

ISSN 0372.9311

ЖУРНАЛ

МИКРОБИОЛОГИИ  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ  
И  
ИММУНОБИОЛОГИИ

Издательский  
дом



С-ИНФО

1 2018

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY  
EPIDEMIOLOGY  
AND  
IMMUNOBIOLOGY



4 602607 000085

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.*

1

январь—февраль

МОСКВА 2018

«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 I полугодие 2018 г.:

Каталог Агентство «Роспечать» 71436.  
Объединенный каталог «Пресса России» 10277.

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

<http://www.jmicrobiol.com>

---

Подписано в печать 18.01.18. Выход в свет 06.02.18.  
Формат 70x108 1/16. Печать офсетная. Заказ

---

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

© «С-инфо», 2018

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*О.В.Бухарин, Е.В.Иванова, Н.Б.Перунова, И.А.Никифоров*

### **ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ БИФИДОФЛОРЫ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ В АССОЦИАТИВНОМ СИМБИОЗЕ ЧЕЛОВЕКА**

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

*Цель.* Определение функциональных групп бифидофлоры толстого кишечника человека на основе анализа особенностей спектра метаболитов, протеома, биoproфиля, иммунорегуляторных свойств и способности проводить дифференцировку «свой-чужой» среди ассоциантов. *Материалы и методы.* Материалом служили 260 штаммов бифидобактерий, выделенных из 122 кишечных микросимбиозов. Экспериментальные исследования проводились с использованием бактериологических, хроматографического и иммунологических методов. Статистическая обработка материала выполнена средствами пакета Statistica 10.0 с использованием k-кластерного анализа и дискриминантного метода. *Результаты.* В результате работы определены 3 кластера, содержащих штаммы различных видов бифидобактерий. Первый кластер был представлен *B. bifidum* и характеризовался наличием антипептидной активности штаммов в отношении FNO- $\alpha$  и INF- $\gamma$ , IL-10. Во втором кластере преобладали культуры *B. longum*, где значимыми были параметры системообразующего фактора микросимбиоза, способность к микробному распознаванию, антагонистическая активность и продукция уксусной кислоты. В третьем кластере видовой состав бифидобактерий был разнообразен, а информативными тестами явились — продукция штаммами масляной, капроновой кислот и их изоформ. *Заключение.* Ключевая функция бифидофлоры в регуляции гомеостаза кишечного биотопа реализуется за счет образования функциональных кластеров, среди которых первая группа участвует в формировании цитокинового баланса, вторая — ответственна за дискриминацию ассоциативной микробиоты и прямую защиту биотопа от патогенов, а третья необходима для поддержания барьерной метаболической функции энтероцитов в толстом кишечнике человека.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 3—9

**Ключевые слова:** бифидобактерии, метаболический профиль, персистенция, цитокины, микробное распознавание «свой-чужой», штаммоспецифичность, ассоциативный симбиоз, гомеостаз

*O.V.Bukharin, E.V.Ivanova, N.B.Perunova, I.A.Nikiforov*

### **FUNCTIONAL GROUPS OF BIFIDOFLORA OF INTESTINAL MICROBIOTA IN ASSOCIATIVE SYMBIOSIS OF HUMAN**

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

*Aim.* Aim of the research is the identification of functional groups of human gut bifidoflora based on analysis of the spectrum of metabolites features, proteome, bioprofile, immunoregulatory properties and the ability to differentiate «self/non-self» among the associative microbiota. *Materials and methods.* The materials are 260 strains of bifidobacteria isolated from 122 intestinal microsymbiocenoses. Experimental studies were carried out using bacteriological, chromatographic and immunological methods. Statistical processing of material is carried out by means of the package Statistica 10.0 using of k-cluster analysis and discriminant method. *Results.* As a result of the work, 3 clusters containing strains of various types of bifidobacteria were identified. The first

cluster was represented by *B. bifidum* and was characterized by the antipeptide activity of the strains with respect to FNO- $\alpha$  and INF- $\gamma$ , IL-10. In the second cluster of the *B. longum* culture predominated, where the parameters of the backbone factor of microsymbiocenosis, the ability to microbial recognition, antagonistic activity and production of acetic acid were significant. In the third cluster the species composition of bifidobacteria was diverse and products of butyric, caproic acids and their isoforms were the informative tests. *Conclusion.* The key function of bifidoflora in the regulation of the homeostasis of the intestinal biotope is realized by the formation of functional clusters, among which the first group participates in the formation of the cytokine balance, the second group is responsible for the discrimination of associative microbiota and direct protection of the biotope from pathogens, and the third is necessary to maintain the barrier metabolic function of enterocytes in the human large intestine.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 3–9

Key words: bifidobacteria, metabolic profile, persistence, cytokines, microbial «self/non-self» discrimination, strain specificity, associative symbiosis, homeostasis

## ВВЕДЕНИЕ

Вопрос о значении бифидобактерий для организма человека был поднят основоположником русской бактериологии И.И. Мечниковым и его школой на рубеже прошлого столетия. Дальнейшие исследования по изучению биологии бифидобактерий позволили установить у микроорганизмов данной группы широкий спектр антимикробных соединений, определяющих их участие в защите биотопа толстого кишечника от патогенов [8, 11]. Показано значение метаболических функций бифидофлоры, восполняющих недостающие звенья метаболизма макропартнера (хозяина) [6, 9]. В последнее время активно разрабатывается иммунотропная активность бифидобактерий, их способности формировать колонизационную резистентность организма, регулируя гомеостаз кишечной микробиоты за счет подавления воспалительных реакций и апоптоза [10, 15].

Вместе с тем, вопрос о понимании физиологической роли, особенностей функционирования бифидофлоры в условиях кишечного микросимбиоза, направленных на поддержание гомеостаза микробиоты и макропартнера, остается открытым. К настоящему времени накоплены убедительные материалы штаммовой специфичности бифидофлоры, определяющей различия функциональной активности культур в условиях межмикробного общения. Так, в ряде работ различные эффекты пробиотических бифидобактерий связывают со штаммоспецифическими особенностями иммуномодулирующего действия [5, 7] и метаболической активностью бактерий [12]. Материал, полученный нами [2], позволил при изучении белкового профилирования бифидофлоры, ее антагонистической активности и способности влиять на ассоциативную микробиоту, выявить, наряду с общностью штаммов, и различия между ними внутри вида. Не исключено, что оценивать физиологический потенциал бифидобактерий необходимо не только по их видовой принадлежности, но и, возможно, по выявлению функциональных признаков микроорганизмов, подсказать природу которых может кластерная группировка бактерий.

В связи с этим, целью работы было определение функциональных групп бифидофлоры толстого кишечника человека на основе анализа особенностей спектра метаболитов, протеома, био профиля, иммунорегуляторных свойств и способности проводить дифференцировку «свой-чужой» среди ассоциантов,

позволяющих выявлять особенности формирования функциональных кластеров доминантов при регуляции гомеостаза толстого кишечника человека.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 260 штаммов бифидобактерий, выделенных из 122 кишечных микросимбиозов при обследовании лиц в возрасте от 1 года до 45 лет на дисбиоз толстого кишечника. Основным методологическим принципом работы явился комплексный симбиотический подход для изучения роли бифидофлоры в ассоциативном симбиозе человека [1]. Авторами проведены эксперименты *in vitro* с использованием бактериологического, масс-спектрометрического, хроматографического, иммунологического методов, что позволило представить комплексную характеристику исследуемых штаммов бифидобактерий. В работе были оценены параметры системообразующего фактора (СОФ) микросимбиоза (ростовые свойства — Ig ПМО, антилизотическая активность — АЛА и биопленкообразование — БПО доминанта); персистентные свойства (антииммуноглобулиновая — АИГА и антилактоферриновая — АЛФА активность); метаболический профиль (спектр и уровень уксусной — УК, пропионовой — ПК, масляной — МК, изомасляной — иМК, валериановой — ВК, капроновой — КК и изокапроновой — иКК) кислот и масс-спектр белков бифидобактерий.

Материалы по взаимодействию бифидобактерий с ассоциативным звеном микросимбиоза включили исследования: антагонистической активности (АА) бифидофлоры, ее способности к микробному распознаванию «своей-чужой», где в качестве параметров были использованы значения дискриминантных функций Д1 (распознавание «своего» микросимбионта) и Д2 (распознавание «чужого» микросимбионта) [3]. Раздел работы по изучению особенностей взаимодействия бифидобактерий с системой врожденного и адаптивного иммунитета макропартера включал результаты изучения способности метаболитов доминантов изменять продукцию (ПЦ) про- (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-8, IL-6) и противовоспалительных (IL-10, IL-1Ra) цитокинов. Данные исследования были проведены с помощью иммуноферментного анализа на модели перитонеальных макрофагов мышей-гибридов (СВАхС57В16) F1 и мононуклеаров периферической крови здоровых людей (доноров). Антипептидная активность (АПА) бифидобактерий оценивалась при соинкубировании супернатантов микроорганизмов с рекомбинантными цитокинами (FNO- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-17, IL-1Ra).

