Manca C. et al. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*. 2004, Sep 2; 431 (7004): 84-87.
18. Smit P.W., Haanperä M., Rantala P. et al. Genotypic characterization and historical perspective of Mycobacterium tuberculosis among older and younger Finns, 2008-2011. *Clin. Microbiol. Infect*. 2014, 20 (11): 1134-1139.
19. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol*. 2006, 44 (12): 4498-4510.

Поступила 04.04.17

Контактная информация: Жданова Светлана Николаевна, к.м.н.,
664003, Иркутск, ул. К. Маркса, 3, р.т. (3952) 33-34-25

© С.Б.ЯЦЫШИНА, 2017

С.Б.Яцышина

ПНЕВМОВИРУСЫ В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

В обзоре даны современные сведения о строении, генетическом разнообразии и факторах патогенности пневмовирусов — респираторно-синцитиального вируса человека (РС-вируса) и метапневмовируса человека, в связи с образованием нового семейства *Pneumoviridae* по решению международного совета по таксономии вирусов в 2016 году. Представлены результаты собственных клинико-эпидемиологических исследований в сравнении с данными литературы. Выявлена цикличность циркуляции РС-вируса. Проведено сравнение клинико-эпидемиологических характеристик данных инфекций. Показана лидирующая роль РС-вируса при ОРВИ детей и значимость метапневмовируса как этиологического агента респираторной инфекции взрослых. Подчеркивается важная роль обоих вирусов в развитии инфекций нижних отделов дыхательных путей. Проанализированы факторы, способствующие широкой распространенности РС-вируса у больных ОРЗ детей. Рассмотрены аспекты профилактики данных инфекций.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 95—105

Ключевые слова: респираторная инфекция, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус, эпидемиология

S.B. Yatsyshina

PNEUMOVIRUSES IN HUMAN INFECTIOUS DISEASES

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

This review presents the actual data about structure, genetic diversity and pathogenicity factors of human respiratory syncytial virus (hRSv) and human metapneumovirus — which are the members of new *Pneumoviridae* family, according to updated taxonomy accepted by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) in 2016. The results of own epidemiological and clinical studies are presented in comparison with literature data. Cyclic recurrence of hRSv circulation was revealed. The clinical and epidemiological characteristics of hRSv and hMPv infections were compared. The leading role of the hRSv in ARVI in children and the importance of hMPv as an etiological agent of respiratory infection in adults are shown. Significance of both viruses as the agents of the lower respiratory tract infections is emphasized. The factors contributing to the prevalence of the hRSv in children with ARI are analyzed. Prevention measures for these infections are considered.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 95—105

Key words: respiratory infection, respiratory syncytial virus, metapneumovirus, epidemiology

Пневмовирусы — представители семейства *Pneumoviridae*, ранее принадлежавшие семейству *Paramyxoviridae*, включают наиболее значимые и широко распространенные возбудители инфекций дыхательных путей человека.

Выделение отдельного семейства и другие изменения таксономии произошли по решению Интернационального комитета по таксономии вирусов (ICTV) в 2016 году. Ниже представлена актуальная таксономия пневмовирусов, вызывающих ОРВИ человека.

Порядок	Mononegavirales	
Семейство	Pneumoviridae	
Род	Orthopneumovirus	Metapneumovirus
Вид	Human orthopneumovirus	Human metapneumovirus
Вирусы	Human respiratory syncytial virus (hRSv) (респираторно-синцитиальный вирус человека)	Human metapneumovirus (hMpv) (метапневмовирус человека)

Респираторно-синцитиальный вирус (РС-вирус) впервые был изолирован в 1955 году, однако в силу его недостаточно эффективного роста в культуре клеток, детализированное изучение его генома стало возможным только с применением методов клонирования и секвенирования нуклеиновых кислот с 1980-х годов.

Метапневмовирус человека (hMpv) был открыт гораздо позднее — в 2001 году. Новый вирус был выделен от детей, имевших симптомы заболевания, сходные с РС-инфекцией, варьировавшие от заболевания верхних дыхательных путей до бронхоолита и пневмонии. Цитопатическое действие в культуре клеток также было сходным с РС-вирусом, однако имелись отличия в структуре генома и нуклеотидной последовательности, которые оказались родственны пневмовирусу птиц [49]. Открытый вирус получил название «метапневмовирус человека».

Строение вириона и генома пневмовирусов. Геном пневмовирусов представлен одноцепочечной несегментированной молекулой РНК отрицательной полярности. Вирион имеет оболочку, которая представляет собой фрагмент мембраны клетки хозяина. В оболочку вирусов встроены три трансмембранных поверхностных гликопротеина: большой гликопротеин G, белок слияния F и малый гидрофобный протеин SH (порин, формирующий ионные каналы). В отличие от большинства имеющих оболочку вирусов, пневмовирусы используют для проникновения в клетку не один белок, а два. Первый белок — гликопротеин (G) способствует присоединению вириона к клетке [35], а второй (поверхностный белок F) — обеспечивает слияние вирусной и клеточной мембран при нейтральных значениях pH [33]. Гемагглютинирующая и нейраминидазная активности у пневмовирусов отсутствуют.

Изнутри оболочка выстлана матриксом из белка M. Внутренность вириона заполнена спиралевидным нуклеокапсидом, образованным молекулой РНК, связанной с нуклеопротеином N и белками P и L. Нуклеопротеин N связывает вирусную РНК, защищая ее от действия РНКаз, и подготавливает матрицу для синтеза мРНК полимперазой L. Фосфопротеин P выполняет функцию ко-фактора полимеризации.

Гены в молекуле РНК располагаются последовательно, перемежаясь межгенными участками, содержащими сигнальную последовательность начала гена, и последовательность, сигнализирующую об окончании гена, за которой следует последовательность поли-У (обеспечивающая полиаденилирование мРНК). Кроме того, на 3' и 5'-концах генома расположены некодирующие лидерная и трейлерная последовательности, необходимые для репликации и

транскрипции. Каждая мРНК кодирует один протеин, за исключением гена M2, имеющего две перекрывающиеся рамки считывания, кодирующие протеины M2-1 и M2-2 [18]. Белок M2-1 выполняет функцию фактора транскрипции [17], а белок M2-2 — регулятора синтеза РНК [8]. Наличием уникального гена M2 пневмовирусы отличаются от представителей семейства Paramyxoviridae.

Вирионы РС-вируса, репродуцируемые в культуре клеток, представляют собой сферические частицы размером от 100 — 350 нм в диаметре и филаменты, имеющие диаметр 60 — 200 нм и длину до 10 мкм [27]. Белок слияния F и белок G формируют короткие (11 — 16 нм) поверхностные шипы. Вирионы метапневмовируса представляют собой плеоморфные частицы размером от 150 до 600 нм, сферические частицы имеют диаметр около 150 нм. Мембранная оболочка, также как и у РС-вируса, имеет шипы размером 13 — 17 нм.

Молекула РНК РС-вируса размером около 15200 п.н. содержит 10 генов и кодирует 11 белков в следующем порядке: 3' NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L [5]. Помимо структурных белков геном РС-вируса кодирует неструктурные протеины — протеины M2-1, M2-2, NS1 и NS2. Молекула РНК метапневмовируса размером от 13280 до 13378 п.н. включает 8 генов и кодирует 9 белков. В отличие от hRSv, она не имеет генов, кодирующих неструктурные белки NS1 и NS2, а оставшиеся гены расположены в другом порядке: F, G, SH, M, N, M2-1, M2-2, P и L [49].

Генетическое разнообразие пневмовирусов. На основании различий нуклеотидной последовательности выделяют два субтипа (или две антигенных группы А и В) РС-вируса, каждый из которых подразделяется на несколько генотипов. Оба антигенных варианта и их генотипы циркулируют одновременно и повсеместно [39]. Генотипирование проводится преимущественно на основании последовательности наиболее варибельного гена — G [14]. Филогенетический анализ показывает, что скорость мутаций генома РС-вируса субтипа А составляет $6,72 \times 10^{-4}$ замен/сайт/год, субтипа В — $7,69 \times 10^{-4}$ замен/сайт/год [4]. Мутации, главным образом инсерции, одного или более оснований урацила, происходят в межгенных и нетранслируемых областях. В кодирующей области спонтанные делеции зафиксированы в генах G и SH *in vitro* и в гене G — *in vivo* [51], и дубликации — в гене G [14]. Рекомбинации могут происходить, но, по-видимому, очень редки [44].

Среди циркулирующих метапневмовирусов также выделяют два генотипа — А и В, которые на основании варибельности генов G и F далее подразделяют на подгруппы A1, A2, A2a, A2b, B1 и B2 [50]. Филогенетический анализ показывает, что существующее сейчас генетическое разнообразие метапневмовирусов сформировалось за последние 30 — 100 лет [9, 54]. Скорость эволюции hMrv наиболее высока для гена G ($3,5 \times 10^3$ замен/сайт/год) и ниже для генов N (9×10^4 замен/сайт/год) и F (от $7,1 \times 10^4$ до $8,5 \times 10^4$ замен/сайт/год) [9, 54].

Вопрос, существует ли ассоциация между тяжестью заболевания и определенным субтипом РС-вируса, все еще является предметом дискуссий [7]. Метапневмовирусы разных генетических групп вызывают сходные клинические формы заболевания [42].

Факторы патогенности пневмовирусов. Начало инфекции — проникновение пневмовирусов инициируется при взаимодействии поверхностных белков вирионов с рецепторами клеток хозяина. Рецепторами для прикрепления белка G РС-вируса служат гепарансульфаты и рецепторы хемокинов [29]. В

экспериментах *in vivo* показано, что РС-вирус проявляет тропизм главным образом к клеткам респираторного эпителия. Вирус выделяют из аспиратов из носоглотки, назо-фарингеальных мазков и жидкости бронхо-альвеолярного лаважа. Антигены вируса методом гибридизации *in situ* обнаруживают в трахее, бронхах, бронхиолах и альвеолах (альвеолярных пневмоцитах I и II типов) больных. Однако, по-видимому, тропизм более широк, поскольку РС-вирус может реплицироваться в трансформированных линиях клеток, полученных из легких, почек, печени, нервной ткани, кишечника, молочной железы и яичников [6]. Метапневмовирус в качестве рецепторов для взаимодействия с клеткой хозяина использует гепарансульфаты и интегрины [42].

После того, как произошло прикрепление вириона, белок F обеспечивает слияние вирусной и клеточной мембран и проникновение генома вируса в цитоплазму, где происходит транскрипция и репликация пневмовирусов.

В случае РС-вируса, белок F также способствует слиянию соседних инфицированных клеток, что приводит к образованию синцития. Благодаря этой особенности hRSv получил свое название — респираторно-синцитиальный вирус.

Цикл репликации хорошо изучен для РС-вируса на культуре клеток. Процесс занимает 10 — 12 часов, при этом в цитоплазме инфицированных клеток становятся заметными большие тельца включения — сайты синтеза белков и РНК, которые сформируют новое поколение вирионов [34].

Пневмовирусы вызывают деструкцию эпителия инфицированных клеток. Патоморфологические изменения при РС-инфекции заключаются в некрозе эпителиальных клеток, пролиферации эпителия бронхиол и его инфильтрации моноцитами, Т-клетками и нейтрофилами [28].

Патогенность пневмовирусов обусловлена рядом разнообразных механизмов. Неструктурные протеины NS1 и NS2 РС-вируса способны ингибировать апоптоз [2] и индукцию синтеза интерферона в ответ на инфекцию [46].

Для метапневмовируса показано, что протеин M2-2 не только выполняет функцию регулятора транскрипции и репликации, но и способен ингибировать сигнальные пути системы врожденного иммунитета хозяина [40]. Протеин G метапневмовируса может подавлять иммунитет хозяина посредством мимикрии под регуляторы выброса хемокинов [48].

Клинико-эпидемиологические аспекты. Респираторно-синцитиальный вирус. РС-вирус является ведущим этиологическим агентом острых инфекций дыхательных путей детей во всех странах мира [20, 36]. РС-вирус вызывает около 33 млн случаев инфекции нижних дыхательных путей у детей до 5 лет ежегодно, из которых для 10% случаев требуется госпитализация [36].

На основании данных систематического обзора статей, опубликованных в 1995 — 2015 гг., РС-вирус ассоциирован с 12 — 63% всех случаев острой респираторной инфекции; РС-инфекция составляет от 19 до 81% случаев ОРВИ тяжелого течения у детей, требующих госпитализации; 2 — 12 % больных РС-вирусной инфекцией нуждаются в интенсивной терапии [3].

Тяжесть течения заболевания и уровень госпитализаций увеличивается по мере снижения возраста больных детей. В США (сходная картина наблюдается в Канаде и в странах Европы) уровень госпитализации по поводу РС-инфекции составляет 3 на 1000 детей в возрасте до 5 лет и 12 — 19 на 1000 младенцев первого полугодия жизни, что в 3 раза выше аналогичных показате-

телей при гриппе для детей младшего возраста и в 6 — 8 раз для младенцев [21]. При тяжелой РС-инфекции летальность (по данным мета-анализа) в среднем составляет 0,62% (0,26 — 1,37%) для детей в возрасте до 5 лет и 0,66% (0,19 — 1,69 %) для детей младше 1 года [45].

Высокий риск развития тяжелой РС-инфекции имеется у недоношенных детей, особенно имеющих бронхо-легочную дисплазию, хронические заболевания легких, врожденные пороки развития сердца и других органов [21, 23, 47], тем не менее, большинство случаев тяжелой РС-инфекции наблюдается у ранее здоровых младенцев нормального срока гестации [21, 23].

Около половины детей, перенесших РС-инфекцию на первом году жизни, могут повторно заболеть на втором году жизни или позднее, однако второй эпизод заболевания почти всегда характеризуется менее тяжелым течением [21].