Выявление трех кластеров было осуществлено при помощи k-метода кластерного анализа с последующим использованием дискриминантного анализа для определения значимых параметров биологических свойств исследуемых штаммов бифидобактерий. Статистическая обработка материала выполнена средствами пакета Statistica 10.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе при поиске оптимального уровня кластеризации анализировали число и состав кластеров при разных значениях метрики расстояний, отложенных вдоль вертикальной оси полученной дендрограммы. Оптимальной считалась такая межкластерная дистанция, при которой частотное распределение штаммов в соответствующих кластерах было бы максимально ассиметричным. В результате этой работы определились 3 кластера, содержащих штаммы различных видов бифидобактерий.

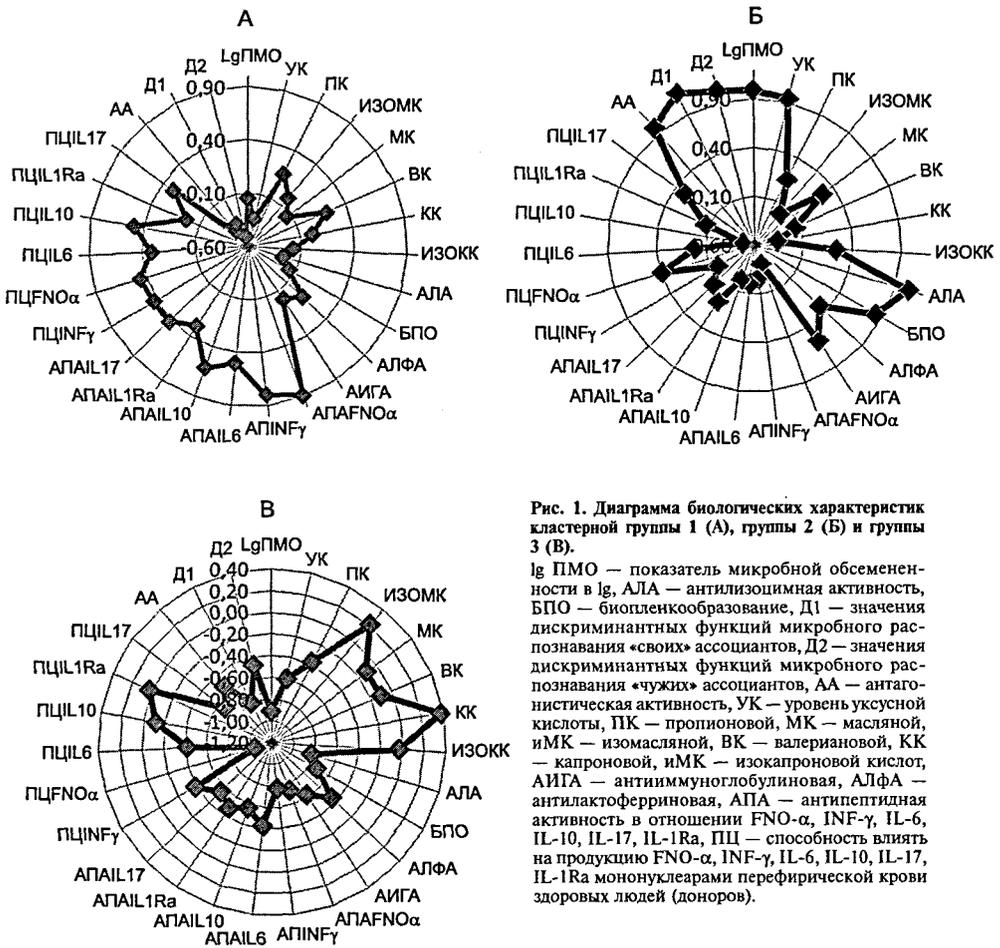


Рис. 1. Диаграмма биологических характеристик кластерной группы 1 (А), группы 2 (Б) и группы 3 (В).

Ig ПМО — показатель микробной обсемененности в Ig, АЛА — антилизосимная активность, БПО — биопленкообразование, Д1 — значения дискриминантных функций микробного распознавания «своих» ассоциантов, Д2 — значения дискриминантных функций микробного распознавания «чужих» ассоциантов, АА — антагонистическая активность, УК — уровень уксусной кислоты, ПК — пропионовой, МК — масляной, ИМК — изомасляной, ВК — валериановой, КК — капроновой, иМК — изокапроновой кислот, АИГА — антииммуноглобулиновая, АЛФА — антилактоферриновая, АПА — антипептидная активность в отношении FNO-α, INF-γ, IL-6, IL-10, IL-17, IL-1Ra, ПЦ — способность влиять на продукцию FNO-α, INF-γ, IL-6, IL-10, IL-17, IL-1Ra мононуклеарами периферической крови здоровых людей (доноров).

Однако природа такой группировки и причины наблюдаемой кластеризации и формирование групп штаммов для каждой из них не были очевидными. Уточнение этих вопросов легло в основу второго этапа анализа, состоящего в изучении физиологической специализации рассматриваемых кластерных групп с помощью k-метода кластерного анализа, который вычислял средние значения признаков по каждой из трех групп. Соответствующие спайдер-диаграммы признаков для каждой группы приведены на рис. 1, где значения каждого признака вычислялись как средние для каждого из k-кластеров и сравнивались для интерпретации процессов, определяющих физиологическую специализацию каждого кластера.

В результате анализа физиологической специализации рассматриваемых кластерных групп были установлены виды-лидеры и информативные критерии, значимые при их формировании. Так, первый кластер был представлен на  $52 \pm 1,2\%$  от выборки штаммами, принадлежащими к виду *B. bifidum*. Наиболее значимыми тестами для первой группы (рис. 1А) явились свойства, характеризующие способность метаболитов бифидобактерий проявлять антипептидную активность в отношении маркерных провоспалительных цитокинов Th1 (IFN-γ) и Th2 (TNF-α), а также регуляторного цитокина Tg1 (IL-10), включая и стимуляцию его продукции через иммунциты (ПЦ IL-10).

Выявление признаков, характеризующих способность бифидобактерий регулировать баланс про- и противовоспалительного цитокинов, как информативных показателей штаммов из 1 кластера, позволила определить роль *B. bifidum* в формировании иммунного гомеостаза через цитокиновый профиль хозяина. Известно, что бифидобактерии посредством изменения концентрации цитокинов в микроокружении клеток способны поддерживать цитокиновый гомеостаз и формировать необходимые условия, в которых реализуется созревание и поляризация дендритных клеток с дальнейшей направленной активацией эффекторов адаптивного иммунитета [4].

Во втором кластере было установлено преобладание вида бифидобактерий *B. longum* (в  $64 \pm 1,5\%$  случаев). Существенная роль среди всех анализируемых свойств бифидобактерий принадлежала семи параметрам (рис. 1Б), характеризующим участие доминантов в формировании вектора ассоциативного симбиоза человека — микросимбиоза. Значимыми были такие базовые характеристики микросимбионтов как репродуктивная функция (размножение, Ig ПМО) и адаптационный потенциал (антилизоцимный тест и образование биопленок) бактерий. Кроме того, важными явились способность бифидобактерий осуществлять микробное распознавание «свой-чужой» (D1/D2) и проявлять антимикробный эффект в отношении патогенов (антагонистическая активность и способность доминантов синтезировать уксусную кислоту). Известно, что в антимикробном эффекте бифидофлоры, помимо бактериоцинов, имеют значение карбоновые кислоты. Так, ацетат проявляет токсическое действие в отношении ряда патогенов (сальмонеллы, энтерогеморрагическая кишечная палочка, листерии, клостридии) за счет диффузии короткоцепочечных жирных кислот внутрь клеток, подавления их роста и процессов деления бактериальной клетки [13, 14].

Физиологическая специализация штаммов *B. longum* второго кластера, направленная на защиту биотопа и дискриминацию патогенов, оказалась значима в формировании кишечного гомеостаза человека. Первичная дискриминация «чужеродного материала» бифидобактериями — инициальный этап последующего «сигналинга» в регуляции иммунного гомеостаза хозяина, где первичный отбор микросимбионтов осуществляют преимущественно представители *B. longum* [3].

В третьем кластере видовой состав бифидофлоры был более разнообразный (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. breve*, *B. infantis*), а частотное распределение видов варьировало от 4 % до 28%. При оценке информативных параметров, определяющих вклад штаммов бифидобактерий в формирование третьего кластера (рис. 1В), обращает на себя внимание участие свойств, характеризующих способность доминантных бактерий к синтезу масляной, изомаляной, валериановой, капроновой и изокапроновой кислот. По литературным данным выявленные короткоцепочечные жирные кислоты имеют значение в энергетическом обмене и поддержании барьерной функции энтероцитов за счет увеличения синтеза соединительных белков (клаудин и окклюдин) [13].

## ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрение бифидобактерий с позиции ассоциативного симбиоза человека позволило приблизить нас к пониманию физиологической роли бифидофлоры, направленной на поддержание гомеостаза человека. Проведенный анализ комплекса биологических свойств, отражающих био-

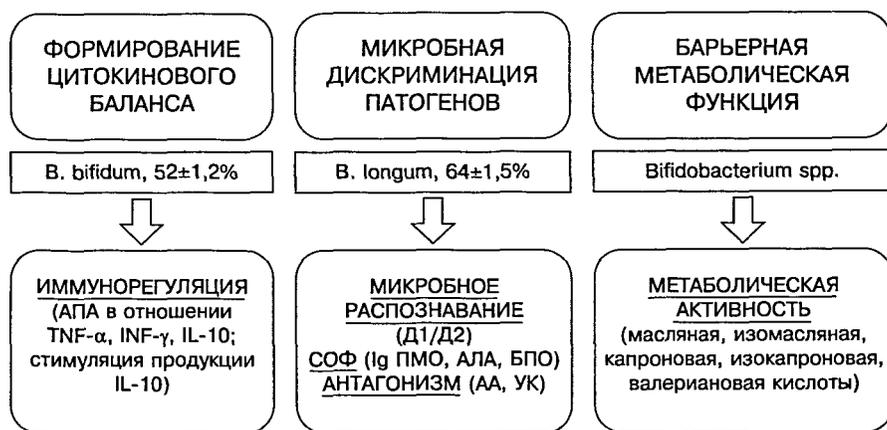


Рис. 2. Физиологическая роль бифидофлоры в защите кишечного биотопа.

коммуникативную активность бифидофлоры при формировании симбиотических отношений с организмом человека, позволил выявить функциональные кластеры бифидобактерий, характеризующие их способность участвовать в регуляции векторов «доминант-ассоциант», «доминант-макропартнер» при формировании гомеостаза биотопа толстого кишечника человека.

Полученные материалы позволили определить, что ключевая функция бифидофлоры в регуляции гомеостаза кишечного биотопа реализуется за счет образования функциональных кластеров, среди которых первая группа участвует в формировании цитокинового баланса, вторая — ответственна за микробное «распознавание» ассоциативных микросимбионтов и прямую защиту биотопа от патогенов, а третья необходима для поддержания барьерной метаболической функции энтероцитов в толстом кишечнике человека (рис. 2).

Выделение физиологических групп бифидофлоры может пояснить особенности структурной организации и функционирования консорциумов, представленных в кишечном микросимбиозе различными видами бифидобактерий, где лидирующие позиции занимают два вида: *B. longum* и *B. bifidum*. Как показали исследования для представителей *B. bifidum*, преобладающих в первом кластере, характерна физиологическая специализация, направленная на поддержании гомеостаза кишечной микробиоты через цитокиновый профиль хозяина. Тем самым формируется цитокиновое микроокружение дендритной клетки, которая, в свою очередь, направляет дифференцировку и созревание наивных CD4+ Т-лимфоцитов по пути образования регуляторных Т-клеток, контролирующей формирование иммунного гомеостаза биотопа толстого кишечника человека [2, 4].

Поддерживаемый цитокиновый баланс обеспечивает условия оптимального функционирования кишечного биотопа в условиях высокой антигенной нагрузки. И здесь приобретают значение представители *B. longum*, лидирующие во втором кластере, реализующие защитную функцию и способность бифидобактерий распознавать «свои» и «чужие» штаммы ассоциантов, регулируя формирование и функционирование микросимбиоза толстого кишечника человека. Учитывая, что первичная дискриминация «чужеродного материала» бифидобактериями — инициальный этап последующего «сигналинга» в регуляции иммунного гомеостаза хозяина.

Формирование гистологического барьера, реализуемое штаммами бифидобактерий третьего кластера, является важной физиологической функцией

нормофлоры, сохраняющей гомеостаз биотопа толстого кишечника, в условиях которого осуществляется дискриминация патогенов и поддержание баланса про- и противовоспалительных цитокинов. Таким образом, способность бифидофлоры объединяться в функциональные кластеры может способствовать выяснению механизмов интеграции доминантной микрофлоры (бифидобактерий) с организмом человека при ассоциативном симбиозе.

Наряду с этим, использование инфектологического подхода в изучении функциональных групп доминантов позволяет расширить круг возможностей клинического использования бифидобактерий: диагностика микрoэкологических нарушений биотопа (дисбиоз), разработка критериев для отбора биосовместимых композиций пробиотиков, а также конструирование новых биопрепаратов (про- и синбиотиков) для коррекции дисбиотических нарушений кишечной микробиоты с учетом физиологической «специализации» бифидобактерий.

*Работа выполнена при грантовой поддержке фундаментальных исследований по Программе УрО РАН «Фундаментальные науки — медицине», проект № 18-7-8-34 «Биосовместимость микроорганизмов в формировании микросимбиоза и создании новых композиций пробиотических препаратов».*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Перунова Н.Б., Усвяцов Б.Я., Черкасов С.В. Симбиоз и его роль в инфекции. Екатеринбург, УрО РАН, 2011.
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека. Екатеринбург, УрО РАН, 2014.
3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург, УрО РАН, 2014.
4. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н. Роль бифидобактерий в формировании иммунного гомеостаза человека. Журн. микробиол. 2015, 6: 98-104.
5. Aires J., Anglade P., Baraige F. et al. Proteomic comparison of the cytosolic proteins of three *Bifidobacterium longum* human isolates and *B. longum* NCC2705. BMC Microbiology. 2010, 10: 29.
6. Besten G., van Eunen K., Groen A. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. J. Lipid Res. 2013, 54 (9): 2325-2340.
7. Campana R., van Hemert S., Baffone W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. Gut Pathog. 2017, 9: 12.
8. Cheikhoussef A., Pogori N., Chen H. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. Food Control. 2009, 20: 553-559.
9. Ferrario C., Duranti S., Milani C. et al. Exploring amino acid auxotrophy in *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. Front. Microbiol. 2015, 6: 1331.
10. Kamada N., Núñez G. Role of the gut microbiota in the development and function of lymphoid cells. J. Immunol. 2013, 190 (4): 1389-1395.
11. Martinez F.A., Balciunas E.M., Converti A. et al. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. Biotechnol. Adv. 2013, 31 (4): 482-488.
12. Milani C., Lugli G.A., Duranti S. et al. Genomic encyclopedia of type strains of the genus *bifidobacterium*. Appl. Environ. Microbiol. 2014, 80: 6290-6302.
13. Sampson T.R., Mazmanian S.K. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. Cell Host Microbe. 2015, 17 (5): 565-576.
14. Sun Y., O'Riordan M.X.D. Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. Adv. Appl. Microbiol. 2013, 85: 93-118.
15. Turróni F., Taverniti V., Ruas-Madiedo P. et al. *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 modulates the host innate immune response. Appl. Environ. Microbiol. 2014, 80 (2): 730-740.

*Поступила 27.11.17*

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

## СОСТОЯНИЕ И ТЕНДЕНЦИИ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО СТРЕПТОКОККОВОЙ (ГРУППЫ А) ИНФЕКЦИИ В РОССИИ В ПОСЛЕДНИЕ ГОДЫ

Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

*Цель.* Изучить основные эпидемиологические проявления стрептококковой (группы А) инфекции в России и оценить масштаб проблемы. *Материалы и методы.* Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ данных официальной статистической отчетности (ф.2, ф.12) о заболеваемости и распространенности наиболее значимых форм СГА-инфекции за 2009 — 2016 гг. *Результаты.* Отмечено незначительное снижение показателей общей (суммарной) заболеваемости СГА-инфекцией в РФ. В среднем каждый год заболевали 1,8 млн человек, среди которых 600 тыс. — дети 0 — 14 лет. Анализ заболеваемости острой ревматической лихорадкой (ОРЛ) за 2009 — 2016 гг. показал отсутствие достоверной тенденции к снижению заболеваемости (2,0 на 100 тыс). Группа риска — подростки, основной удельный вес составляют взрослые (64%). Заболеваемость хроническими ревматическими болезнями сердца (ХРБС) в последние годы имеет достоверную тенденцию к росту показателей ( $t=3,8$ ;  $p<0,05$ ). Этой формой СГА-инфекции в среднем заболевают в 5 раз чаще, чем ОРЛ. Распространенность как ОРЛ, так и ХРБС продолжает достоверно снижаться. Ежегодно от ОРЛ и ХРБС умирают 2,5 тыс. человек. Заболеваемость скарлатиной в последние годы среди детского населения России достоверно уменьшилась с 240,7 до 129,7 на 100 тыс. населения ( $t=91,4$ ;  $p<0,05$ ). Распространенность хронических болезней миндалин и аденоидов (ХБМА) достоверно растет, что обусловлено в основном ростом этих показателей в группе взрослого населения. По сравнению с предшествующим периодом (1996 — 2007 гг.) улучшилась ситуация с заболеваемостью болезнями кожи и подкожной клетчатки (БКПК) и распространенностью болезней почек (БП). *Заключение.* Полученные данные свидетельствуют о высокой распространенности стрептококковой инфекции в стране.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 10—16

Ключевые слова: стрептококки группы А, заболеваемость СГА-инфекцией, острая ревматическая лихорадка, ревматическая болезнь сердца