Среди госпитализированных по поводу РС-вирусной инфекции нижних дыхательных путей детей в возрасте до 2 лет в 50 — 90% случаев диагностируется бронхолит, в 5 — 40% пневмония [38]. У детей старше года нередко диагностируется бронхиальная астма [23]. Клиническая картина при РС-инфекции у детей может напоминать грипп. Активное выявление с февраля 2010 г. по август 2011 г. в ряде стран (Австралии, Бразилии Колумбии, Коста-Рике, Мексике, Филиппинах, Сингапуре и Таиланде) случаев РС-инфекции у детей в возрасте от 6 месяцев до 10 лет среди эпизодов заболевания, имевших симптоматику гриппа, показало, что такие случаи составляли 9,7% [37].

У взрослых также регистрируются случаи РС-инфекции, которая может тяжело протекать у пожилых и ослабленных сопутствующей хронической соматической патологией людей [16].

Инаппарантная форма РС-инфекции встречается редко [37]. У детей в отсутствии симптомов респираторной инфекции РС-вирус обнаруживается крайне редко (0,5 — 2,6%) [1, 25, 26].

Метапневмовирус человека. Метапневмовирусная инфекция регистрируются по всему миру на протяжении всего года во всех возрастных группах [42].

Исследования сывороток крови на наличие специфических к метапневмовирусу антител демонстрируют их наличие у всех взрослых, достигших 25-летнего возраста, причем частота их выявления увеличивается с возраста 5 лет [41], что свидетельствует о его широкой распространенности.

Среди случаев острой инфекции верхних дыхательных путей у детей доля hMPV-инфекции различается в разные годы, составляя 1 — 15%, что ниже распространенности гриппа, парагриппа, РС-инфекции и аденовирусной инфекций [53].

hMPV обнаруживается у 5 — 20% детей в возрасте до 5 лет при заболеваниях нижних дыхательных путей [30, 52]. При hMPV-инфекции могут наблюдаться конъюнктивит, симптомы поражения ЖКТ, однако они встречаются редко [42], hMPV обнаруживается в жидкости среднего уха больных ОСО [41]. Реинфекция метапневмовирусом может происходить, но повторная инфекция, как правило, протекает легче первого эпизода и ограничивается поражением верхних дыхательных путей [41].

Эпидемиологические исследования в США свидетельствуют о том, что средний ежегодный уровень госпитализаций по поводу инфекций, ассоциированных с hMPV, составляет 1 на 1000 детей в возрасте до 5 лет, 3 на 1000

младенцев первого полугодия жизни и 2 на 1000 детей от 6 до 11 месяцев жизни [12].

Сообщения о заболевании hMrv-инфекцией взрослых среднего возраста относительно редки, однако у пожилых людей частота заболевания, вызванного hMrv, довольно высока, что позволяет отнести их к группе риска тяжелой инфекции [24]. Симптомы заболевания у пожилых сходны с РС-инфекцией [10]. Большинство пациентов, нуждающихся в интенсивной терапии, имеют сопутствующие хронические заболевания ССС или легких, тем не менее тяжелая hMrv-инфекция регистрируется и у иммунокомпетентных пожилых людей, не имеющих какой-либо хронической патологии [24].

Имеются сообщения о летальных исходах при метапневмовирусной инфекции у пациентов, перенесших до этого трансплантацию клеток костного мозга [11, 13]. Ряд исследователей сообщают о наличии ассоциации hMrv с обострением бронхиальной астмы у детей и взрослых, тогда как другие этого не подтверждают [41].

У здоровых детей РНК hMrv выявляется крайне редко (менее 1%) [1, 25, 26].

Сравнение клинико-эпидемиологических особенностей инфекций, вызванных hRSv и hMrv. С целью распространенности и сезонности циркуляции пневмовирусов нами проведено исследование в рамках мониторинга за возбудителями ОРВИ с помощью набора реагентов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ЦНИИЭ, Москва) образцов клинического материала от 4241 больного ОРЗ, собиравшихся в различных ЛПУ г. Москвы на протяжении 2005 — 2016 годов ежемесячно и пропорционально заболеваемости. В месяцы наибольшей заболеваемости в совокупности обследованы от 431 до 633 пациентов, в месяцы меньшей заболеваемости — не менее 250, в летние месяцы, за исключением августа — от 30 до 100. Клинический материал включал мазки из носоглотки и ротоглотки (4167, 98,3%), мокроту или аспираты их трахеи при заболеваниях нижних дыхательных путей (74, 1,7 %).

Результаты представлялись в виде доли обнаруженного возбудителя в процентах относительно количества обследованных пациентов в каждом месяце. В данное исследование не был включен сезон пандемии гриппа в 2009 — 2010 гг., чтобы не исказить закономерности циркуляции респираторных вирусов во время стандартных эпидемических периодов.

Результаты исследования демонстрируют циркуляцию РС-вируса во все сезоны и месяцы, за исключением июля. Частота выявления РС-вируса была достоверно выше с декабря по январь и в апреле (25,1; 22,1 и 19,0% соответственно, $p < 0,0001$) и минимальна в сентябре—октябре. Метапневмовирус встречался во все сезоны и месяцы. Заболеваемость hMrv была выше с сентября по январь с максимальной частотой его выявления в ноябре-декабре (4,8 — 4,4%) и в апреле (4,2%). Однако по сравнению с hRSv, hMrv обнаруживался значительно реже, за исключением июля и сентября, когда частота выявления обоих возбудителей достоверно не различалась (2,5% vs 0 и 3,9% vs 1,8%, $p > 0,05$).

Анализ циркуляции hRSv, прослеженной нами в динамике, отразил более сложные особенности его эпидемической активности. В отдельные годы наблюдались подъемы эпидемической активности, когда hRSv встречался с высокой частотой на пике до 45 — 50% обследованных больных и спады до уровня 1%.

Возрастание частоты обнаружения RSV наблюдалось через год, чередуясь с «выпадением» следующего осеннего подъема заболеваемости: начало подъема наблюдалось с февраля—апреля каждого нечетного года и его окончание в феврале — апреле следующего четного года, после чего следовали «спокойные» по РС-инфекции с конца весны до середины зимы и снова подъем заболеваемости с февраля—апреля следующего нечетного года.

С целью изучения возрастных особенности распространенности пневмовирусов больные были распределены на следующие возрастные группы: группа 1 (дети от 1 месяца до 1 года 11 месяцев, 0 — 1 лет, 1603 детей), группа 2 (от 2 лет до 5 лет 11 месяцев, 2 — 5 лет, 1706 детей), группа 3 (от 6 лет до 17 лет 11 месяцев, 6 — 17 лет, 783 детей) и группа 4 (взрослые, 149 человек).

РС-вирус превалировал у детей младше 6 лет, в группе детей до 2 лет его доля была максимальна (18,96% vs 13,95, $p_{1-2}=0,0001$, $p_{1-3}<0,0001$, $p_{2-3}<0,0001$).

Метапневмовирусы обнаруживались во всех возрастных группах, однако с большей частотой у взрослых и детей 2 — 5 лет ($p_{2-3}=0,0003$, $p_{2-1}=0,002$, $p_{4-3}=0,004$). Заслуживает внимания тот факт, что метапневмовирус у взрослых был вторым по частоте обнаружения после вируса гриппа А и встречался чаще, чем РС-вирус (6,7 vs 1,3%, $p=0,02$). У детей младше 6 лет, напротив, РС-вирус превалировал над вирусом гриппа А ($p<0,0001$) и обнаруживался гораздо чаще, чем hMPV, ($p<0,0001$). Для возрастной группы 6 — 17 лет различия были меньше, но все же достоверными: из этих трех вирусов чаще обнаруживался вирус гриппа А, за ним следовал РС-вирус (4,7 vs 2,0, $p_{hRSV/hMPV}=0,003$; 8,8 vs 4,7 vs 2,0, $p_{Inf A/hRSV/hMPV}=0,001$).

Таким образом, можно заключить, что РС-вирус у больных детей встречается чаще, чем метапневмовирус, и напротив — метапневмовирус чаще, чем РС-вирус вызывает респираторную инфекцию у взрослых.

Анализ медицинской документации, доступной для 46% обследованных пациентов, показал, что как при РС-инфекции, так и при инфицировании hMPV с одинаковой частотой диагностировалась внебольничная пневмония (15 и 14% инфицированных) и острый бронхит (15 и 9%).

В силу своей широкой распространенности РС-вирус обнаруживался у 32,2% из 264 госпитализированных больных острым бронхитом детей. Еще чаще он встречался при обструктивном бронхите — у 36,4% из 259 детей, hMPV при этих нозологиях выявлялся гораздо реже — в 4,2 и 3,2% случаев.

Метапневмовирусная инфекция осложнялась острым отитом в 2,8% случаев, РС-инфекция — в 1,2%.

Однако наблюдались и различия в клиническом проявлении инфекций. Так, обструктивный бронхит чаще диагностировался при РС-инфекции, чем при hMPV-инфекции — у 16 и 6% инфицированных соответственно ($p=0,0007$). При hMPV-инфекции ларинготрахеит встречался гораздо чаще, чем при РС-инфекции (26 vs 7%, $p<0,0001$).

Профилактика инфекций. hRSV и hMPV инфекции являются антропонозами. Источником распространения инфекций служат больные люди. Специальных исследований не проводилось, однако очевидными являются аэрозольный механизм передачи возбудителя, реализующийся посредством воздушно-капельного, воздушно-пылевого, контактного и контактно-бытового путей передачи. Распространение возбудителя происходит, главным образом, посредством крупных капель респираторных секретов, в связи с чем,

для передачи инфекции требуется тесный или продолжительный контакт с больным. Кроме того, происходит инфицирование рук при контакте с загрязненными секретами больных, предметами и поверхностями с последующим переносом возбудителя на слизистые оболочки носа или конъюнктиву глаз.

Таким образом, основным средством профилактики служит выполнение гигиенических процедур, обеспечивающих чистоту рук, формирование навыков правильного поведения и использование средств противоаэрозольной защиты.

В 1960-х годах были предприняты попытки разработки цельно-вирионной инактивированной вакцины против РС-инфекции, однако вследствие ее низкого защитного эффекта и отягощения течения инфекции (госпитализации и летальные исходы у младенцев) при последующем инфицировании природным РС-вирусом, она не нашла применения в клинической практике [31, 32].

Основными нейтрализующими и протективными антигенами РС-вируса являются гликопротеины F и G. Протеин G hMrv, в отличие от РС-вируса, не содержит вирус-нейтрализующих и протективных эпитопов, эти свойства присущи только протеину F [43].

В настоящее время в качестве специфической профилактики РС-инфекции проводят ежемесячную (до 5 доз) пассивную иммунизацию гуманизованными моноклональными антителами IgG1 против нейтрализующих эпитопов протеина F, которая рекомендуется для детей, имеющих при рождении повышенный риск тяжелого течения инфекции и осложнений. Эта мера не предотвращает инфицирования и передачу инфекции, однако в сравнении с плацебо снижает на 55% уровень госпитализации по поводу РС-инфекции недоношенных младенцев (до 35 недели гестации) [21]. Средства специфической профилактики hMrv-инфекции не разработаны.

Инфекция, вызываемая пневмовирусами, регистрируется на протяжении всех сезонов года с преобладанием в циркуляции РС-вируса, для которого наблюдается цикличность. Практически не вызывая инapparантной инфекции, оба патогена вызывают ОРЗ как у детей, так и у взрослых. Однако нами отмечено, что hRSv имеет большее значение при заболевании детей, главным образом младше 6 лет, тогда как hMrv — взрослых. Представители нового семейства пневмовирусов, имея много общего в строении вирионов и структуре генома и обладая набором одинаковых факторов патогенности, вызывают клинически сходную инфекцию. Как при hRSv, так и hMrv-инфекции с практически одинаковой частотой диагностируется поражение нижних отделов дыхательных путей, что отражает их важную роль в этиологии ОРЗ. При инфекции, вызванной пневмовирусами, могут наблюдаться симптомы, сходные с гриппом, что требует дифференциальной лабораторной диагностики. В сравнении с hMrv, РС-вирус имеет дополнительные факторы патогенности, повышающие его вирулентность, что обуславливает более тяжелые заболевания и смертность младенцев. Помимо этого, отмечена более широкая распространенность РС-вируса в популяции детей, одной из причин которой может являться формирование нестойкого секреторного (IgA) иммунитета после перенесенной инфекции [15, 22], что способствует повторным эпизодам инфекции [19]. Уровень специфических антител к hRSv падает за год в 4 раза [19], что может объяснять зарегистрированную нами цикличность заболеваемости с интервалом между подъемами чуть меньше года. В условиях отсутствия

специфической профилактики, эффективно ограничивающей распространение возбудителей, необходимо большое значение уделять неспецифической профилактике данных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яцышина С.Б., Спичак Т.В., Ким С.С., Воробьева Д.А., Агеева М.Р., Горелов А.В., Учайкин В.Ф., Покровский В.И. Выявление респираторных вирусов и атипичных бактерий у больных пневмонией и здоровых детей за десятилетний период наблюдения. Журнал педиатрии им. Сперанского. 2016, 95 (2): 43-50.
2. Bitko V., Shulyayeva O., Mazumder B. et al. Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *J. Virol.* 2007, 81 (4): 1786-1795.
3. Bont L., Checchia P.A., Fauroux B. et al. Defining the epidemiology and burden of severe respiratory syncytial virus infection among infants and children in Western Countries. *Infect. Dis. Ther.* 2016, 5 (3): 271-298.
4. Bose M.E., He J., Shrivastava S. et al. Sequencing and analysis of globally obtained human respiratory syncytial virus A and B genomes. *PLoS One.* 2015, 10(3): e0120098. Published online 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0120098.
5. Collins P.L., Dickens L.E., Buckler-White A. et al. Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986, 83 (13): 4594-4598.
6. Collins P.L., Fearn R., Graham B.S. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013, 372: 3-38.
7. Collins P.L., Graham B.S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J. Virology.* 2008, 82 (5): 2040-2055.
8. Collins P.L., Hill M.G., Cristina J. et al. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996, 93 (1): 81-85.
9. de Graaf M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. et al. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *J. Gen. Virol.* 2008, 89: 2933-2942.
10. Ditt V., Lusebrink J., Tillmann R. L. et al. Respiratory infections by HMPV and RSV are clinically indistinguishable but induce different host response in aged individuals. *PLoS One* 2011; 6: e16314.
11. Dokos C., Masjosthusmann K., Rellensmann G. et al. Fatal human metapneumovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 2013, 15: 97-101.
12. Edwards K.M., Zhu Y., Griffin M.R. et al. New vaccine surveillance network. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *New Engl. J. Med.* 2013, 368: 633-643.
13. Englund J.A., Boeckh M., Kuypers J. et al. Brief communication: fatal human metapneumovirus infection in stem-cell transplant recipients. *Ann. Intern. Med.* 2006, 144: 344-349.
14. Eshaghi A., Duvvuri V.R., Lai R. et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS ONE.* 2012;7(3):e32807. doi:10.1371/journal.pone.0032807.
15. Falsey A.R., Singh H.K., Walsh E.E. Serum antibody decay in adults following natural respiratory syncytial virus infection. *J. Med. Virol.* 2006, 78: 1493-1497.
16. Falsey A.R., Hennessey P.A., Formica M.A. et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *New Engl. J. Med.* 2005, 352: 1749-1759.
17. Fearn R., Collins P.L. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J. Virol.* 1999, 73 (7): 5852-5864.
18. Gould P.S., Easton A.J. Coupled translation of the second open reading frame of M2 mRNA is sequence dependent and differs significantly within the subfamily Pneumovirinae. *J. Virol.* 2007, 81 (16): 8488-8496.
19. Habibi M.S., Jozwik A., Makris S. et al. Mechanisms of severe acute influenza consortium investigators. Impaired antibody-mediated protection and defective IgA B-cell memory in experimental infection of adults with respiratory syncytial virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015, 191: 1040-1049.