*N.I.Briko, E.V.Glushkova*

## STATUS AND TRENDS OF THE EPIDEMIC SITUATION OF GROUP A STREPTOCOCCAL (GAS) INFECTIONS IN RUSSIA IN RECENT YEARS

Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

*Aim.* To study the main epidemiological manifestations of GAS infection in Russia and to assess the scale of the problem. *Materials and methods.* A retrospective epidemiological analysis of official statistical reporting data (f. 2, f. 12) about the incidence and prevalence of the most significant forms of group A streptococcal infection in 2009 — 2016 was performed. *Results.* There was a slight decrease in the total incidence of GAS infection in the Russian Federation. On the average, 1.8 million people fell ill every year, of which 600,000 were children aged 0 — 14. There was no reliable trend in incidence of acute rheumatic fever (ARF) in 2009 — 2016 (2.0 per 100 000 population). The risk group is adolescents. The main proportion is adults (64%). In recent years the incidence of rheumatic heart disease (RHD) increases significantly ( $t=3.8$ ,  $p<0.05$ ). On average this form of GAS infection occurs 5 times more often than the ARF. The prevalence of both ARF and RHD are decrease reliably. Annually 2500 people die from the ARF and RHD. In recent years the incidence of scarlet fever among the children of Russia significantly decreased from 240.7 to 129.7 per 100 000 population ( $t=91.4$ ,  $p<0.05$ ). The prevalence of chronic diseases of the tonsils and adenoids are significantly increasing. This growth is caused by an increase in the incidence

rate in the adult group. Compared with the previous period (1996 — 2007), the situation with the incidence of diseases of the skin and subcutaneous tissue and prevalence of kidney disease improved. *Conclusion.* The findings indicate a high prevalence of streptococcal infection in the country.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 10—16

Key words: group A streptococcus, incidence of GAS infection, acute rheumatic fever, rheumatic heart disease

## ВВЕДЕНИЕ

Стрептококк группы А является одним из основных патогенов человека и по оценкам ВОЗ входит в десятку наиболее распространенных причин заболеваемости и смертности при инфекционных заболеваниях [3]. *Streptococcus pyogenes* может поражать как ЛОР-органы, кожу (фарингит, ангина, рожа), так и вызывать токсин-опосредованные инфекции (скарлатина, СТШ). В ряде случаев поражения, вызванные стрептококком группы А, могут проявляться в виде инвазивной инфекции (некротический фасциит, миозит, сепсис, менингит и др.) или вызывать постстрептококковые аутоиммунные осложнения (ревматическая лихорадка, гломерулонефрит).

По данным на 2005 год, распространенность тяжелых случаев СГА-инфекции во всем мире составила примерно 18,1 миллионов, а ежегодная заболеваемость — 1,8 млн. Распространенность хронических ревматических болезней сердца (ХРБС) в разных странах варьировала от 1 до 150 случаев на 1000 детей. В промышленно развитых странах этой патологией поражены 1,5 млн, а в развивающихся — примерно 30 млн детей [3]. При этом после одного или нескольких эпизодов острой ревматической лихорадки (ОРЛ) могут развиваться ревматические болезни сердца, которые часто осложняются сердечной недостаточностью, что может приводить к преждевременной смерти. На 2010 год в мире насчитывалось около 34,2 миллионов человек, которые страдают ревматическими болезнями сердца, и приблизительно 345 тыс. смертей в год [5]. Большая часть случаев смерти приходится на страны с низким и средним уровнем дохода. Самые высокие в мире показатели заболеваемости ревматическими болезнями сердца регистрируются у коренного населения Австралии и Новой Зеландии. Так, у детей коренного населения Австралии в возрасте 5 — 14 лет заболеваемость в 2009 году варьировала в пределах 150 — 380 на 100 000 населения [10]. В Новой Зеландии в 2012 году среди майори и тихоокеанского населения этой же возрастной группы заболеваемость составила 40,2 и 81,2 на 100 000 населения соответственно [9]. Предполагают, что основной причиной развития ревматических болезней сердца в странах с тропическим климатом, таких как Австралия и Фиджи, является предшествующая стрептодермия (более 80 случаев на 100 детей в год) [8, 11, 13].

Ежегодная заболеваемость инвазивными формами СГА-инфекции (ИСИ) в США составляет 3,5 случая на 100 000 населения. В 1994 году в штате Миннесота заболеваемость инвазивной СГА-инфекцией составила 24 случая на 100 000 населения. В штате Монтана в 1999 году заболеваемость ИСИ достигла 30 случаев на 100 000 населения. По имеющимся данным на 2011 год смертность при некротическом фасциите в Европе составила 32%, при целлюлите — 17%, при СТШ — 44%, а на Фиджи и в Новой Каледонии — 100% [14]. В Кении уровень заболеваемости инвазивной СГА-инфекцией среди

новорожденных составляет 0,6 случаев на 1000 с самыми высокими показателями в первые две недели жизни [12].

В последние десятилетия в некоторых странах Азии отмечены крупные вспышки скарлатины. Так, в 2009 году во Вьетнаме было зафиксировано более 23 тысяч случаев, в Китае в 2011 г. — более 100 000 случаев, в Гонконге — более 1000 случаев, в Англии в 2013 г. — более 15 тыс. случаев [4,7]. По мнению ряда авторов, эти вспышки связаны с формированием нового варианта возбудителя в результате горизонтального переноса мобильных генетических элементов (ICE) и бактериофага, кодирующим суперантигены SSA и SPEC (ФНКU.vir). Эти мобильные генетические элементы экспрессируют суперантигены SSA и SPEC, а также отвечают за устойчивость к тетрациклину, эритромицину и клиндамицину [2]. В Южной Корее увеличился уровень заболеваемости скарлатиной с 0,3 случая на 100 000 человек в 2008 году до 13,7 случаев на 100 000 человек в 2015 году. Максимальная заболеваемость была отмечена в городе Кванджу и составила 61,5 случаев на 100 000 человек. Заболеваемость скарлатиной в Южной Корее начала расти в 2011 году и совпала с началом подъема заболеваемости скарлатиной в Китае и Гонконге [6]. В 2000 — 2007 гг. в России СГА-инфекция в среднем ежегодно отмечалась среди 3,1 млн человек (207,1 на 10 000 населения). Новых случаев регистрировалось 1,25 млн в год [1].

Цель исследования — изучить основные эпидемиологические проявления стрептококковой (группы А) инфекции в России и оценить масштаб проблемы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении ретроспективного эпидемиологического исследования было выполнено описательное сплошное исследование, основным методом которого являлся эпидемиологический анализ, а также статистические методы. Период исследования — 2009 — 2016 гг. В ходе исследования были проанализированы данные: из формы № 12 «Сведения о числе заболеваний, зарегистрированных у больных, проживающих в районе обслуживания лечебного учреждения» (заболеваемость и распространенность острой ревматической лихорадки (I00 — I02), хронических ревматических болезней сердца (I05 — I09), также путем суммирования ОРЛ и ХРБС был рассчитан обобщенный показатель — ревматизм; хронические болезни миндалин и аденоидов и перитонзиллярного абсцесса (J35 — J36), болезни кожи и подкожной клетчатки (L00 — L99), гломерулярных, тубулоинтерстициальных болезней почек и других болезней почек и мочеточника (N00 — N16, N25 — N29); из формы № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» использовались материалы о заболеваемости скарлатиной (A38); из формы № С-51 «Смертность населения Российской Федерации» использовались данные о смертности от ОРЛ и ХРБС.

Был проанализирован уровень и динамика многолетней заболеваемости и распространенности как среди всего населения, так и в различных возрастных группах населения Российской Федерации. Все данные группировались и сводились в таблицы. Были рассчитаны интенсивные и экстенсивные показатели. Оценка достоверности различий показателей осуществлялась с использованием критерия Стьюдента. Эпидемиологическая значимость определялась с использованием долей разницы показателей. Для построения линии тенденции использовалось выравнивание методом наименьших квадратов. Также был рассчитан среднегодовой темп прироста (СТП).

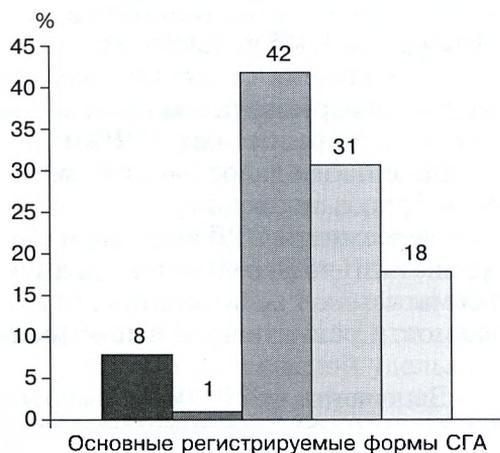
По данным литературы около 15% случаев острых респираторных заболеваний (ОРЗ), 80% ангины, 10% болезней кожи и подкожной клетчатки и 20% острых нефритов и гломерулонефритов вызваны СГА. Указанные величины были использованы для определения обобщенного числа случаев СГА-инфекции среди указанных нозологий с целью установления наиболее близкого к истинному значения показателя распространенности инфекции среди населения РФ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С 2009 по 2016 гг. в Российской Федерации было зарегистрировано более 14 млн случаев заболеваний, предположительно связанных со стрептококком группы А. В среднем ежегодно за период 2009 — 2016 гг. СГА-инфекцией заболевали 1,8 млн человек, что на 530 тыс. больше, чем за период 1996 — 2007 гг. [1]. Среди них более 500 тыс. (38%) — дети до 14 лет, 69,7 тыс. (5%) — подростки, 615,9 тыс. (45%) — взрослые и 159,3 тыс. (12%) — пенсионеры (женщины с 55 лет и мужчины с 60 лет). Общая (суммарная) заболеваемость СГА-инфекцией в России в 2009 — 2016 гг. характеризуется незначительным достоверным снижением показателей ( $t=15,4$ ;  $p<0,05$ ) со среднемноголетним значением 123,5 случая на 10 000 населения. Средний темп прироста составил 4%. Группами риска были дети и подростки. Среднемноголетние показатели в этих группах были 226,7 и 212,2 на 10 тыс. соответственно. При сравнении с заболеваемостью СГА-инфекцией в предшествующем периоде было выявлено, что удельный вес взрослых в общей заболеваемости СГА-инфекцией в последние годы увеличился на 7% и составил 57% (из них 12% — пенсионеры). Доля детей до 14 лет составила 38%, подростков — 5%.

При анализе многолетней динамики распространенности СГА-инфекции наблюдается достоверное снижение показателей с 2010 года ( $t=49,0$ ;  $p<0,05$ ). В среднем в России СГА-инфекция была ежегодно распространена среди 3,3 млн человек. Среди детей регистрировалось более 1 млн (30%) случаев, подростков — 188,6 тыс. (6%), взрослых — 1,7 млн (49%) и пенсионеров — 515,4 тыс. (15%) случаев соответственно. Наибольший вклад в распространенность СГА-инфекции принадлежал группе взрослых. Следует отметить, что в последние годы изменилась ситуация с заболеваемостью в группе подростков. Именно эта возрастная группа стала группой риска, в то время как в период 1996 — 2007 гг. группой риска были дети до 14 лет [1]. Среднемноголетний показатель в этой группе вырос в 1,5 раза по сравнению с периодом 1996 — 2007 гг. и составил 573,7 на 10 000. Доля официально регистрируемых форм СГА-инфекций в общей (суммарной) распространенности также была различной (рис.). Показатели распространенности были практически в 2 раза выше, чем показатели заболеваемости (табл.).

При анализе данных по заболевае-



Удельный вес основных форм стрептококковой (группы А) инфекции в общей распространенности СГА-инфекции в России за 2009 — 2016 гг.

Столбики слева направо — ревматизм, скарлатина, ХБМА, БКПК, БП.

Уровень заболеваемости и распространенности СГА-инфекции в России в 2009—2016 гг. (в показателях на 10 000 населения)

Годы	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Заболеваемость	117,8	132,9	132,0	132,9	129,7	128,4	124,9	125,7
Распространенность	202,7	236,4	236,5	228,1	234,1	233,6	229,2	229,0

мости острой ревматической лихорадкой (ОРЛ) за период 2009 — 2016 гг. не было выявлено достоверной тенденции к изменению показателей ( $t=1,8$ ;  $p>0,05$ ), тогда как за период 1996 — 2007 гг. он достоверно снижался [1]. Среднемноголетние показатели заболеваемости ОРЛ за 8 лет составили 2,0 на 100 000 населения. В последние годы в абсолютных показателях в среднем каждый год заболевали 2,8 тыс. человек. Основную долю заболевших людей составило взрослое население (64%). Группой риска по заболеваемости ОРЛ в РФ являются подростки. В этой группе отмечался достоверно наиболее высокий уровень заболеваемости (5,9 на 100 тыс. населения).

Анализ многолетней динамики заболеваемости хроническими ревматическими болезнями сердца (ХРБС) выявил достоверный рост показателей в последние годы ( $t=3,5$ ;  $p>0,05$ ), тогда как в периоде 1996 — 2007 гг. заболеваемость достоверно снижалась. Среднемноголетний показатель составил 9,7 на 100 тыс. населения. В среднем ХРБС каждый год формируются у 14 тыс. человек. Основную долю из них составила группа взрослого населения. Однако особого внимания заслуживает группа лиц старше 60 лет, т.к. именно среди них наблюдается выраженный рост заболеваемости (СТП=6%) со среднемноголетним показателем 9,8 на 100 тыс. населения.

В России отмечено снижение распространенности ХРБС в последние годы. СТП составил 2%. Эта форма патологии ежегодно была в среднем распространена среди 264 тыс. человек. Доля взрослого населения составила 98%. Группа риска — взрослые старше 60 лет, удельный вес которых в общей распространенности ХРБС составил 32%. Среднемноголетний интенсивный показатель распространенности в последние годы составил 183,1 на 100 000 населения ( $t=28,9$ ;  $p<0,05$ ). В среднем ХРБС зарегистрированы в 2009 — 2016 гг. у 264 045 человек, а в 1996 — 2007 гг. — 228 439 человек [1].

При изучении современных эпидемиологических проявлений различных форм суммарного ревматизма в последние годы в России было выявлено, что ситуация по ревматизму (ОРЛ и ХРБС) нестабильная. Если в предшествующем периоде наблюдалось достоверное снижение заболеваемости как ОРЛ, так и ХРБС, то в последние годы ситуация несколько осложнилась. Показатели заболеваемости ОРЛ перестали снижаться, а заболеваемость ХРБС достоверно растет ( $t=5,0$ ;  $p<0,05$ ). В среднем за восемь лет длительность одного случая ревматизма в России составила 20 дней. Группой риска по первичной заболеваемости ревматизмом в течение изучаемого периода была группа подростков.

Выявлено, что с 2010 г. смертность от ревматизма достоверно снижается ( $t=4,3$ ;  $p<0,05$ ). Среднемноголетний показатель смертности в последние годы составил 1,8 на 100 000 населения, что в 2,7 раза меньше, чем за период 1996 — 2007 гг. [1]. Смертность от ревматизма среди детей 0 — 17 лет практически не встречается. Ежегодно от ревматизма (ОРЛ и ХРБС) умирают 2,5 тыс. человек. За период с 2009 по 2016 гг. официально было зарегистрировано 20,6 тыс. смертей, что в три раза меньше, чем за период 1996 — 2007 гг. [1].

Ежегодно скарлатиной заболевают 32,6 тыс. детей 3 — 6 лет (69%), 9 тыс.

детей 7 — 14 лет (19%) и 4,3 тыс. детей 1 — 2 лет (9%), 793 взрослых (2%). Максимальное количество случаев скарлатины было зарегистрировано в 2012 году (55,8 тыс.). В 2016 году скарлатиной переболели 32,7 тыс. человек, что в 2 раза меньше, чем в 2007 году (64,7 тыс. человек). Динамика показателей заболеваемости скарлатиной характеризуется достоверным снижением величин с 36,5 на 100 тыс. населения до 22,4 на 100 тыс. населения. Среднемноголетний показатель заболеваемости составил 32,6 на 100 тыс. населения. Общая заболеваемость скарлатиной снизилась в сравнении с предшествующим периодом на 38,4% (в 1,6 раза).

В среднем ежегодно хроническими болезнями миндалин и аденоидов (ХБМА) страдают 1,4 млн человек, из которых 646 тыс. — дети до 14 лет. При анализе распространенности ХБМА среди различных возрастных групп населения выявлено, что в группе взрослых отмечен рост этого показателя на 10%, тогда как в остальных группах он снижается.

Динамика распространенности ХБМА в России среди всего населения отличалась достоверной тенденцией повышения в период с 2009 по 2016 гг. ( $t=49,6$ ;  $p<0,05$ ). Среднемноголетний показатель составил 96,0 на 10 000 населения. В исследуемый нами период группой риска по распространенности ХБМА была группа подростков, тогда как в предыдущие годы — дети до 14 лет. Среднемноголетние показатели в группе подростков составили 348,7 на 10 тысяч, что на 69,4 случаев больше, чем в предшествующем периоде (1996 — 2007 гг.). Основной удельный вес в распространенности ХБМА составили дети и взрослые (по 46% и 39% соответственно).

В среднем ежегодно болезнями кожи и подкожной клетчатки (БКПК) заболевают 778,2 тыс. человек, среди которых 440,6 тыс. — взрослые, 194,9 тыс. — дети до 14 лет, 121,8 тыс. — пенсионеры и 36,1 тыс. — подростки. Динамика заболеваемости БКПК в России в последние годы характеризуется достоверным ( $t=61,1$ ;  $p<0,05$ ) выраженным снижением показателей с 2010 года (СТП=12%). Среднемноголетний показатель за 8 исследуемых лет составил 5,4 на 1000, что выше среднемноголетнего показателя за период 1996 — 2007 гг. на 7,9 случаев. В последние годы заболеваемость БКПК в группе подростков была самой высокой со среднемноголетним показателем 11,0 на 1000. Наибольший вклад в совокупную заболеваемость БКПК в России принадлежит группе взрослых (56%).

Ситуация с болезнями почек (БП) в России складывается неоднозначная. С одной стороны, наблюдается незначительный рост заболеваемости ( $t=7,8$ ;  $p<0,05$ ), а с другой — незначительное снижение распространенности ( $t=17,1$ ;  $p<0,05$ ). В среднем каждый год в нашей стране БП распространены среди 586,6 тыс. человек. Среди них детей до 14 лет — 74,5 тыс. человек, подростков — 23,0 тыс. человек, взрослых — 354,4 тыс. человек, пенсионеров — 154,1 тыс. человек. Среднемноголетние показатели распространенности БП составили 40,6 на 10 тыс. человек. Группой риска в последние годы были подростки со среднемноголетним показателем 69,9 на 10 тыс. населения. Основной удельный вес в распространенности составила группа взрослых (59%). Динамика распространенности БП среди различных возрастных групп отличалась. Так, в группе взрослых наблюдался достоверный рост показателей распространенности ( $t=25,3$ ;  $p<0,05$ ), тогда как в остальных группах эти показатели уменьшались.