20. Haerskjold A., Kristensen K., Kamper-Jørgensen M. et al. Risk factors for hospitalization for respiratory syncytial virus infection: a population-based cohort study of Danish children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016, 35: 61-65.
21. Hall CB. The burgeoning burden of respiratory syncytial virus among children. *Infect. Disord Drug. Targets.* 2012, 12:92-97.
22. Hall C.B., Walsh E.E., Long C.E. et al. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 1991, 163:693-698.
23. Hall C.B., Weinberg G.A., Iwane M.K. et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *New Engl. J. Med.* 2009, 360: 588-598.
24. Hasvold J., Sjoding M., Pohl K. et al. The role of human metapneumovirus in the critically ill adult patient. *J. Crit. Care.* 2016, 31 (1): 233-237.
25. Jansen R.R., Wieringa J., Koekkoek S.M. et al. Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cutoff values. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49: 2631-2636.
26. Jartti T., Jartti L., Peltola V. et al. Identification of respiratory viruses in asymptomatic subjects: asymptomatic respiratory viral infections. *Pediatr. Infect. Dis J.* 2008, 27: 1103-1107.
27. Jeffree C.E., Rixon H.W., Brown G. et al. Distribution of the attachment (G) glycoprotein and GM1 within the envelope of mature respiratory syncytial virus filaments revealed using field emission scanning electron microscopy. *Virology.* 2003, 306 (2): 254-267.
28. Johnson J.E., Gonzales R.A., Olson S.J. et al. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Modern Pathology.* 2007, 20 (1): 108-119.
29. Johnson S.M., McNally B.A., Ioannidis I. et al. Respiratory syncytial virus uses CX3CR1 as a receptor on primary human airway epithelial cultures. *PLoS Pathog.* 2015 Dec 11; 11(12):e1005318. doi: 10.1371/journal.ppat.1005318.
30. Kahn J.S. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19: 546-557.
31. Kapikian A.Z., Mitchell R.H., Chanock R.M. et al. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 1969, 89 (4): 405-401.
32. Kim H.W., Canchola J.G., Brandt C.D. et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 1969, 89 (4): 422-434.
33. Lamb R.A., Jardetzky T.S. Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2007, 17 (4): 427-436.
34. Lifland A.W., Jung J., Alonas E. et al. Human respiratory syncytial virus nucleoprotein and inclusion bodies antagonize the innate immune response mediated by MDA5 and MAVS. *J. Virol.* 2012, 86 (15): 8245-8258.
35. Morrison T.G. The three faces of paramyxovirus attachment proteins. *Trends Microbiol.* 2001, 9 (3): 103-105.
36. Nair H., Nokes D.J., Gessner B.D. et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010, 375: 1545-1555.
37. Nolan T., Borja-Tabora C., Lopez P. et al. Prevalence and incidence of respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in children aged 6 months to 10 years with influenza-like illness enrolled in a randomized trial. *Clin. Infect. Dis.* 2015, 11 (60): 80-89.
38. Paes B.A., Mitchell I., Banerji A. et al. A decade of respiratory syncytial virus epidemiology and prophylaxis: Translating evidence into everyday clinical practice *Can Respir. J.* Published online. 2011, 18 (2): e10-e19.
39. Peret T.C., Hall C.B., Schnabel K.C. et al. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J. Gen. Virol.* 1998, 79 (Pt 9): 2221-2229.
40. Ren J., Wang Q., Kolli D. et al. Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits innate cellular signalling by targeting MAVS. *J. Virol.* 2012, 86: 13049-13061.
41. Schildgen V., van den Hoogen B., Fouchier R. et al. Human metapneumovirus: lessons learned over the first decade. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011, 24 (4): 734-754.
42. Schuster J.E., Williams J.V. Human metapneumovirus. *Pediatr. Rev.* 2013, Dec; 34 (12): 558-565.

43. Skiadopoulos M.H., Biacchesi S., Buchholz U.J. et al. Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology*. 2006, 345: 492-501.
44. Spann K.M., Collins P.L., Teng M.N. Genetic recombination during coinfection of two mutants of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 2003, 77 (20): 11201-11211.
45. Stein R.T., Bont L.J., Zar H. et al. Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Pediatr. Pulmonol.* 2017, 52 (4): 556-569.
46. Swedan S., Andrews J., Majumdar T. et al. Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location. *J. Virol.* 2011, 85 (19): 10090-10100.
47. Thorburn K. Pre-existing disease is associated with a significantly higher risk of death in severe respiratory syncytial virus infection. *Arch. Child.* 2009, 94: 99-103.
48. Tripp R.A., Jones L.P., Haynes L.M. et al. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat. Immunol.* 2001, 2 (8): 732-738.
49. van den Hoogen B.G., de Jong J.C., Groen J. et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* 2001, 7: 719-724.
50. van den Hoogen B.G., Herfst S., Sprong L. et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2004, 10: 658-666.
51. Venter M., van Niekerk S., Rakgantsa A. et al. Identification of deletion mutant respiratory syncytial virus strains lacking most of the G protein in immunocompromised children with pneumonia in South Africa. *J. Virol.* 2011, 85 (16): 8453-8457.
52. Williams J.V., Harris P.A., Tollefson S.J. et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *New. Engl. J. Med.* 2004, 350: 443-450.
53. Williams J.V., Wang C.K., Yang C.F. et al. The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. *J. Infect. Dis.* 2006, 193: 387-395.
54. Yang C.F., Wang C.K., Tollefson S.J. et al. Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. *Virol. J.* 2009. 6:138. doi: 10.1186/1743-422X-6-138.

Поступила 10.05.17

Контактная информация: Яцышина Светлана Борисовна, к.б.н.,
111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а, р.т. (495)974-69-46

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*И.Г.Карнаухов¹, Н.Б.Челдышова¹, А.К.Гражданов¹, А.А.Крицкий¹,
С.П.Заднова¹, О.В.Кедрова¹, А.В.Иванова¹, В.П.Топорков¹,
Н.И.Смирнова¹, А.Boiro², S.Boombali², М.У.Boiro², В.В.Кутырев¹*

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИТУАЦИИ ПО ХОЛЕРЕ НА ТЕРРИТОРИИ АФРИКИ И ПРОБЛЕМЫ ПРОФИЛАКТИКИ

¹Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия; ²Исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика

В настоящее время Африканский континент является одним из наиболее пораженных холерой регионов мира. Ежегодно холерой в Африке заболевают более 55 000 человек. В обзоре проведен сравнительный анализ эпидемических проявлений текущей пандемии, вызванной холерными вибрионами Эль Тор биовара, и шести предыдущих пандемий, вызванных холерными вибрионами классического биовара. Рассмотрены причины масштабного распространения холеры на Африканском континенте в современный период и проблемы ее профилактики.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 105—113

Ключевые слова: холера, пандемия, эпидемия, эпидемические проявления, холерные вибрионы классического и Эль Тор биовара

*I.G.Karnaukhov¹, N.B.Cheldyshova¹, A.K.Grazhdanov¹, A.A.Krizky¹,
S.P.Zadnova¹, O.V.Kedrova¹, A.V.Ivanova¹, V.P.Toporkov¹,
N.I.Smirnova¹, A.Boiro², S.Boumbali², M.Y.Boiro², V.V.Kutyrev¹*

EPIDEMIC ANALYSIS ON CHOLERA IN AFRICA AND PROBLEMS OF PROPHYLAXIS

¹Russian Research Institute for Plague Control «Microb», Saratov, Russia; ²Institute of Applied Biology, Kindiya, Republik of Guinea

Presently Africa is one of the most affected regions of the world as regards cholera. More than 55 000 people are infected every year. The review contains the data on comparative assessment of epidemic manifestations associated with the current pandemic, caused by *Vibrio cholerae* biovar El Tor, and the preceding six pandemics, the agent of which was cholera vibrios of classical biovar. Studied have been the factors of large-scale cholera dissemination in Africa in the modern period and problems of its prophylaxis.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No.6, P. 105—113

Key words: cholera, pandemic, epidemic, epidemic manifestations, cholera vibrios of classical and El Tor biovars

Холера — особо опасная инфекционная болезнь, характеризующаяся профузной диареей и пандемическим распространением. Всего насчитывается 7 пандемий холеры, первые шесть из которых были вызваны холерными вибрионами классического биовара. Причиной последней 7 пандемии холеры, продолжающейся в настоящее время, являются штаммы холерного вибриона биовара Эль Тор [8, 12].

Впервые азиатская холера, вызванная холерными вибрионами классического биовара, появилась в Африке еще в 1820 г. в период первой пандемии, когда эпидемические проявления были зарегистрированы на восточном побережье континента [2]. Распространение холеры по странам Африки в период второй пандемии (1836 — 1837 гг.) происходило двумя волнами: вначале болезнь была занесена на северо-западное побережье в Марокко, а затем вторая волна стала распространяться вдоль побережья Индийского океана, поразив восточный регион — Сомали, Кению и Танзанию. В результате погибли более 70 тыс. человек [27]. Во время третьей пандемии в 1848 г. холера проникла в Египет, вызвав там обширную эпидемию и унеся более 30 тыс. человеческих жизней. Впоследствии инфекция распространилась по Нилу в северную часть Египта и Судан [27]. Эпидемии холеры наблюдались также в Уганде и Занзибаре в 1858 — 1859 гг. [13]. В период четвертой пандемии холера, попав в 1868 — 1870 гг. на континент через Марокко, получила широкое распространение в странах Северной (Тунис и Алжир) и Западной Африки (Сенегал, Гамбия, Португальская Гвинея (ныне Гвинея-Бисау), а затем и на востоке континента — в Эфиопии, Танзании, Сомали, Мозамбике, на Занзибаре, Мадагаскаре и других островах Индийского океана. Во время пятой пандемии холера несколько раз была занесена на территорию Африки различными путями. Первый раз в 1883 г. холера попала в Египет с паломниками из Мекки и унесла 58 тыс. жизней. Вторая волна холеры началась в 1893 — 1896 гг. и была более масштабной, захватив Ливию, Тунис, Алжир, Марокко, Судан, Египет и французскую часть Западной Африки, ныне включающей Кот-д'Ивуар, Буркина-Фасо, Гвинею, Нигер, Мавританию, Бенин,

Сенегал, Мали [13]. Шестая пандемия холеры на Африканском континенте затронула лишь Египет, унеся в 1902 г. более 34 тыс. человеческих жизней [9].

Последняя эпидемия азиатской холеры в Африке наблюдалась в межпандемический период (в 1947 г.) в Египте и была вызвана отступлением английских войск с зараженных холерой индийских и пакистанских территорий [9]. Было установлено 32 тыс. случаев заболеваний и 20 тыс. смертей. С 1947 по 1970 гг. холера в Африке не регистрировалась.

Таким образом, вспышки и эпидемии классической холеры на Африканском континенте регистрировали в период всех пандемий, но они имели исключительно завозной характер. Завоз холерных вибрионов происходил либо паломниками, следовавшими с караванами из Мекки, либо морским путем на торговых судах [13].

Впервые холерный вибрион биовара Эль Тор был занесен в Африку в 1970 г. двумя независимыми путями: с паломником из Мекки на самолете в г. Конакри, Гвинея (Западная Африка) и на торговых судах из стран Ближнего Востока в Сомали, Эфиопию и Джибути (Восточная Африка) [18]. Вскоре вспышки холеры стали отмечать и в других странах Африки — Ливии, Тунисе, Алжире, Марокко, Кении, Уганде, Анголе и др. К концу 1971 г. о случаях холеры сообщили 25 стран Африки [27].

При этом наиболее широкое распространение холера получила в странах Западной Африки (в Сьерра-Леоне, Либерии, Код-д'Ивуаре, Гане, Того, Бенине (Дагомея), Нигерии и др.), что могло быть связано с отсутствием иммунной прослойки у населения, так как ранее холера в большинстве этих стран не регистрировалась. Эпидемии охватили 15 из 16 стран Западной Африки, за период 1970 — 1980 гг. здесь были зарегистрированы 87 486 больных холерой [29].

В целом, по данным ВОЗ, с 1970 по 1980 гг. холера была выявлена в 36 из 54 стран Африки, количество заболевших составило 185 591 человек, а количество умерших — 19 583 человека.