Среднегодовой показатель заболеваемости БП составил 6,9 на 10 тыс. населения. Группой риска также были подростки. Основную долю заболевших составило взрослое население (59%). Также весомый вклад в заболеваемость

вносили дети до 14 лет и лица пенсионного возраста (по 18% в обеих группах). При анализе заболеваемости БП в различных возрастных группах выявлена достоверная тенденция к увеличению показателей в группе взрослого населения ( $t=11,5$ ;  $p<0,05$ ) при достоверном снижении в группах детей ( $t=57,8$ ;  $p<0,05$ ) и подростков ( $t=39,3$ ;  $p<0,05$ ).

С 2014 года в России на основании Приказа Росстата № 52 от 28.01.2014 в официальную регистрацию была включена стрептококковая септицемия (A40). Обязательной регистрации подлежат: септицемия, вызванная стрептококком группы A, D, S. pneumoniae, а также другие стрептококковые септицемии и неуточненные (по МКБ-10). К сожалению, вклад стрептококковой септицемии в общую стрептококковую (группы A) заболеваемость по данным формы № 2 оценить невозможно в силу далеко неполной регистрации и учета всех ее случаев. Так, за 2014 — 2016 гг. было зарегистрировано всего 39 случаев стрептококковой септицемии. Наибольшее число случаев (23) было зарегистрировано в 2014 году, из них 5 случаев — со смертельным исходом. В последующие годы было выявлено 16 случаев (по 8 случаев в каждом году).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Клейменов Д.А. Эпидемиологическая характеристика стрептококковой (группы A) инфекции, предложения по улучшению ее иммунологической диагностики. Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 2009.
2. Ben Zakour N.L., Davies M.R., You Y. et al. Transfer of scarlet fever-associated elements into the group A Streptococcus M1T1 clone. Sci. Rep. 2015, 5: 15877.
3. Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K. et al. The global burden of group A streptococcal diseases. Lancet Infect. Dis. 2005, 5 (11): 685-694.
4. Chen M., Yao W., Wang X. et al. Outbreak of scarlet fever associated with emm12 type group A Streptococcus in 2011 in Shanghai, China. Pediatr. Infect. Dis. J. 2012, 31 (9): e158-e162.
5. Dassel J.L., Ralph A.P., Carapetis J.R. Controlling acute rheumatic fever and rheumatic heart disease in developing countries: are we getting closer? Curr. Opin. Pediatr. 2015, 27 (1): 116-123.
6. Davies M.R., Holden M.T., Coupland P. et al. Emergence of scarlet fever Streptococcus pyogenes emm12 clones in Hong Kong is associated with toxin acquisition and multidrug resistance. Nat. Genet. 2015, 47: 84-87.
7. Guy R., Williams C., Irvine N. et al. Increase in scarlet fever notifications in the United Kingdom, 2013/2014. Euro Surveill. 2014, 19 (12): 20749.
8. McDonald M.I., Towers R.J., Andrews R.M. et al. Low rates of streptococcal pharyngitis and high rates of pyoderma in Australian aboriginal communities where acute rheumatic fever is hyperendemic. Clin. Infect. Dis. 2006, 43: 683-689.
9. Milne R.J., Lennon D.R., Stewart J.M. et al. Incidence of acute rheumatic fever in New Zealand children and youth. J. Paediatr. Child. Health. 2012, 48 (8): 685-691.
10. Parnaby M.G., Carapetis J.R. Rheumatic fever in indigenous Australian children. J. Paediatr. Child. Health. 2010, 46 (9): 527-533.
11. Parks T., Smeesters P.R., Steer A.C. Streptococcal skin infection and rheumatic heart disease. Curr. Opin. Infect. Dis. 2012, 25 (2): 145-153.
12. Seale A.C., Davies M.R., Anampiu K. et al. Invasive group A Streptococcus infection among children, rural Kenya. Emerg. Infect. Dis. 2016, 22 (2): 224-232.
13. Steer A.C., Jenney A.W., Kado J. et al. High burden of impetigo and scabies in a tropical country. PLoS Negl. Trop. Dis. 2009, 3 (6): e467.
14. Yaddanapudi K., Hornig M., Serge R. et al. Passive transfer of streptococcus induced antibodies reproduces behavioral disturbances in a mouse model of pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection. Mol. Psychiatry. 2010, 15: 712-726.

*Поступила 23.10.17*

Контактная информация: Брико Николай Иванович, д.м.н., проф.,  
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, р.т. (499)248-04-13

## ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ И ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ У МУЖЧИН ТРУДОСПОСОБНОГО ВОЗРАСТА С РАЗЛИЧНЫМИ ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

<sup>1</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова,

<sup>2</sup>Московский государственный технический университет им. Н.Э.Баумана

*Цель.* Изучение прогностической эпидемиологической и экономической эффективности вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции у мужчин с различными хроническими заболеваниями. *Материалы и методы.* На основе данных литературы построена прогностическая модель (Марковская модель) и проведена оценка предполагаемой эффективности вакцинации в 5-летней перспективе у мужчин трудоспособного возраста против пневмококковой инфекции в снижении смертности, предотвращенной заболеваемости и экономического ущерба. По данным официальной статистической отчетности, группа высокого риска заболевания пневмонией в РФ включает 21 575 887 мужчин трудоспособного возраста. Источниками данных о стоимости заболевания служили государственные тарифы в системе ОМС за 2016 год, а о стоимости вакцинопрофилактики — результаты конкурсных торгов по закупкам конъюгированной пневмококковой 13-валентной вакцины (ПКВ13). *Результаты.* Экстраполяция данных отечественных и зарубежных исследований на когорту лиц с хроническими заболеваниями органов дыхания, болезнями системы кровообращения или сахарным диабетом показала значимое снижение риска развития осложнений основного заболевания ( $OR=0,58$ ,  $p<0,05$ ), числа госпитализаций ( $OR=0,02$ ,  $p<0,05$ ) и ожидаемой смертности на фоне вакцинации. Затраты на вакцинацию оцениваемой группы пациентов составили 25 869,5 млн руб. Применение ПКВ13 позволит статистически значимо сократить число обострений и соответственно госпитализаций, что позволит экономить в каждый последующий год после вакцинации около 14 359,9 млн руб. Таким образом, уже в 2-летнем горизонте суммарная экономия бюджетных средств составит 2 850,30 млн руб. В 5-летней перспективе будет сохранено как минимум 61 702 жизни пациентов при условии однократной вакцинации ПКВ13. *Заключение.* Результаты данного исследования свидетельствуют о высокой эпидемиологической и клинической эффективности вакцинации против пневмококковой инфекции мужчин трудоспособного возраста, страдающих хроническими заболеваниями. Она снижает заболеваемость, число обострений и госпитализаций, а также смертность в группе вакцинированных и является экономически выгодной инвестицией в здравоохранение.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 17—23

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, ишемическая болезнь сердца, вакцинопрофилактика, экономическая эффективность, смертность

N.I.Briko<sup>1</sup>, L.R.Batyrshina<sup>1</sup>, A.N.Briko<sup>2</sup>

## EVALUATION OF THE PROGNOSTIC EPIDEMIOLOGICAL AND ECONOMIC EFFICACY OF VACCINATION AGAINST PNEUMOCOCCAL INFECTION IN MEN OF WORKING AGE WITH VARIOUS CHRONIC DISEASES

<sup>1</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, <sup>2</sup>Bauman Moscow State Technical University, Russia

*Aim.* The study of the prognosis of epidemiological and economic effects of pneumococcal vaccination in laboring males with various chronic diseases. *Materials and methods.* Within the predictive (Markov) model, based on the published data, assessment of 5-year horizon pneumococcal vaccination of laboring males perceived effectiveness in reducing mortality, avoiding morbidity and economic loss in the country had been processed. According to the official statistics in

the Russian Federation 21 575 887 laboring males are within the high risk group for contracting pneumonia. Data source for the cost of the healthcare for disease had been the compulsory health insurance system 2016 state tariffs, for the vaccination cost results of the PCV13 procurement bidding had been used. *Results.* Data extrapolation from national and international studies to the cohort of individuals with chronic respiratory diseases, cardiovascular diseases and diabetes mellitus vaccinated against pneumococcal infection showed a significant decrease in the risk of underlying diseases complications (OR=0,58, p<0,05), hospitalizations number (OR=0,02, p<0,05) and expected mortality. The cost of vaccination in the evaluated group of patients was 25 869.5 mln RUB. According to the modeling results PCV13 use will allow to statistically significantly decrease the number of relapses and hospitalizations that will permit to save up to 14 359.9 mln rubles annually. Thus, in the two-year horizon, the total fiscal savings will amount to 2 850.30 million RUB and at least 61 702 of the patients' lives retained in a 5-year term with a single dose PCV13 administration. *Conclusion.* The study results indicate potential high epidemiological and clinical effectiveness of pneumococcal vaccination of the laboring males suffering from chronic diseases. Vaccination as a cost-effective investment in healthcare creates the opportunity of reductions in morbidity, number of exacerbations, hospitalization rate and mortality in the vaccinated cohort.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 17–23

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, ischemic heart disease, vaccination, economic efficiency, mortality

## ВВЕДЕНИЕ

Пневмококковая инфекция, согласно данным Всемирной организации здравоохранения, признана ведущей причиной смертности у детей и взрослых (ВОЗ, 2014 г.). Она может протекать в форме таких инвазивных заболеваний, как менингит, сепсис или септическая пневмония, причем последняя является наиболее часто встречающимся вариантом инвазивной инфекции у взрослых лиц. В то же время, роль неинвазивных заболеваний (пневмонии без бактериемии — до 85% всех пневмоний у взрослых, отитов, синуситов) также достаточно велика, отдаленная смертность при неинвазивной пневмонии даже превышает таковую при инвазивных формах заболевания.