В период с 1981 по 1990 гг. происходит смещение эпицентра проявлений холеры с запада на восток континента, при этом идет формирование 12 вторичных эндемичных очагов в Восточной (Бурунди, Танзания, Руанда, Кения, Мозамбик), Западной (Гана, Либерия, Нигерия), Центральной (Ангола, Камерун, Демократическая Республика Конго (ДРК)) и Южной Африке (ЮАР). Общее количество больных холерой увеличивается в 1,8 раза по сравнению с предыдущим десятилетием [4, 29]. В 1982 году Африканский континент впервые становится лидером по числу случаев холеры, оставив позади страны Азии и Европы.

Начиная с 1991 г. количество случаев холеры в мире увеличилось в 8 раз по сравнению с 1990 г. и в 3,4 раза по сравнению с 1971 г. Вероятно, указанный подъем заболеваемости холерой в Африке был связан с появлением штаммов холерного вибриона, которые в результате горизонтального переноса приобрели гены антибиотикорезистентности, локализованные на мобильных генетических элементах, таких как SXT-элемент, плаزمиды IncS, интегроны I и II класса и др. [11, 22, 23, 26].

Наибольшее количество случаев холеры наблюдалось в Южной Америке. В Африке заболеваемость холерой с 1991 по 2000 гг. также выросла в 4 раза по сравнению с 1981 — 1990 гг. и в 7,5 раза по сравнению с 1971 — 1980 гг.

Всего за период с 1991 по 2000 гг. о случаях холеры сообщило 43 из 60 африканских государств [12, 29]. Среднее количество стран, ежегодно поражаемых холерой, в 1991 — 2000 гг. увеличилось в 1,5 раза по сравнению с 1971 по 1990 гг. Пик эпидемических проявлений холеры в Африке пришелся на 1998 — 1999 гг., когда было зарегистрировано 418 494 случая холеры и 18584 летальных исхода. Наиболее пораженными оказались территории таких стран, как ДРК, Кения, Малави, Мозамбик, Нигерия, Уганда и Танзания [28]. По данным литературы, именно в этот период на территории Африки (в Мозамбике и Зимбабве) впервые были зарегистрированы новые варианты возбудителя холеры Эль Тор, возникшие в Юго-Восточной Азии, несущие профаг СТХф^{Class} с генами холерного токсина холерных вибрионов классического биовара [18].

С 2001 по 2010 гг. в мире наблюдалось снижение уровня заболеваемости холерой в 1,7 раза, в то время как в Африке этот показатель, наоборот, вырос в 1,2 раза. За этот период еще 17 стран Африки (Замбия, Зимбабве, Малави, Сомали, Уганда, Эфиопия, Бенин, Гвинея, Гана, Гвинея-Бисау, Нигер, Сенегал, Сьерра-Леоне и другие) были отнесены к эндемичным по холере [6]. Этот подъем заболеваемости, видимо, был вызван множественными заносами на континент новых геновариантов, несущих гибридный профаг СТХф^{Hybrid}, которые совмещали гены холерных вибрионов 2 биоваров: классического (ctxB1) и Эль Тор (rstR^{ElTor}) [16, 21].

Очередной подъем заболеваемости холерой в мире наблюдался в 2011 г. и был связан с крупной эпидемией холеры на Гаити, которая была вызвана геновариантами, образованными в более поздний период их эволюции, несущими новую аллель гена ctxB7, отличающуюся от ctxB1 наличием замены цитозина на аденин (C/A) в позиции 58 [10]. В Африке в 2011 г. количество случаев холеры также увеличилось, но не превысило 32% от общемирового уровня. В последние 5 лет на Африканском континенте наблюдается тенденция на снижение уровня заболеваемости холерой. Однако Африка продолжает оставаться регионом с наиболее высоким уровнем заболеваемости холерой и летальности.

Одной из стран, где холера, начиная с 1994 г., регистрируется практически ежегодно (за исключением 1997 и 2010 гг.), является Республика Гвинея [1, 5, 29]. Как уже отмечалось, первая эпидемия холеры Эль Тор наблюдалась в 1970 году, когда заболели 6378 человек, 518 из которых умерли [1]. Три следующие эпидемии происходили с промежутками в 8 лет (в 1978, 1986 и 1994 гг.) и оказались более масштабными: было зарегистрировано от 9 тыс. до 31 тыс. случаев холеры. Наиболее крупная эпидемия имела место в прибрежной части Нижней Гвинеи в 1994 году, когда заболели 31 442 человека, 676 из которых умерли. При этом заносы холерного вибриона на территорию Гвинеи были официально зарегистрированы лишь дважды — в 1994 и 2012 гг. [1, 25]. В связи с этим, Гвинейская Республика была отнесена к эндемичным по холере территориям.

Последняя эпидемия холеры в Гвинее 2012 года была связана с заносом инфекции рыбаками из Сьерра-Леоне и охватила 6 из 7 провинций Республики Гвинея (Киндия, Боке, Фарана, Канкан, Маму и Нзерегоре) и столицу Конакри, поразив 7351 человека и унеся 138 человеческих жизней (1,8%) [1]. В последующие годы отмечено резкое снижение числа случаев заболевания холерой: 319 — в 2013 г., 2 — в 2014 г., 0 — в 2015 г. и 2016 г. Снижение заболе-

ваемости холерой связывают, во-первых, с повышением уровня санитарной грамотности населения и эффективными профилактическими мерами, предпринимаемыми в рамках борьбы с эпидемией лихорадки Эбола, во-вторых — с массовой превентивной иммунизацией 96% населения страны вакциной Shanchol в 2014 г. [1].

Седьмая пандемия холеры значительно отличается от всех предшествующих пандемий как по характеру течения эпидемического процесса, так и по длительности существования эпидемических очагов. В отличие от классической холеры, которая, проникнув на Африканский континент, вызывала эпидемии и вспышки холеры длительностью в среднем не более 5 — 6 лет, а потом бесследно исчезала до нового заноса, холера Эль Тор в короткие сроки широко распространилась и укоренилась на континенте, поразив более 50 стран во всех его регионах и сформировав более 20 вторичных эндемичных очагов.

Столь масштабному эпидемическому распространению холерного вибриона биовара Эль Тор, несомненно, способствовали неоднократные заносы на континент новых вариантов возбудителя, несущих гены антибиотикорезистентности и синтезирующих холерный токсин классического типа. Этому же благоприятствовали и негативные социальные и санитарно-гигиенические факторы, сложившиеся на Африканском континенте. Социальными факторами, способствующими распространению холеры, являются низкий уровень жизни, недостаток квалифицированной медицинской помощи, частые гражданские войны, приводящие к массовой миграции населения, проживание в лагерях беженцев в условиях высокой плотности населения, недостатка воды и отсутствия санитарно-гигиенических средств [13, 20]. Санитарно-гигиенические факторы, такие как низкий уровень санитарной культуры населения, отсутствие элементарных гигиенических навыков (мытьё рук с мылом), отсутствие во многих странах Африканского континента систем централизованного водоснабжения и канализации также способствуют распространению инфекции [13, 20, 24]. Важную роль в развитии вспышек холеры в Африке играют и погодные-климатические и географические факторы. Так, в странах, расположенных в непосредственной близости от экватора, вспышки холеры отмечаются чаще и приводят к большему количеству случаев заболевания [14]. В Западной Африке эндемичные по холере территории располагаются вдоль прибрежных морских лагун с влажным тропическим климатом, откуда холера в периоды эпидемий распространяется на речные и пустынные районы [4, 24]. В Центральной и Восточной Африке эндемичные регионы в основном сосредоточены в области Великих Африканских озер (Рудольф, Виктория, Танганьика, Ньяса, Эдуард, Альберт и Киву) и озера Чад, являющихся естественными резервуарами для холерных вибрионов. В Южной Африке распространению холеры способствует река Лимпопо [16, 17, 21].

Вспышки холеры чаще отмечаются в дождливые и засушливые сезоны. В сезон дождей переполненные реки заливают стоки и выгребные туалеты, в результате чего загрязненная вода попадает в источники водоснабжения (колодцы, реки, пруды и озера) [20, 24]. Особенно высокий уровень осадков наблюдается в годы Эль-Ниньо, когда на фоне повышения температуры поверхностного слоя воды происходит усиленное размножение фито- и зоопланктона, являющегося питательной средой для холерного вибриона [21, 24].

В засушливые периоды вероятность возникновения эпидемии холеры также возрастает в среднем на 15 — 29% при увеличении температуры воздуха на 1°C за счет уменьшения запасов питьевой воды и неурожаев, вызывающих массовые народные волнения и войны, а также миграцию населения [24, 27, 28]. Помимо указанных факторов большое значение для развития холеры имеет недостаток в питании витамина А и белка, а также гипохлоридрии, вызванной бактерией *Helicobacter pylori*, эндемичной для многих африканских стран [15, 21].

Сравнительный анализ динамики развития холеры в Африке и в России наглядно подтверждает, что укоренение холеры, вызванной холерными вибрионами Эль Тор биовара, стало возможным на Африканском континенте только благодаря совокупности различных факторов. Так, в период седьмой пандемии холера Эль Тор впервые одновременно появилась в Африке и России в 1970 г., но дальнейшая ее судьба оказалась различной. В отличие от Африки, где холера вот уже 50 лет проявляется ежегодно, вызывая обширные вспышки и эпидемии, в России серьезные эпидемические проявления регистрировались лишь первые 3 — 4 года и имели ограниченное распространение, позже отмечались отдельные вспышки либо единичные заболевания, затем холера исчезала до следующего заноса. На большинстве территорий длительность эпидемических осложнений не превышала 1 — 4 года [9]. Вторичных очагов холеры, характерных для Африканского континента, на территории России также не сформировалось [6, 9].

Таким образом, именно совокупность биологических свойств холерного вибриона биовара Эль Тор, социальных, санитарно-гигиенических и природно-климатических факторов, сложившихся на Африканском континенте, явилось причиной длительной циркуляции холерного вибриона биовара Эль Тор на территории Африки и развития эпидемических осложнений по холере.

На сегодняшний день Африканский континент является наиболее пораженным холерой регионом мира, которая составляет серьезную проблему для здравоохранения многих африканских стран. Отсюда проведение мероприятий по санитарной охране территории отдельных государств этой части света связано с чрезвычайными сложностями. Обычные меры по своевременному выявлению заносов холеры уже явно не достаточны, поскольку во многих странах Африканского континента сформировались эндемичные очаги холеры и заболевания холерой регистрируют почти ежегодно без заносов извне, что позволяет говорить об укоренении здесь этой инфекции. Профилактика холеры в данном регионе должна быть направлена на весь комплекс факторов, способствующих распространению и укоренению холеры (социальные, санитарно-гигиенические и др.).

В целом почти для каждой африканской страны актуальны проблемы устойчивого экономического развития, борьбы с бедностью и решения социальных задач, благоустройства населенных мест, обеспечения гарантированной питьевой водой и адекватной системой очистки сточных вод.

Важным компонентом является формирование в странах Африки национальных систем надзора и профилактики холеры, которые должны иметь строго определенную законодательную, правовую и методическую базу [7]. Основные принципы государственного эпидемиологического надзора должны соответствовать Международным медико-санитарным правилам (2005) и

отвечать международным требованиям и нормам. Первоочередной задачей является подготовка целевых Государственных программ борьбы с холерой, которые будут предусматривать все элементы систематического лабораторного и эпидемиологического мониторинга за опасной инфекционной болезнью в масштабе страны. Для эффективного достижения поставленных в программе целей и унификации подхода важна разработка информационно-методических документов, обязательных для выполнения на территории всей страны. С учетом социальных и климатогеографических особенностей отдельных провинций внутри страны необходимо составление региональных комплексных планов профилактики холеры. Следующим важным этапом профилактики холеры должна стать выработка тактики дифференцированного для различных административных территорий эпидемиологического надзора [7], для чего необходимо провести районирование территорий государств по эпидемиологическим проявлениям холеры. Согласно рекомендациям ВОЗ в государствах или регионах, где осуществление экстренных и текущих профилактических мероприятий в полном объеме по разным причинам затруднено, необходимо планировать и обязательно проводить вакцинацию населения против холеры.

Так, в рамках сотрудничества России и Гвинейской Республики по проблеме борьбы с опасными инфекционными болезнями Национальному агентству санитарной безопасности Республики Гвинея передано в дар 5 тысяч доз вакцины холерной бивалентной химической, произведенной в Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб» Роспотребнадзора.

Плановые профилактические противохолерные мероприятия должны иметь государственный характер, и проводить их необходимо ежегодно в масштабе всей страны. Выполнение таких планов станет возможным только на основе улучшения общего медицинского обслуживания и обучения населения гигиеническим навыкам. В каждой стране необходимо укрепление национальной лабораторной сети, специальное обучение медицинских кадров, создание госпитальной базы на случай эпидемических осложнений (холерные госпитали). В эндемичных по холере районах нужны особые меры, в том числе формирование центральных групп быстрого реагирования с использованием мобильных лабораторных комплексов.

Деятельность по предупреждению холеры в странах Африки должна быть непрерывной. Основу такой работы составляет взаимное обязательное взаимное информирование всех звеньев, участвующих в борьбе с холерой, для своевременного введения в действие всего комплекса мероприятий для обнаружения, локализации и ликвидации очагов опасной болезни.

Миграция населения — один из ведущих факторов развития эпидемий [5], поэтому важно предусмотреть возможность миграционных процессов в конкретных странах и возникновения политической нестабильности. Составление сезонных и долгосрочных прогнозов эпидемических проявлений холеры позволит более объективно планировать профилактические и противоэпидемические мероприятия в странах Африки и в случае ухудшения ситуации своевременно обращаться за помощью в международные организации.

Эффективной может быть и помощь отдельной страны. Наглядным примером этого стали результаты участия российских медиков в ликвидации эпидемии лихорадки Эбола в Гвинейской Республике [3].

Таким образом, возникновению и существованию стойких эндемичных очагов холеры на территории Африканского континента способствует совокупность таких факторов, как биологические свойства возбудителя, социальные и санитарно-гигиенические особенности, а также ряд других факторов, которые в большинстве своем не могут быть устранены усилиями только самих африканских государств и требуют участия международных организаций. Одной из первоочередных задач для обеспечения контроля за холерой и предотвращения вспышек заболевания является создание национальных систем эпидемиологического надзора и профилактики холеры и внедрение современных молекулярно-генетических методов диагностики, что позволит повысить эффективность противоэпидемических мероприятий. В этой связи, необходимо продолжение разработки научных основ противохолерных мероприятий с учетом местных условий каждой страны и Африканского континента в целом, а также полученных в процессе мониторинга и молекулярно-генетических исследований новых данных об эпидемиологических особенностях современной холеры Эль Тор и ее возбудителя.

Работа выполнена в рамках реализации распоряжения Правительства Российской Федерации от 25.07.2015 г. № 1448-р.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буаро М.И., Константинов О.К., Бумбали С., Ришар Ж., Лама Н.Е. Холера в Гвинее: эпидемиология, меры борьбы и профилактики. Инфекционные болезни. 2016, 14 (1): 24-28.
2. Ганин В.С. По тропам эпидемических катастроф. Иркутск, 2011.
3. Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора. Под ред. А.Ю. Поповой, В.В. Кутырева. М., Творческий информационно-издательский центр, 2016.
4. Марамович А.С., Пинигин А.Ф. Эндемичные очаги холеры в Африке. Журн. микробиол. 1995, 2 (Прил.): 101-108.
5. Москвитина Э.А., Горобец А.В., Прометной В.И. Эпидемиологическое значение миграции населения при холере. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2003, 1: 15-19.
6. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. Холера в начале XXI века. Прогноз на глобальном уровне. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 2012, 1 (111): 11-16.
7. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Титова С.В., Адаменко О.Л., Волопянов А.С., Волопянов С.О. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии. Вестник РАМН. 2015, 2: 249-256.
8. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2010, 4: 11-19.
9. Холера в СССР в период VII пандемии. Под ред. В.И.Покровского. М., 2000.
10. Adewale A.K., Pazhani G.P., Abiodun I.B. et al. Unique clones of *Vibrio cholerae* O1 El Tor with haitian type ctxB allele implicated in the recent cholera epidemics from Nigeria, Africa. PLoS ONE. 2016, 11 (8): e0159794.
11. Dalsgaard A., Forslund A., Sandvang D. et al. *Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the aad2 gene located on class 1 integrons. J. Antimicrob. Chemother. 2001, 48: 827-838.
12. Faruque S.M., Nair G.B. *Vibrio cholerae* genomics and molecular biology. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2008.
13. Echenberg M.J. Africa in the time of cholera. New York, Cambridge University Press, 2011.
14. Emch M., Feldacker C., Islam M.S. et al. Seasonality of cholera from 1974 to 2005: a review of global patterns. Int. J. Health. Geogr. 2008, 20 (7): 31.

15. Harris J.B, LaRocque R.C., Chowdhury F. et al. Susceptibility to *Vibrio cholerae* infection in a cohort of household contacts of patients with cholera in Bangladesh. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008, 2 (4): e221.
16. Ismail H., Smith A.M., Tau N.P. et al. Cholera outbreak in South Africa, 2008–2009: Laboratory analysis of *Vibrio cholerae* O1 strains. *JID.* 2013, 208: 39–45.
17. Kaas R.S., Ngandjio A., Nzouankeu A. et al. The Lake Chad basin, an isolated and persistent reservoir of *Vibrio cholerae* O1: a genomic insight into the outbreak in Cameroon, 2010. *PLoS One.* 2016, 11 (5): e0155691.
18. Langa J.P., Sema C., Deus N.D. et al. Epidemic waves of cholera in the last two decades in Mozambique. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2015, 9 (6): 635–641.
19. Lan R., Reeves P.R. Pandemic spread of cholera: genetic diversity and relationships within the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism. *Clin. Microbiol. J.* 2002, 40 (1): 172–181.
20. Nair G. Cholera outbreaks. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* 2014, 379: 1–259.
21. Nkoko D.B., Giraudoux P., Plisnier P.-D. et al. Dynamics of cholera outbreaks in Great Lakes region of Africa, 1978–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, 17 (11): 2026–2034.
22. Opintan J.A., Newman M.J., Nsiah-Poodoh O.A. et al. *Vibrio cholerae* O1 from Accra, Ghana carrying a class 2 integron and the SXT element. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, 62: 929–933.
23. Pugliese N., Maimone F., Scarscia M. et al. SXT-related integrating conjugative element and IncC plasmids in *Vibrio cholerae* O1 strains in Eastern in Eastern Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, 63: 438–442.
24. Rebaudet S., Sudre B., Faucher B. et al. Environmental determinants of cholera outbreaks in inland Africa: a systematic review of its main transmission foci and propagation routes. *J. Infect. Dis.* 2013, 1 (208): 46–54.
25. Rebaudet S., Mengel M.A., Koivogui L. et al. Deciphering the Origin of the 2012 cholera epidemic in Guinea by integrating epidemiological and molecular analyses. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2014, 8 (6): 1–10.
26. Scarscia M., Pugliese N., Maimone F. et al. Cholera in Ethiopia in the 1990s: epidemiologic patterns, clonal analysis, and antimicrobial resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 2009, 299 (5): 367–372.
27. Swerdlow D.L., Isaacson M. Epidemiology of cholera in Africa. In: I.R. Wachsmuth, P.A. Blake, O. Olsvik (ed.). *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives.* ASM Press, Washington, D.C., 1994, p. 297–307.
28. Trærup S.L., Ortiz R.A., Markandya A. The costs of climate change: a study of cholera in Tanzania. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 2011, 8 (12): 4386–4405.
29. WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. WHO/CDS/CSR/ISR/2000/1. http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/WHO_CDS_CSR_ISR_2000_1/en/.

Поступила 25.04.17

Контактная информация: Иванова Александра Васильевна,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)26-21-31

ПРОБЛЕМНАЯ СТАТЬЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

В. В. Шкарин, О. В. Ковалишена, Н. В. Саперкин, О. Н. Шпрыкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ ПОЛИЭТИОЛОГИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

Инфекции, вызываемые условно патогенными микроорганизмами (УПМ), занимают особое положение. В микробных ассоциациях УПМ проще реализовать свой невысокий патогенный потенциал, потенцируя свойства друг друга. Группа полиэтиологических инфекций, вызываемых УПМ, достаточно разнообразна с точки зрения нозоформ и нозогрупп. В их число входят так называемые гнойно-септические инфекции (ГСИ), которые также весьма разнообразны и по клинико-эпидемиологическим, и этиологическим характеристикам. Научные данные демонстрируют актуальность проблемы полиэтиологических инфекций, особенно в хирургии, и свидетельствуют об отсутствии систематизированных данных о всем спектре и составе микробных ассоциаций при разных инфекциях, количественной оценке, недостаточном изучении свойств в сравнении с моновозбудителями. Проблема полиэтиологических инфекций практически не изучена с эпидемиологических позиций, только единичные исследования посвящены изучению внутрибольничного инфицирования микробными ассоциациями, не разработан микробиологический мониторинг. В связи с этим, требуется комплексное исследование полиэтиологических инфекций в сравнении с моноэтиологическими для выявления особенностей и разработки эпиднадзора и контроля.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 114—126

Ключевые слова: микробная ассоциация, гнойно-септическая инфекция, сочетанная этиология, эпидемиологический надзор

V. V. Shkarin, O. V. Kovalishena, N. V. Saperkin, O. N. Shpryko

GENERAL CHARACTERISTICS AND ISSUES MIXED INFECTIONS CAUSED BY OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS

State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia

Infections caused by opportunistic microorganisms occupy a special position. In microbial associations of opportunistic microorganisms is easier to implement its low pathogenic potential, activate properties of each other. Group polyetiologic infections caused by conditionally pathogenic microorganisms are quite diverse in terms of a nosological forms and groups. These include the so-called septic infection, which are also very diverse and clinical, epidemiological and etiological characteristics. Scientific evidence shows the urgency of the problem mixed infections, especially in surgery and indicate a lack of systematic data about the whole spectrum and the composition of microbial associations in different infections, quantification, insufficient study of the properties compared to monoagents. The problem mixed infections practically not been studied with epidemiologic standpoint, only a few studies devoted to the study of nosocomial infection of microbial associations are not developed microbiological monitoring. In this connection, you need comprehensive research mixed infections compared with monoagents to identify the characteristics and development of epidemiologic surveillance and control.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No 6, P. 114—126

Key words: microbial association, purulent septic infection, mixed etiology, surveillance

В проблематике полиэтиологических инфекционных заболеваний инфекции, вызываемые условно патогенными микроорганизмами, занимают особое положение. Прежде всего, это связано с тем, что сочетание условно патогенных микроорганизмов как этиологического фактора инфекций — явление распространенное, рассматриваемое даже как типичное для данной группы микроорганизмов [4, 10, 12 — 14, 16 — 18, 24, 28, 32, 36, 39, 46].

По результатам многочисленных исследований известно, что в сочетании друг с другом в микробных ассоциациях УПМ проще реализовать свой невысокий патогенный потенциал, потенцируя свойства друг друга [5, 7, 16, 23, 26, 28, 36, 39 — 43, 47]. Кроме того, возникая преимущественно у лиц с иммунодефицитными состояниями, инфекции, вызываемые УПМ, закономерно носят полиэтиологичный характер, поскольку такое состояние микроорганизма приводит к одномоментной активизации различных микроорганизмов, присутствующих в хронических очагах инфекций, а также колонизирующих кожу и слизистые оболочки респираторного и желудочно-кишечного трактов. Полиэтиологичные инфекции, вызываемые УПМ, достаточно подробно изучены с точки зрения их клинико-этиологической характеристики и даже эпидемиологических особенностей, что отличает данную группу от других [4, 10, 12 — 14, 17, 18, 25, 27, 28, 30, 31, 36, 38, 39, 44, 45].

Полимикробные заболевания, вызываемые множеством УПМ, имеют большое число синонимов: «комплексные», «осложненные», «микст», «смешанные», «вторичные», «синергичные», «конкурентные», «коинфекции» [39]. Смешанные инфекции, вызываемые условно патогенной флорой, широко распространены среди животных и людей, к ним относятся абсцессы, СПИД-ассоциированные оппортунистические инфекции, конъюнктивиты, отиты, периодонтиты, респираторные заболевания, болезни половой сферы и др. По разным оценкам, на долю полиэтиологичных инфекций приходится 30-84% всех инфекций [12, 31, 39, 45].

Группа полиэтиологичных инфекций, вызываемых УПМ, достаточно разнообразна с точки зрения нозоформ и нозогрупп. В их число входят так называемые гнойно-септические инфекции (ГСИ), которые также разнообразны по клинико-эпидемиологическим и этиологическим характеристикам. ГСИ различаются по условиям возникновения и поражаемому контингенту, например, ГСИ новорожденных и родильниц, которые могут носить внутриутробный и внутрибольничный характер, или ГСИ у хирургических пациентов, которые могут быть внебольничными и связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Различают также первичные и вторичные ГСИ. Все эти различия по условиям возникновения и поражаемому контингенту находят отражение как в этиологических особенностях, так и в клинической картине и эпидемиологических характеристиках инфекций, что определяет сложности эпидемиологического надзора и контроля. ИСМП, включая и полиэтиологичные ИСМП, являются одной из актуальных проблем современного здравоохранения [20]. При всем их этиологическом разнообразии смешанным вариантам уделяется особое внимание.

Научные данные, полученные отечественными и зарубежными исследователями, с одной стороны, демонстрируют актуальность проблемы поли-

этиологических инфекций, особенно в хирургии, а с другой стороны, свидетельствуют о разноречивости полученных результатов и недостаточной изученности этой проблемы на теоретическом и практическом уровне: нет систематизированных данных о спектре микробных ассоциаций при разных инфекциях, не полностью расшифрован их состав, отсутствует количественная оценка, недостаточно представлены свойства в сравнении с моновозбудителями. Проблема полиэтиологических инфекций практически не изучена с эпидемиологических позиций, только единичные исследования посвящены изучению внутрибольничного инфицирования микробными ассоциациями, не разработан микробиологический мониторинг. В связи с этим, требуется комплексное исследование полиэтиологических инфекций в сравнении с моноэтиологическими для выявления особенностей и разработки эпиднадзора и контроля.

Цель данной проблемной статьи — на основе обобщения результатов собственных многолетних исследований и имеющихся научных данных определить общие характеристики полиэтиологических инфекций, вызываемых УПМ, их отличительные особенности по сравнению с другими полиэтиологическими инфекциями, а также обозначить неясные и дискуссионные вопросы, требующие дальнейшего изучения

Источниками научной информации являлись опубликованные за последние 15 лет научные статьи по проблематике полиэтиологических инфекций, вызываемых УПМ (включая гнойно-септические инфекции и ИСМП). В качестве источников информации выступали также результаты собственных исследований, проведенных сотрудниками кафедры эпидемиологии и НИИ профилактической медицины НижГМА [7, 10, 32 — 34, 36].

На основе обобщения имеющихся научных данных можно заключить, что особенностями полиэтиологических инфекций, вызываемых УПМ, являются: 1. высокая частота возникновения, значительная доля в структуре; 2. микробиологические особенности: микробиологическое разнообразие, широкий спектр микробных ассоциаций как возбудителей инфекций, наличие способов их описаний; наличие анаэробного компонента; особые межмикробные взаимодействия; изменение свойств микроорганизмов в микробных ассоциациях; 3. клинко-эпидемиологические особенности: клинические разнообразие; большое значение среди ИСМП; отличие клинко-эпидемиологических характеристик от моноинфекций; наличие клинко-эпидемиологических различий полиэтиологических инфекций, возникших внебольнично и связанных с оказанием медицинской помощи; 4. наличие госпитальных микробных ассоциаций: их характеристика и особенности циркуляции во внутрибольничных условиях; их роль в биопленках; 5. особенности диагностических и лечебных мер, которые закономерно вытекают из отличительных характеристик полиэтиологических инфекций; особенности эпидемиологического надзора и контроля.