В настоящее время прогрессирующими темпами растет резистентность возбудителя к антибиотикам, что вызывает определенные трудности в лечении пневмоний. Показатель смертности от пневмонии в 2016 году составил 4,9 на 100 тыс. населения (для детей до 17 лет — 0,4 на 100 тыс. населения). За последние 5 лет отмечается значимое увеличение этого показателя (2,26 на 100 тыс. в 2012 г.). Данные показатели на различных территориях варьируют от отсутствия случаев до 22,1 на 100 тыс. населения [2].

Особенно актуальна проблема заболеваемости пневмонией и смертности от нее для лиц с хроническими заболеваниями за счет наличия у них дополнительных фоновых факторов риска, повышающих восприимчивость к инфекции и ухудшающих прогноз. Например, каждый 10 пациент с хронической обструктивной болезнью легких умирает в 30-дневный срок после перенесенной внебольничной пневмонии [14]; каждый 5 пациент с хроническими болезнями сердечно-сосудистой системы умирает в 30-дневный срок после перенесенной внебольничной пневмонии [11, 24, 25]; каждый 10 пациент с сахарным диабетом умирает в 30-дневный срок после перенесенной внебольничной пневмонии [20, 21].

По данным экспертов, вакцинопрофилактика является одним из наиболее эффективных методов снижения заболеваемости пневмонией. Эффективность

вакцинации конъюгированной пневмококковой 13-валентной вакциной (ПКВ13) относительно эпизодов заболевания внебольничными пневмониями у пациентов с сахарным диабетом достигает 89,5% [18, 20], у пациентов в возрасте старше 65 лет — 45,5% [15, 17], а эффективность ПКВ13 относительно инвазивных пневмококковых инфекций достигает 75% [15, 17]. Вакцинация против пневмококковой инфекции предполагает протективный эффект и снижение летальности [16]. Исследования CAPITA [15], а также данные российских ученых [3, 5 — 7] продемонстрировали долгосрочное сохранение эффекта вакцинации. Для всех возрастных групп вакцинация против пневмококковой инфекции несет также потенциал снижения уровня антибиотикорезистентности, что соответствует глобальной стратегии ВОЗ.

В сравнении с вакцинами предыдущего поколения (простыми полисахаридными), конъюгированная вакцина имеет ряд преимуществ: формирование иммунной памяти и возможности длительной защиты при однократном применении, высокая иммуногенность, доказанная профилактическая эффективность в отношении внебольничных пневмоний, серотип-специфическое влияние на носительство пневмококка и формирование коллективной защиты [8, 18, 19, 21, 22].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках представленного исследования оценивались данные отечественной и зарубежной статистики о заболеваемости и смертности от пневмонии среди мужчин трудоспособного возраста, страдающих хроническими заболеваниями. Оценивались данные о заболеваемости, частоте обострений, госпитализаций и смертность, а также текущие расходы системы здравоохранения на ведение больных с данной нозологией и возможная экономия ресурсов на фоне вакцинопрофилактики.

Первый этап исследования включал информационный поиск публикаций об эпидемиологии пневмонии и эффективности вакцинации в базах данных PubMed и eLIBRARY, а также поиск данных государственной статистики. При этом предпочтение отдавалось источникам, демонстрирующим отечественные эпидемиологические данные [12, 13].

На основании этих данных построена Марковская модель [1, 4, 14], позволяющая спрогнозировать число эпизодов заболевания, обострений, госпитализаций, а также выживаемость у мужчин в пятилетнем горизонте исследования, а также оценить текущие расходы системы здравоохранения на данную группу лиц и возможность экономии ресурсов системы здравоохранения в случае профилактики заболевания пневмонией с применением ПКВ13.

При этом источниками данных о стоимости эпизодов заболевания, госпитализации мужчин по причине пневмонии или основного заболевания, амбулаторных визитов к врачу служили государственные тарифы в системе ОМС за 2016 год, источником данных о стоимости вакцинопрофилактики служили результаты конкурсных торгов по закупкам вакцины.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно официальным данным, популяция мужчин трудоспособного возраста, страдающих хроническими заболеваниями, в Российской Федерации составляет 21 575 887 человек, включая 2 102 041 лиц с хроническими заболеваниями органов дыхания, 15 328 394 — страдающих сердечно-сосудистыми

заболеваниями и 4 145 452 больных сахарным диабетом [10]. Установлено, что на фоне заболеваемости внебольничными пневмониями (ВБП) в общей популяции, составившей в 2016 году 418 эпизодов на 100 тыс. человек [13], заболеваемость в группах пациентов с дополнительными факторами риска значительно выше. Так, эпизоды ВБП среди больных хроническими заболеваниями легких отмечаются в 8,9 раза чаще, чем в общей популяции, среди больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями — в 5,1 раза и в 3,1 раза — среди больных сахарным диабетом [22, 23]. Учитывая представленные данные, можно ожидать, что в группе из 21 575 887 мужчин трудоспособного возраста, страдающих хроническими заболеваниями, в течение года будет отмечено 458 688 эпизодов заболеваний ВБП (из них у лиц с хроническими заболеваниями органов дыхания — 78 200, системы кровообращения — 326 771, СД — 53 717).

Согласно действующим клиническим рекомендациям [9], в случае эпизода заболевания ВБП у больных с факторами риска показано стационарное лечение пациента. В рассматриваемом случае ожидается 458 688 госпитализаций в год, при этом ежегодная выживаемость больных ВБП, не получавших вакцинопрофилактику, составляет 84,6% от числа госпитализированных больных [16]. Таким образом, в отсутствие вакцинопрофилактики пятилетняя выживаемость составит 198 778 человек. В то же время, вакцинопрофилактика с применением ПКВ13 позволяет повысить ежегодную выживаемость среди госпитализированных больных до 89,3% пациентов, или до 260 480 человек в анализируемой популяции в течение пяти лет. Таким образом, без учета сокращения заболеваемости и числа госпитализаций по причине ВБП вакцинопрофилактика позволит повысить пятилетнюю выживаемость на 61 702 человека (23,7%) (табл. 1).

Необходимо отметить, что согласно данным государственной статистики, в 2016 году в России госпитализируются лишь 94% заболевших ВБП (327 303 из 347 944 больных с внебольничной пневмонией [12, 13], и 6% пациентов не получили необходимого объема медицинской помощи, что позволяет ожидать несколько более негативных прогнозов о ежегодной выживаемости больных и потенциально лучший эффект от вакцинопрофилактики на фоне сокращения заболеваемости.

Влияние вакцинопрофилактики с применением ПКВ13 на число эпизодов ВБП у больных с хроническими заболеваниями легких также было изучено Игнатовой Г.Л. и др. [6] на примере популяции больных с ХОБЛ в Челябинской области. Авторами установлено, что в данной популяции пациентов вакцинопрофилактика позволяет сократить число пневмоний в течение одного года после вакцинации в 6 раз в сравнении с исходным уровнем заболеваемости. Таким образом, можно ожидать в группе из 2 102 041 мужчин с хроническими заболеваниями органов дыхания сокращение числа пневмоний с 78 200 до 13 033 эпизодов, при этом пятилетняя смертность в группе пневмоний составит лишь 5 632 человека, сократившись в 7,8 раза в сравнении с отсутствием вакцинопрофилактики при условии, что все заболевшие получают необходимый объем медицинской помощи.

Таблица 1. Прогноз пятилетней выживаемости госпитализированных пациентов с внебольничной пневмонией

Год	Без вакцинации	Вакцинированные против пневмококковой инфекции	Количество сохраненных жизней
0	458 688	458 688	0
1	388 050	409 608	21 558
2	328 290	365 780	37 490
3	277 734	326 642	48 908
4	234 963	291 691	56 728
5	198 778	260 480	61 702

Вакцинопрофилактика позволяет значительно снизить заболеваемость и смертность больных, однако это также потребует значительных ресурсов — стоимость вакцины для профилактики пневмококковых инфекций составляет 1199 рублей за одну дозу (минимальная цена в Российской Федерации, по которой осуществлена закупка в 2017 году вакцины Минздравом России). Максимальный эпидемиологический эффект может быть получен при одновременной вакцинации всех взрослых из групп риска и обеспечения последующей вакцинации лиц с впервые установленным диагнозом.

С учетом численности подлежащего иммунизации контингента потребность в вакцине для профилактики пневмококковых инфекций составляет для лиц из групп риска 21 575 887 доз стоимостью 25 869,5 млн руб., из них: для лиц с хроническими заболеваниями органов дыхания — 2 102 041 доза (2 520 347 тыс. руб.), для лиц, страдающих болезнями системы кровообращения — 15 328 394 дозы (18 378 744 тыс. руб.), для лиц, страдающих сахарным диабетом — 4 145 452 дозы (4 970 396 тыс. руб.).