Высокая частота возникновения и значительная доля в этиологической структуре таких инфекций отмечается всеми исследователями, хотя статистические показатели варьируют в зависимости от типа патологии, профиля отделения, методологии исследований и других факторов. Было показано, что полиэтиологические ГСИ наиболее часто возникают у пациентов хирургического профиля [2, 3, 8, 12, 16, 30, 31, 40, 48]. Так, в этиологии ГСИ послеопе-

рационных ран микробные ассоциации составили 12 — 57% [2, 9, 45]. В исследовании Зубаревой Н.А. и др. показано, что ассоциации при послеоперационной раневой инфекции составили 53,5% по сравнению с 16,9% при гнойных заболеваниях мягких тканей [9].

Большинство так называемых вторичных инфекций кожи и мягких тканей, возникающих на фоне такой патологии как диабетическая стопа, пролежни и некротизирующие инфекции кожи и мягких тканей имеют полимикробную этиологию [19, 30, 31, 37]. Послеоперационные перитониты и абсцессы брюшной полости имеют преимущественно (до 91,3%) смешанную аэробно-анаэробную природу [45]. В этиологии послеоперационной раневой инфекции при гинекологических операциях доля микст-инфекций составила 22,9% [8]. Имеются данные, что 5,7% случаев внебольничной пневмонии имеют смешанную этиологию [44]. Среди разнообразия патогенов-ассоциантов чаще встречались комбинации *S. pneumoniae* с *L. pneumophila*, *S. pneumoniae* с *Pseudomonas* spp.

Однако более полные эпидемиологические данные этих инфекций весьма немногочисленны. Так, по данным трехлетнего эпидемиологического и микробиологического мониторинга в 3 многопрофильных взрослых и детских медицинских организациях в этиологической структуре ГСИ была установлена существенная доля полиэтиологичных инфекций, обусловленных несколькими УПМ (микробная ассоциация) — 15,1 — 34,7% [10]. В разных типах отделений удельный вес таких инфекций и частота их возникновения различаются.

Среднемноголетний показатель заболеваемости полиэтиологичными инфекциями в хирургическом отделении составил $1,6 \pm 0,35$ на 100 пациентов, удельный вес среди всех ГСИ — $41 \pm 7,1\%$; моноэтиологичные инфекции имели более высокий уровень заболеваемости — $2,3 \pm 0,4$ на 100 пациентов, но без достоверных отличий ($p > 0,05$), доля была достоверно выше — $59 \pm 7,1\%$ ($p < 0,05$) [10]. В ЛОР-отделении в той же медицинской организации за одинаковый период наблюдения частота возникновения полиэтиологичных инфекций была достоверно выше — $3,1 \pm 0,8$ на 100 пациентов, что составило 46,3% от всех инфекций в ЛОР-отделении ($p < 0,05$) [10, 36].

Имеются данные о выделении микробных ассоциаций от пациентов с пневмониями, преимущественно внебольничными, в профильных отделениях (всего 10 медицинских организаций, 1017 пациентов с пневмонией) [32]. Из мокроты обследованных пациентов микроорганизмы выделялись как в виде монокультур ($48,2 \pm 8,4\%$ среди всех выделенных микроорганизмов), так и в составе ассоциаций ($51,8 \pm 8,4\%$, $p = 0,37$). В ходе углубленного проспективного наблюдения и микробиологического мониторинга, оценки качества мокроты, количественной оценки выделенных микроорганизмов этиологически значимыми были расценены 55,1% и 73,1% микроорганизмов, выделенных от пациентов с внебольничными и внутрибольничными пневмониями соответственно. При внебольничных пневмониях доля монокультур — $47,2 \pm 4,5\%$, ассоциаций — $52,8 \pm 4,5\%$, $p = 0,39$; при внутрибольничных пневмониях преобладали монокультуры — $56,3 \pm 12,4\%$ vs $43,7 \pm 12,4\%$, $p = 0,47$.

Рассматривая разноплановую микробиологическую характеристику полиэтиологичных инфекций и микробных ассоциаций мы пришли к заключению о целесообразности при комплексном микробиологическом описании

полиэтиологичных инфекций и их возбудителей рассматривать: спектр выделенных микроорганизмов, их видовую и родовую структуру; спектр сочетаний микроорганизмов в ассоциациях; степень участия микроорганизмов в ассоциациях; компонентный профиль микробных ассоциаций микробных ассоциаций; структуру ассоциаций по составу, выделение преобладающих ассоциаций; свойства микробных ассоциаций: характеристику по компонентному составу, концентрацию ассоциантов в патологическом очаге, чувствительность ассоциантов к антимикробным препаратам (антибиотики, дезинфицирующие и антисептические средства, бактериофаги); особенности взаимодействия микробов-ассоциантов; сравнение выше перечисленных характеристик микробных ассоциаций при разных нозоформах инфекций, при инфекциях, различающихся по условиям возникновения (внебольничные и ИСМП; эндогенные и экзогенные); сравнение свойств микроорганизмов-ассоциантов и штаммов микроорганизмов такого же вида, выделенных от пациентов с моно-инфекциями.

Спектр выделяемых микроорганизмов от пациентов хирургического профиля многообразен: *Staphylococcus* spp., включая *S. aureus* и весь спектр коагулазоотрицательных стафилококков (КоНС), прежде всего *S. epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Micrococcus* spp., неферментирующие грамотрицательные бактерии (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia*), представители семейства *Enterobacteriaceae* (*Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. и др.).

Staphylococcus spp. в ассоциации с другими бактериями встречались в 38,7 — 48,2%. *P. aeruginosa* в 18,2% случаев встречалась в ассоциации с грамположительными микроорганизмами, а в сочетании с грамотрицательными — в 21,2% [2]. Вторичные инфекции кожи и мягких тканей, возникающие на фоне такой патологии, как диабетическая стопа, пролежни и некротизирующие процессы имеют преимущественно полимикробную этиологию — *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides fragilis* [19, 30, 31, 37].

В этиологии послеоперационной раневой инфекции при гинекологических операциях преобладали стафилококки, 28% из них были метициллинорезистентны, стафилококки в монокультуре встречались в 31,8% случаев, в составе микробных ассоциаций — в 13,2% (с *E. coli* — 7,8%, *Enterococcus* spp. — 4,6%) [8]. При внебольничной пневмонии смешанной этиологии (5,7% случаев) было выделено широкое разнообразие патогенов-ассоциантов, наиболее часто встречались комбинации *S. pneumoniae* с *L. pneumophila*, *S. pneumoniae* с *Pseudomonas* spp. [44].

Этиологическая структура имеет определенные различия в зависимости от профиля стационара, например, у пациентов общей хирургии и ЛОР-отделений [10].

Видовой спектр сочетаний микроорганизмов в ассоциациях очень разнообразен. Для пациентов хирургического профиля наиболее частые сочетания образуют *S. aureus*, КоНС, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterococcus* spp. Для пациентов ЛОР-профиля в сочетаниях также участвовали *Corynebacterium* spp., *Candida* spp. Необходимо подчеркнуть, что стафилококки участвуют в ассоциациях практически со всем спектром микроорганизмов как в отделениях общей хирургии, так и в более специализированных,

например, ЛОР-стационарах. У пациентов ЛОР-профиля КоНС наиболее часто сочетались с грибами и *S. aureus* [1, 7, 18, 36].

Для оценки встречаемости вида микроорганизма как ассоцианта (степень его участия в ассоциациях) был предложен коэффициент ассоциативности (КА) — доля ассоциантов среди всех культур определенного вида [10, 25, 36]. КА рассчитывается как отношение абсолютного числа культур-ассоциантов определенного вида к общему числу выделенных культур данного вида. КА <50% — низкий, т.е. микроорганизм встречается преимущественно как монокультура; КА=50 — 79% — средний, т.е. микроорганизм встречается преимущественно как ассоциант; КА=80 — 100% — высокий, т.е. микроорганизм встречается в основном или только как ассоциант.

Стафилококки, являвшиеся ведущими возбудителями инфекций в хирургии, встречались преимущественно в виде ассоциантов и имели средний КА — 75,0% и 79% у *S. aureus* и *S. epidermidis* соответственно.

Важным являлся факт низкой ассоциативности *P.aeruginosa* — самый низкий КА среди всех изученных микроорганизмов (48,7%), т.е. *P.aeruginosa* встречалась преимущественно как монокультура.

Была проведена углубленная характеристика микробных ассоциаций в сравнении с монокультурами. Микробные ассоциации, вызывающие инфекции у хирургических пациентов, по сравнению с моновозбудителями, отличались преимущественным 2-компонентным составом с возможным включением до 6 ассоциантов, более высокой концентрацией ассоциантов в патологическом очаге, большей представленностью полиантибиотикорезистентных возбудителей, включая MRSE, MRSA, полирезистентные *Enterococcus spp.*, микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС), за исключением полирезистентных *P.aeruginosa*. Среди *S.aureus*-ассоциантов наиболее часто был представлен следующий фенотип резистентности к антибиотикам: MRSA штаммы с устойчивостью ко всем β -лактамам антибиотикам, включая карбапенемы, к 3 аминогликозидам и макролидам, но чувствительные к фторхинолонам, рифамицинам и линкозамидам. Такой фенотип имели 30% *S.aureus*. Среди устойчивых штаммов КоНС также преобладал указанный фенотип резистентности — 15,7% всех изученных культур.

Оценка межпопуляционных взаимоотношений в ассоциациях представляет большой научно-практический интерес как в клинико-диагностическом, так и эпидемиологическом отношении.

В состав ассоциаций могут входить практически все основные возбудители ГСИ, а отношения между микроорганизмами могут быть разнообразными: нейтральными, синергичными, антагонистическими и другими [17, 30, 31, 33]. Характер взаимоотношений ассоциантов раневых инфекций оказывает влияние на устойчивость ассоциации, свойства ассоциантов и продолжительность инфекционного процесса, что определяет длительность циркуляции возбудителей ВБИ [34, 35]. Авторами было показано, что *in vitro* при совместном культивировании по отношению к *E.coli* и стафилококкам *P.aeruginosa* проявляла выраженную антагонистическую активность, а с *C.albicans* — синергичные взаимоотношения. Аналогичные данные получены и *in vivo* при сравнении сроков заживления ран — наименьших при ассоциации *P.aeruginosa* и *E.coli* (18 — 19 суток) и наибольших при ассоциации *P.aeruginosa* и *C.albicans*.

Имеются данные о взаимном усилении свойств *P.aeruginosa* и *V. septicus* в эксперименте *in vitro* и *in vivo* [14, 15, 17, 36]. Аэробы и анаэробы в ассоциациях обладают синергизмом, усиливая вирулентные свойства друг друга [7, 45].

При микробиологическом обследовании больных хирургического профиля с гнойно-воспалительными процессами можно встретить «сцепленный» характер роста микроорганизмов, т.е. ассоциации с тесным контактом ассоциантов в виде совместного роста колоний различных видов микроорганизмов при первичном посеве на плотных питательных средах. Подобный рост ассоциантов представляет собой образование «колонии в колонии», рост одного микроорганизма из-под колонии другого, рост сросшимися половинками колоний, смешанную культуру в одной видимой колонии. Характерно наличие совместного роста микроорганизмов при наличии свободного места на питательной среде. Удельный вес «сцепленных» ассоциаций выше у пациентов с ИСМП условно патогенной этиологии.

Характеристика микробных изолятов из ассоциаций обычно проводится с использованием коэффициента Jaccard, выражаемого в процентах, как бинарной меры сходства. Если условия в биотопе не позволяют существовать обоим видам, являясь антагонистическими, то коэффициент оказывается менее 30%. Показатель 30 — 70% говорит о значительной экологической общности, микроорганизмы способны к синергичному сосуществованию. Возможность тесного симбиотического сосуществования проявляется коэффициентом Jaccard >70% [10, 12, 13, 22, 36.]

Виды межмикробных связей у ассоциантов обычно изучают методом отсроченного антагонизма. В целом, в микробных ассоциациях преобладают нейтральные (индифферентные) отношения. Могут отмечаться особенности по отделениям: например, по нашим данным, синергидные взаимоотношения микроорганизмов в отделении общей хирургии достоверно выше, чем в ЛОР-стационаре. Учитывая особенности больных с ИСМП, получающих массивные антибактериальную терапию, необходимо отметить, что антибиотики подавляют антагонизм взаимоотношений возбудителей гнойно-септических инфекций [12 — 15].

Имеются клинические наблюдения связи полимикробной этиологии инфекций с тяжестью заболевания, хронизацией процесса и летальностью [3, 6, 7, 10, 36, 44]. Так, Гавриленко В.Г. и др. указывают на увеличение коэффициента видового разнообразия бактериальных патогенов на 6 — 10 сутки пребывания в стационаре, что обуславливало более длительное ($64,3 \pm 3,4$ суток) и тяжелое течение заболеваний, увеличение частоты повторных оперативных вмешательств и летальных исходов (до 12%) [3]. Бактериально-грибковая инфекция имела более неблагоприятный прогноз [4]. Летальность при моноинфекции, вызванной MRSA, составила в среднем 31,5%, в случае присоединения грамотрицательной микрофлоры или патогенных грибов возрастала до 53,3% [6].

Была проведена клинико-эпидемиологическая характеристика полиэтиологичных инфекций в сравнении с моноэтиологичными инфекциями. С целью выявления групп и факторов риска развития полиэтиологичных инфекций были проведены аналитические исследования типа случай-контроль, где в качестве группы случаев выступали пациенты с инфекцией смешанной этиологии (115), группа контроля — пациенты с моноэтиологичной инфек-

цией (79). Клинико-эпидемиологическими особенностями полиэтиологических инфекций у хирургических пациентов являлись: возрастная группа риска — 50 лет и более, ведущая патология — поражения кожи и подкожной клетчатки, что отличалось от моноэтиологических инфекций: наличие сопутствующей патологии, преобладающее оперативное вмешательство — вскрытие абсцессов, флегмон, чаще подвергались ампутации конечностей и сегментов по сравнению с пациентами с моноэтиологическими инфекциями; многократные оперативные вмешательства (3 и более), чаще, чем при моноэтиологических инфекциях, интенсивная антибактериальная терапия (4 курса и более), длительная госпитализация — более 30 дней.

В ходе проспективного наблюдения за пациентами с полиэтиологическими инфекциями удалось дифференцировать их на внутрибольничные (ИСМП) и заносы инфекции в стационар. Факт внутрибольничного инфицирования устанавливался на основе эпидемиологических и клинических данных, полученных из анамнеза и по результатам проспективного наблюдения в комплексе с микробиологическим мониторингом.

Установлено, что среди ассоциаций — возбудителей как заносов, так и госпитальных гнойно-септических инфекций (ГГСИ) — преобладали двухкомпонентные ассоциации, однако среди возбудителей внутрибольничных инфекций больше представлены многокомпонентные ассоциации — выше доля трехкомпонентных, а пяти и шести компонентные ассоциации были только в этой группе. Концентрация ассоциантов в патологическом очаге была одинаково высока и среди возбудителей ГСИ, и ГГСИ ($p < 0,05$).

Достоверно выше среди ассоциантов при ГГСИ доля полирезистентных к антибиотикам культур. Среди пациентов с полиэтиологическими внутрибольничными инфекциями преобладали лица старше 50 лет, их доля была достоверно выше, чем при внебольничных смешанных инфекциях ($RR=1,4$, $RD=24,7\%$, $AF=28,6\%$). Установлено, что пациенты с внутрибольничными полиэтиологическими инфекциями достоверно чаще подвергались оперативным вмешательствам, инвазивным манипуляциям, антибактериальной терапии, имели более длительную госпитализацию. Выявлено, что внутрибольничные полиэтиологические инфекции возникали у пациентов после 30 дня пребывания в стационаре.

Необходимо отметить, что в случае внутрибольничного инфицирования ассоциациями наибольшую частоту имела ИОХВ глубокого разреза. Имеются различные данные о роли микробных ассоциаций в этиологической структуре внутрибольничных ГСИ, однако вопрос о внутрибольничном инфицировании микробными ассоциациями и их госпитальном характере представлен ограниченным числом публикаций [2, 37].

Наличие полиэтиологических инфекций, имевших внутрибольничный характер, позволило сделать предположение, что пациенты могли инфицироваться не только госпитальными и негоспитальными штаммами различных микроорганизмов, которые затем образовывали ассоциации, но выдвинуть гипотезу о существовании госпитальных ассоциаций [10, 34, 36].

В результате проспективного наблюдения в комплексе с микробиологическим мониторингом, включавшим внутривидовое типирование всех выделенных микроорганизмов как монокультур, так и ассоциантов (биовар,

профиль антибиотикорезистентность, фаготип, плазмидный профиль, спектр внеклеточных белков), были выявлены микробные ассоциации с определенными характеристиками от разных пациентов и проведена их паспортизация с указанием их происхождения, состава и свойств [10, 35, 36]. Всего за 3-летний период наблюдения была выделена 21 такая ассоциация. Они обладали следующими свойствами: аналогичные по составу ассоциации, выделяемые от разных пациентов; ассоциации имели клиническое значение: выделены от пациентов с клиническими признаками инфекции, в высокой концентрации, неоднократно при обследовании в динамике; ассоциации были выделены от пациентов с внутрибольничной инфекцией, на что указывали эпидемиологические данные (анамнез, сроки возникновения инфекции, наличие эпидемиологической связи между пациентами, действие факторов риска внутрибольничного инфицирования), клинические данные (локализация инфекции, нозоформа, тяжесть течения) и др.; ассоциации включали идентичные по внутривидовым характеристикам ассоцианты; микроорганизмы-ассоцианты имели признаки госпитальных штаммов.

Были выявлены особенности формирования и циркуляции госпитальных ассоциаций: госпитальные ассоциации характеризовались меньшей длительностью циркуляции по сравнению с госпитальными монокультурами. Так, если монокультуры регистрировались на протяжении нескольких лет, то госпитальные ассоциации регистрировались на протяжении 1 — 2 месяцев у разных больных, затем ассоциация «распадалась», заменялся ее фрагмент или целиком ассоциация. Госпитальные микробные ассоциации отличались малочисленностью по сравнению с госпитальными монокультурами. Именно монокультуры, как госпитальные штаммы, так и негоспитальные, служили базой для формирования при определенных благоприятных условиях госпитальных ассоциаций микробов. Например, отмечена вначале циркуляция монокультур *P.aeruginosa*, потом спустя 7 месяцев *P.aeruginosa* выделяется в ассоциации с *S.aureus*. Была возможна передача не всей многокомпонентной ассоциации, а фрагмента. Возможно несколько смен микробных возбудителей, в том числе микробных ассоциаций.

Формированию госпитальных ассоциаций и их передаче между больными в период совместного пребывания в стационаре способствовало неблагоприятное эпидемическое окружение и нарушение санитарно-противоэпидемического режима: переполненность отделений и несоблюдение принципа цикличности заполнения палат, поточности и др., что привело к активизации фактора перемешивания и усилению циркуляции микроорганизмов.

Несомненно, что отдельно и углубленно необходимо рассматривать вопрос о биопленочных инфекциях, которые могут быть обусловлены как моно-, так и полимикробными биопленками. Но обширность данной темы не позволяет обсуждать ее в рамках данной публикации.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют об актуальности полиэтиологических инфекций, вызываемых УПМ, особенно ИСМП, в хирургических отделениях различного профиля, характеризующихся высоким уровнем заболеваемости, разнообразной этиологией, включая и госпитальные ассоциации, обладающие микробиологическими и эпидемиологическими отличиями от моноэтиологических инфекций. Следовательно, особое внимание

должно уделяться активному выявлению всего спектра гетерогенной микробной популяции, участвующей в инфекционном процессе.

Нами были разработаны параметры эпиднадзора за полиэтиологичными инфекциями в хирургических отделениях (стационарах), где ключевую роль играет микробиологический мониторинг, определяющий диагностику полиэтиологичных инфекций, изучение свойств ассоциаций и вызываемых ими ГСИ. Несомненно, что эпиднадзор за полиэтиологичными инфекциями является составной частью эпиднадзора за ГСИ, а не самостоятельной системой.

Так как полиэтиологичные инфекции обладают выраженными микробиологическими, клиническими и эпидемиологическими отличиями от моноэтиологичных, и более того, имеются специфические характеристики у внутрибольничных полиэтиологичных инфекций, требуется и разработка профилактических и противоэпидемических мероприятий, учитывающих эти особенности. В рамках различных исследований показана необходимость корректировки антибиотикотерапии возникших полиэтиологичных инфекций и оптимизации эмпирической терапии, учитывая высокую долю полирезистентных ассоциантов и преобладающие фенотипы резистентности; антибиотикопрофилактики пациентам группы риска развития полиэтиологичных инфекций; требует дальнейшего исследования возможность применения и эффективность в отношении полиэтиологичных инфекций следующих мероприятий: фаготерапия и фагопрофилактика; применение антисептиков; дезинфекционные мероприятия; иммунокоррекция и другие.

Эпиднадзор за полиэтиологичными инфекциями может рассматриваться как эффективный при наличии регистрации полиэтиологичных инфекций; определении фонового уровня заболеваемости и доли в структуре ГСИ, характерных для данного отделения (стационара); выявлении, учете и регистрации полиэтиологичных ИСМП; наличии этиологической расшифровки случаев полиэтиологичных инфекций с комплексным исследованием свойств возбудителей-ассоциантов; паспортизации госпитальных ассоциаций; выявлении пациентов групп риска и факторов риска развития полиэтиологичных инфекций, действующих в данном отделении (стационаре); осуществлении ретроспективного и оперативного эпидемиологического анализа. Обобщая приведенные данные, можно сделать следующие выводы о характеристике и особенностях данной группы инфекций: значительный уровень заболеваемости и высокая доля в структуре всех инфекций, наличие микробиологических и эпидемиологических особенностей, отличающихся от моноэтиологичных инфекций и в зависимости от нозологической формы, условий возникновения (внебольничные или внутрибольничные), для инфекций в медицинских организациях — от профиля стационара; микробные ассоциации УПМ при ГСИ характеризуются широким спектром, разнообразными компонентными профилями и количественными характеристиками, особыми межбактериальными взаимодействиями, различным составом ассоциаций, включая эпидемиологически и клинически значимые полирезистентные возбудители; микробные ассоциации способны к циркуляции в условиях стационара, могут носить госпитальный характер, обуславливая внутрибольничное инфицирование пациентов, и отличаются от негоспитальных микробных сообществ; при осуществлении эпидемиологического надзора и контроля полиэтиоло-

гичных инфекций требуется дифференцированный подход, учитывающий клинико-эпидемиологические и микробиологические особенности этих инфекций; необходимо более глубокое изучение особенностей межмикробных взаимодействий УПМ и их эпидемиологического значения, включая и госпитальные микробные ассоциации, с учетом возможностей современных молекулярно-биологических методов исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаев С.Ю., Журавлев Р.В., Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л. Эколого-эпидемиологические и микробиологические особенности внутрибольничных инфекций у пациентов реанимационного отделения. Научно-методический электронный журнал «Концепт». 2013, 3: 2011-2015.
2. Волков И.И., Суборова Т.Н., Федотова О.Н. и др. Клиническое значение синегнойной палочки при госпитальной инфекции. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002, 4 (1): 14-15.
3. Гавриленко В.Г., Фадеев С.Б., Бухарин О.В. Микробиологические особенности гнойно-воспалительных процессов тканей при сахарном диабете. Вестник хирургии. 2001, 160: 39-41.
4. Гельфанд Б.П., Гологорский В.А., Гельфанд Е.Б. Нозокомиальная грибковая инфекция в хирургии и интенсивной терапии: состояние проблемы. Анналы хирургии. 2001, 3: 12-19.
5. Глушанова Н.А., Блинов А.И., Алексеева Н.Б. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека. Медицина в Кузбассе. 2015, 2: 30-35.
6. Дмитренко О.А. Молекулярно-генетические аспекты эпидемиологии внутрибольничных инфекций, вызываемых представителями вида *Staphylococcus aureus*, устойчивыми к метициллину/оксациллину: автореф. дис. докт. мед. наук. М., 2008.
7. Ермольева С.А. Микробиологическая и эпидемиологическая характеристика инфекций смешанной этиологии с анаэробным компонентом: дис. канд. мед. наук. Н. Новгород, 2006.
8. Ершов Г.В., Смоленов И.В., Бауман Ю.С. Структура и антибиотикорезистентность возбудителей послеоперационных осложнений в гинекологических стационарах Волгограда. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002, 4 (1): 20.
9. Зубарева Н.А., Авдеева Н.С., Горовиц Э.С. и др. Микробиологическая характеристика гнойных заболеваний мягких тканей и послеоперационной раневой инфекции. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002, 4: 24.
10. Козлов Р.С. Резистентность к антимикробным препаратам как реальная угроза национальной безопасности. РМЖ. 2014, 4: 321.
11. Ковалишенина О.В. Эколого-эпидемиологические особенности госпитальных инфекций и многоуровневая система эпидемиологического надзора: дис. докт. мед. наук. Н. Новгород, 2009.
12. Меньшиков Д.Д. Микробиологическое обоснование диагностики, профилактики и лечения раневой инфекции в экстренной хирургии: автореф. дис. докт. мед. наук. 1988.
13. Меньшиков Д.Д. Мониторинг возбудителей гнойно-септических заболеваний в стационаре скорой медицинской помощи. Журнал микробиологии. 2003, 1: 10-13.
14. Меньшиков Д.Д., Меньшикова Е.Д., Черненькая Т.В. и др. Моно- и ассоциированная микрофлора при раневой инфекции у больных с термической травмой. Журнал микробиологии. 2009, 6: 3-7.
15. Меньшикова Е.Д. Этиологическая роль *S. aureus* у больных специализированных отделений стационара при моно- и смешанных раневых инфекциях. Инфекции в хирургии. 2014, 2: 35-39.
16. Миллер Г.Г. Биологическое значение ассоциаций микроорганизмов. Вестник РАМН. 2000, 1: 45-51.

17. Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л. Особенности микробных ассоциаций при гнойно-септических инфекциях в отделении раневой инфекции многопрофильного стационара. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. 2013, 3: 154-163.
18. Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л., Бабаев С.Ю., Журавлев Р.В. Эколого-эпидемиологические особенности госпитальных инфекций в отделении торакальной хирургии многопрофильного стационара. Фундаментальные исследования. 2014, 7 (3): 540-543.
19. Митрохин С.Д. Гнойные экссудаты, раны и абсцессы. Современный алгоритм микробиологического исследования. Инфекции и антимикробная терапия. 2002, 4 (3): 90-92.
20. Покровский В.И., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Ковалишена О.В. и др. Национальная концепция профилактики ИСМП и информационный материал по ее положениям. Н. Новгород, Изд-во Ремедиум Приволжье, 2012.
21. Попов Д.А. Послеоперационные инфекционные осложнения в кардиохирургии. Анналы хирургии. 2013, 5: 15-21.
22. Розенберг Г.С. Поль Жаккар и сходство экологических объектов. Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. 2012, 21 (1): 190-202.
23. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга 2. Под ред. А.С. Лабинской. Бином, 2015.
24. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М. Структура и функции бактериальных биопленок симбиотических и условно-патогенных бактерий. Верхневолж. Мед. журнал. 2013, 11 (4): 37-42.
25. Способ диагностики госпитальных микробных ассоциаций при микробиологическом мониторинге в рамках эпидемиологического надзора за гнойно-септическими инфекциями: пат. 2298037 РФ, МПК С12Q 1/04 С12Q 1/68. В.В. Шкарин, О.В. Ковалишена, О.Н. Шпрыкова и др.; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО НижГМА, Шпрыкова О.Н. № 2005109025/13; заявл. 30.03.2005. http://www1.fips.ru/wps/portal/ofic_pub_ru. Дата обращения: 17.01.2017.
26. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. Под ред. М.О. Биргера. М., Медицина, 1982.
27. Стручков В.И., Гостищев В.К., Стручков Ю.В. Хирургическая инфекция: руководство для врачей. М., Медицина, 1991.
28. Тец В.В. Клеточные сообщества. В.В. Тец. СПб., 1998.
29. Фадеева Т.В. Микробиологическая оценка послеоперационной раневой инфекции в многопрофильной хирургической клинике. Инфекции в хирургии. 2012, 10 (4): 14.
30. Файл Т. Диагностика и антимикробная терапия инфекций кожи и мягких тканей. Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия. 2003, 5 (2): 119-125.
31. Хирургические инфекции: практическое руководство. Под ред. И.А. Ерюхина, Б.Р. Гельфанда, С.А. Шляпникова. М., Литтерра, 2006.
32. Чубукова О.А. Совершенствование эпидемиологического мониторинга в эпиднадзоре за внебольничными пневмониями: дис. канд. мед. наук. Н.Новгород, 2012.
33. Широкова И.Ю. Эпидемиологические и микробиологические особенности инфекций, обусловленных коагулазоотрицательными стафилококками: автореф. дис. канд. мед. наук. Н.Новгород, 2014.
34. Шкарин В.В., Ковалишена О.В. Концепция многоуровневой системы эпидемиологического надзора за госпитальными инфекциями. Медицинский альманах. 2009, 2: 14-21.
35. Шкурат М.А., Покудина И.О., Батталов Д.В. Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам. Живые системы. 2014, 10; URL: <http://jbks.ru/archive/issue-10/article-10>.
36. Шпрыкова О.Н. Микробиологические и эпидемиологические особенности микробных ассоциаций при гнойно-септических инфекциях: дис. канд. мед. наук. Н.Новгород, 2004.

37. A guide to infection control in the hospital. An official publication of the ISID. Ed. R.Wenzel, T. Brewer, J-P. Butzler. Decker Inc. Hamilton, 2002.
38. Archibaid L.K., Arduino J. E.cloacae and P.aeruginosa polymicrobial bloodstream infections traced to probable extrinsic contamination of multidose vial. Inf Control and Hosp. Epidemiology. 1997, 18 (2): 51.
39. Brogden K.A., Guthmiller J.M. Polymicrobial diseases. 2002.
40. Costerton W. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. J. Clin. Invest. 2003, 112 (10): 1466-1477.
41. Costerton J.W., Montanaro L., Arciola C.R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. Int. J. Artif. Organs. 2005, 28 (11): 1062-1068.
42. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999, 284: 1318-1322.
43. Flemming H. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat. Rev. Microbiol. 2016, 14: 563-575.
44. Gutierrez F, Masia M., Rodriguez J.C. Community-acquired pneumonia of mixed etiology: prevalence, clinical characteristics, and outcome. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2005, 24: 377-383.
45. Platell C., Hall J.C. The prevention of wound infection in patients undergoing colorectal surgery. J. Hosp. Infection. 2001, 49: 233-238.
46. Røder H.L., Sørensen S.J., Burmølle M. Studying bacterial multispecies biofilms: where to start? Trends in Microbiology. 2016, 24 (6): 503-513.
47. Sefidi M.D. Adjuvant role of Pseudomonas flagellin for Acinetobacter baumannii biofilm associated protein. World J. Methodol. 2016, 6 (3): 190-199.
48. Senneville E., Yazdanpanah Y., Cazaubiel M. Rifampicin-ofloxacin oral regimen for the treatment of mild and moderate diabetic foot osteomyelitis. J. Antimicrob. Chemother. 2001, 48: 927-930.

Поступила 25.05.17

Контактная информация: Шкарин Вячеслав Васильевич, д.м.н., проф.,
603005, Н.Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1, р.т. (831)439-01-63

Поздравляем наших авторов и подписчиков с наступающим Новым 2018 годом. Желаем всем здоровья и творческих успехов.

Редколлегия, Редакция

СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Сазанова Е.В., Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Малыкова Т.А., Попов Ю.А. Проточно-цитофлуориметрический анализ цитотоксичности штаммов *Yersinia pestis*3
Sazanova, E.V., Shmelkova, T.P., Kravtsov, A.L., Maluykova, T.A., Popov, Yu.A. Flow-cytofluorimetric analysis of cytotoxicity of *Yersinia pestis* strains
- Малецкая О.В., Дубянский В.М., Беляева А.И., Шапошникова Л.И., Агапитов Д.С., Ермолова Н.В., Цанко Н.В., Таран Т.В., Котенев Е.С., Белова О.А., Куличенко А.Н. Оценка риска распространения вируса Зика в Республике Абхазия, связанного с местной популяцией комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* 10
Maletskaya, O.V., Dubyansky, V.M., Belyaeva, A.I., Shaposhnikova, L.I., Agapitov, D.S., Ermolova, N.V., Tsapko, N.V., Taran, T.V., Kotenev, E.S., Belova, O.A., Kulichenko, A.N. Estimate of virus Zika spread risk in the Republic of Abkhazia associating the local population of mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*
- Хохлова О.Е., Перьянова О.В., Боброва О.П., Сергеева В.В., Модестов А.А., Еремеева О.Г., Поткина Н.К., Капшук Д.Н., Алабушева А.В., Yamamoto, T. Молекулярно-генетические особенности метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) — возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний у онкологических больных.... 15
Khokhlova, O.E., Peryanova, O.V., Bobrova, O.P., Sergeeva, V.V., Modestov, A.A., Eremeeva, O.G., Potkina, N.K., Kapshuk, D.N., Alabusheva, A.V., Yamamoto, T. Molecular and genetic features of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) — causative agents of purulent diseases at cancer patients
- Сычева М.В., Пешкова Ю.И., Карташова О.Л., Андреева А.В. Регуляция антимикробными пептидами чувствительности микроорганизмов к антагонистически активным представителям мутуалистической микрофлоры 21
Sycheva, M.V., Peshkova, Yu.I., Kartashova, O.L., Andreeva, A.V. Regulation of microorganisms sensitivity to antagonistic active representatives of mutualistically microflora by the antimicrobial peptides
- Асратян А.А., Симонова Е.Г., Казарян С.М., Орлова О.А., Ильенкина К.В., Раичич С.Р., Сипачева Н.Б., Каражас Н.В. Эпштейна-Барр вирусная инфекция: современная ситуация и клинико-эпидемиологические особенности у женщин детородного возраста и новорожденных..... 25
Asratyan, A.A., Simonova, E.G., Kazaryan, S.M., Orlova, O.A., Penkina, K.V., Raichich, S.R., Sipacheva, N.B., Karazhas, N.V. Epstein-Barr viral infection: modern situation and clinical-epidemiological features among fertile women and newborns
- Ковалев В.А., Филатов Н.Н., Локтионова М.Н., Фроловская Т.Г., Линок А.В., Жукова Г.А., Голиусов А.А. Современные особенности норовирусной инфекции в городе Москва ... 32
Kovalev, V.A., Filatov, N.N., Loktionova, M.N., Frolovskaya, T.G., Linok, A.V., Zhukova, G.A., Goliusov, A.A. Modern epidemiological characteristics of norovirus infection in Moscow
- Терентьева Н.А., Псарева Е.К., Тимченко Н.Ф., Голотин В.А., Рассказов В.А. Влияние токсинов *Yersinia pseudotuberculosis* на формирование биопленки..... 37
Terenteva, N.A., Psareva, E.K., Timchenko, N.F., Golotin, V.A., Rasskazov, V.A. Effect of *Yersinia pseudotuberculosis* toxins on the biofilm formation
- Городничев Р.Б., Ракитина Д.В., Манолов А.И., Байкова Ю.П., Шербаков П.Л., Смирнов Г.Б., Ильина Е.Н. Характеристика клинических изолятов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с болезнью Крона 42
Gorodnichev, R.B., Rakitina, D.V., Manolov, A.I., Baykova, Yu.P., Scherbakov, P.L., Smirnov, G.B., Ilina, E.N. Features of *Escherichia coli* clinical strains, isolated from the patients with Crohn's disease
- Кудряшова А.М., Борисова О.В., Михайлова Н.А., Лоншаков Д.В., Катлинский А.В. Влияние методов иммобилизации эритропоэтина на чувствительность выявления специфических IgG к ЧЭПО в сыворотках крови экспериментальных животных 49
Kudryashova, A.M., Borisova, O.V., Mikhailova, N.A., Lonshakov, D.V., Katlinsky, A.V. Effect of methods of immobilization of erythropoietin on the sensitivity for the detection of specific IgG to EPO in experimental animals sera

- Оксанич А.С., Самарцева Т.Г., Файзулов Е.Б., Гаврилова Н.Ф., Яковлева И.В., Свиридов В.В., Зверев В.В. Конструирование плазмидного вектора для получения химерных антител заданной специфичности в клетках млекопитающих..... 56
- Oksanich, A.S., Samartseva, T.G., Faizuloev, E.B., Gavrilova, N.F., Yakovleva, I.V., Sviridov, V.V., Zverev, V.V. Plasmid design for production of chimeric antibodies with defined specificity in eukaryotes
- Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Жукина М.В., Амиантова И.И., Милованова А.В., Воробьев Д.С., Аммури Ю.И., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Кичатова В.С., Потемкин И.А., Исаева О.В., Малинникова Е.Ю., Карлсен А.А., Блинов В.М., Нурматов З.Ш., Нурматов А.З., Касымов О.Т., Жаворонок С.В., Зверев В.В. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита E 1 генотипа с применением метода оптимизации кодонов..... 63
- Alatortseva, G.I., Sidorov, A.V., Nesterenko, L.N., Luhverchik, L.N., Zhukina, M.V., Amiantova, I.I., Milovanova, A.V., Vorobev, D.S., Ammur, Yu.I., Mikhailov, M.I., Kyuregyan, K.K., Kichatova, V.S., Potemkin, I.A., Isaeva, O.V., Malinnikova, E. Yu., Karlsen, A.A., Blinov, V.M., Nurmatov, Z.Sh., Nurmatov, A.Z., Kasymov, O. T., Zhavoronok, S.V., Zverev, V.V. Design of hepatitis E virus genotype 1 recombinant ORF3 protein by codon optimization method
- Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И., Кабаргина В.Ю., Милованова А.В., Воробьев Д.С., Аммури Ю.И., Блинов В.М., Нурматов А.З., Нурматов З.Ш., Байызбекова Д.А., Касымов О.Т., Кюрегян К.К., Михайлов М.И., Жаворонок С.В., Зверев В.В. Получение рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита E 1 генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств..... 72
- Alatortseva, G.I., Sidorov, A.V., Nesterenko, L.N., Luhverchik, L.N., Dotsenko, V.V., Amiantova, I.I., Kabargina, V. Yu., Milovanova, A.V., Vorobev, D.S., Ammur, Yu.I., Blinov, V.M., Nurmatov, A.Z., Nurmatov, Z.Sh., Baiyzbekova, D.A., Kasymov, O. T., Kyuregyan, K. K., Mikhailov, M. I., Zhavoronok, S.V., Zverev, V.V. Design of hepatitis E virus recombinant capsid protein: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties
- Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Захарова Л.Б., Вишневецкая О.Н., Марков А.Г. Влияние пробиотических бактерий и липополисахаридов на плотные контакты эпителиоцитов тощей кишки крыс..... 80
- Rybalchenko, O.V., Orlova, O.G., Zakharova, L.B., Vishnevskaya, O.N., Markov, A.G. Effect of probiotic bacteria and lipopolisaccharides on epitheliocytes tight junctions of rat jejunum
- Жданова С.Н., Огарков О.Б., Синьков В.В., Хромова П.А., Орлова Е.А., Кощеев М.Е., Савилов Е.Д. Эпидемиологическое обоснование распространения основных клонов генотипа Beijing *Mycobacterium tuberculosis* в Иркутской области..... 88
- Zhdanova, S.N., Ogarkov, O.B., Sinkov, V.V., Khromova, P.A., Orlova, E.A., Koscheev, M.E., Savilov, E.D. Epidemiological study of main clones distribution genotype Beijing of *Mycobacterium tuberculosis* within Irkutsk region

ОБЗОРЫ (REVIEWS)

- Яцышина С.Б. Пневмовирусы в инфекционной патологии человека 95
- Yatsyshina, S.B. Pneumoviruses in human infectious diseases
- Карнаухов И.Г., Челдышова Н.Б., Гражданов А.К., Крицкий А.А., Заднова С.П., Кедрова О.В., Иванова А.В., Топорков В.П., Смирнова Н.И., Воиро А., Вумбали С., Воиро М.У., Кутырев В.В. Эпидемиологический анализ ситуации по холере на территории Африки и проблемы профилактики..... 105
- Karnaukhov, I.G., Cheldyshova, N.B., Grazhdanov, A.K., Krizky, A.A., Zadnova, S.P., Kedrova, O.V., Ivanova, A.V., Toporkov, V.P., Smirnova, N.I., Voiro, A., Voumbali, S., Boiro, M.Y., Kutuyrev, V.V. Epidemic analysis on cholera in Africa and problems of profilaxis

ПРОБЛЕМНАЯ СТАТЬЯ (PROBLEM ARTICLE)

- Шкарин В.В., Ковалишена О.В., Саперкин Н.В., Шпрыкова О.Н. Общая характеристика и проблемные вопросы полиэтиологических инфекций, вызываемых условно патогенными микроорганизмами..... 114
- Shkarin, V.V., Kovalishena, O.V., Saperkin, N.V., Shпрыkova, O.N. General characteristics and issues mixed infections caused by opportunistic microorganisms

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 исключением общепринятых химических и математических величин) не допускаются. Использовать только единицы СИ.

7. Литература (в оригинальных статьях не более 15, проблемных и обзорах не более 50, кратких сообщений 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 оставляет за собой право редактировать статьи, сокращать или исправлять их, а также помещать в виде кратких сообщений: 8 стр. текста с резюме (п. 3) и литературой (п. 7) без рисунков и таблиц.

11. Плата с аспирантов за публикацию статей не взимается.

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

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