Однако данные издержки системы здравоохранения, связанные с программой по вакцинации пациентов из группы повышенного риска, в значительной мере будут компенсированы за счет сокращения последующих затрат на лечение обострений основного заболевания (ОР=0,58,  $p<0,05$ ), госпитализаций (ОР=0,02,  $p<0,05$ ), а также эпизодов заболевания ОРВИ (ОР = 0,12,  $p<0,05$ ) [3]. Начиная со второго года после вакцинации, будет достигнута экономия бюджетных средств, увеличивающаяся в последующие годы, не требующие повторной вакцинации (табл. 2).

Учитывая действующие тарифы в системе ОМС (2016 год), суммарные расходы системы здравоохранения на ведение 21 575 887 пациентов составляют 16 840,59 млн руб. ежегодно, в то время как расходы в группе вакцинированных больных составят 28 350,18 млн руб. Однако начиная со второго года, когда повторная вакцинация не требуется, издержки, связанные с лечением обострений, пневмонией, госпитализациями и эпизодами ОРВИ у ранее вакцинированных пациентов составят всего 2 480,69 млн руб. в сравнении с 16 840,59 млн руб. в отсутствие вакцинации (расходы системы здравоохранения сократятся в 6,8 раза). Таким образом, по сумме двух лет ожидаемая экономия бюджета составит 2 850,30 млн руб., а в последующие годы, не требующие повторной вакцинации, экономия будет расти, так после вакцинации защитный эффект сохраняется на протяжении 4 лет и более [7, 17].

Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что вакцинация против пневмококковой инфекции обладает высокой протективной эффективностью и в перспективе при-

Таблица 2. Результаты анализа затрат на ведение больных с факторами риска заболевания пневмонией

Горизонт исследования	Осложнение	Расходы без вакцинации (руб.)	Расходы с вакцинацией (руб.)
1 год	Обострение	3 540 173 699	2 053 300 746
	Пневмония	65 708 792	39 425 275
	Госпитализация	12 001 989 948	240 039 799
	ОРВИ	1 232 714 946	147 925 793
Всего 1 год (млн руб.)		16 840,59	28 350,18
2 год	Обострение	3 540 173 699	2 053 300 746
	Пневмония	65 708 792	39 425 275
	Госпитализация	12 001 989 948	240 039 799
	ОРВИ	1 232 714 946	147 925 793
Всего 2 год (млн руб.)		16 840,59	2 480,69
Всего за 2 года (млн руб.)		33 681,17	30 830,87
Экономия (млн руб.)			2 850,30

Примечание. Стоимость вакцинации — 25 869 488 513 руб.

ведет к существенному снижению летальности в группе вакцинированных мужчин, страдающих хроническими заболеваниями. Для трудоспособного возраста вакцинация против пневмококковой инфекции может рассматриваться как стратегическая инвестиция с точки зрения сохранения человеческого потенциала, повышения трудового потенциала, снижения социально-экономических потерь не только за счет влияния на смертность, но и за счет снижения заболеваемости, числа обострений и госпитализаций, прямых и непрямых медицинских и немедицинских затрат. Для лиц старше трудоспособного возраста, продолжающих трудовую деятельность, выше обозначенные перспективы также справедливы. Понесенные расходы на вакцинацию группы риска в значительной степени окупятся за счет сокращения расходов, связанных с лечением обострений, госпитализаций, эпизодов ОРВИ, а начиная со второго года — позволят достигнуть экономии бюджетных средств.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вентцель Е. С. Теория вероятностей. М., Наука, 1969.
2. Государственный доклад от 26 мая 2017 г. «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году». [http://www.rosпотребнадzor.ru](http://www.rosпотребнадзор.ru).
3. Демко И.В. Опыт вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции у взрослых на примере Красноярского края. Пульмонология. 2017, 27 (1): 21-28.
4. Дынкин Е.Б. Марковские процессы. М., Государственное изд-во математической литературы. М., 1963.
5. Игнатова Г.Л., Антонов В.Н. Влияние вакцинопрофилактики на качество жизни и прогностические индексы у больных хронической обструктивной болезнью легких. Пульмонология. 2016, 26 (4): 385.
6. Игнатова Г.Л., Антонов В.Н., Родионова О.В. Эффективность вакцинопрофилактики конъюгированной пневмококковой вакциной у больных хронической обструктивной болезнью легких за 3 года. Consilium medicum. 2016, 18 (3): 42-46.
7. Игнатова Г. Л., Антонов В. Н. Эпидемиологические особенности хронической респираторной патологии при вакцинации против пневмококковой инфекции. Пульмонология. 2017, 27 (3): 363-370.
8. Инструкция по применению лекарственного препарата Превенар®13 (ЛП000798-041016).
9. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых, 2014.
10. Общая заболеваемость взрослого населения России в 2015 г. МЗ РФ Департамента мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения и ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» МЗ РФ.
11. Поляков Д.С., Фомин И.В., Валикулова Ф.Ю. и др. Оценка влияния внебольничной пневмонии на краткосрочный и долгосрочный прогноз у больного с декомпенсацией хронической сердечной недостаточности. Тер. арх. 2016, 88 (9): 17-22.
12. Сведения о деятельности подразделений медицинской организации, оказывающих медицинскую помощь в стационарных условиях за 2015 г. Форма 14. Приказ Росстата: Об утверждении формы от 27.11.2015 № 591.
13. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях за 2015 г., 2016 г. Форма 2. Приказ Росстата: Об утверждении формы от 28.01.2014 № 52.
14. Ягудина Р. И., Серпик В. Г. Методологические основы фармакоэкономического моделирования. Фармакоэкономика: теория и практика. 2016.
15. Bewick T., Sheppard C., Greenwood S. et al. Serotype prevalence in adults hospitalised with pneumococcal non-invasive community-acquired pneumonia. Thorax. 2012, 67 (6):540-545.
16. Baldo V., Cocchio S., Gallo T. et al. Pneumococcal conjugated vaccine reduces the high mortality for community-acquired pneumonia in the elderly: an italian regional experience. PLoS One. 2016 Nov 15, 11 (11): e0166637.

17. Bonten M.J.M. et al. Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults. *N. Engl. J. Med.* 2015, 372: 1114-1125.
18. Dagan R., Patterson S., Juergens C. et al. Comparative immunogenicity and efficacy of 13-valent and 7-valent pneumococcal conjugate vaccines in reducing nasopharyngeal colonization: a randomized double-blind trial. *Clin. Infect. Dis.* 2013 Oct; 57 (7): 952-962.
19. EMA Oct 2011: European public assessment report (EPAR) for PCV13 EMA/562289/2011 <http://www.ema.europa.eu/home>.
20. Huijts S.M. et al. Post-hoc analysis of a randomized controlled trial: Diabetes mellitus modifies the efficacy of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in elderly. *Vaccine.* 2017 Apr 12. pii: S0264-410X(17)30151-2.
21. Luna C.M., Palma I., Niederman M.S. et al. Impact of age and comorbidities on the mortality of patients of different age groups admitted with community-acquired pneumonia. *Soc.* 2016 Sep;13 (9): 1519-1526.
22. Paradiso R.P. Pneumococcal conjugate vaccine for adults: a new paradigm. *Vaccines.* CID 2012, 55 (15 July): 259-264.
23. Shea K.M. et al. Rates of pneumococcal disease in adults with chronic medical conditions. *Open. Forum. Infect. Dis.* 2014 May 27; 1 (1): ofu024.
24. Waight P.A., Andrews N.J., Ladhani N.J. et al. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2015 Jun; 15 (6): 629.
25. Yang Y. et al. Efficacy and significance of various scores for pneumonia severity in the management of patients with community-acquired pneumonia in China. *Chin. Med. J. (Engl).* 2012 Feb; 125 (4): 639-645.

*Поступила 04.10.17*

Контактная информация: Брико Николай Иванович, д.м.н., проф.,  
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, (499)248-04-13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*О.Г.Орлова<sup>1</sup>, О.В.Рыбальченко<sup>1</sup>, М.В.Эрман<sup>1</sup>, Т.М.Первунина<sup>1,2</sup>, А.Ю.Фонтуренко<sup>1</sup>*

## **РИСК РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА У ДЕТЕЙ С СОЧЕТАНЫМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ СЕРДЦА И ПОЧЕК**

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, <sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова, Санкт-Петербург

*Цель.* Выявить потенциальных возбудителей заболеваний, способствующих развитию инфекционного процесса при осложнениях в послеоперационный период у детей с врожденными пороками развития сердца и почек, для разработки эффективной профилактики катетер-ассоциированной мочевой инфекции. *Материалы и методы.* Клиническим материалом для исследования служили образцы испражнений, мочи и мочевых катетеров Фолея (Upomedica) от шестнадцати детей с врожденными пороками сердца, находившихся на лечении в НМИЦ им. В.А.Алмазова. Таксономическую принадлежность выделенных чистых культур определяли, используя идентификационные системы RapID Systems (США). Чувствительность выделенных из клинического материала бактерий к антимикробным препаратам анализировали методом дисков (НИЦФ, Россия). Электронно-микроскопический анализ микробных популяций на катетерах проводили, используя сканирующую электронную микроскопию. Полученные культуры *Escherichia coli* тестировали на наличие генов  $\alpha$ -гемолизина hly A, B, C с помощью ПЦР в реальном времени на детектирующем амплификаторе DTlite (ДНК-Технология, Россия). *Результаты.* В моче у 3 из 16 пациентов выделены *Staphylococcus aureus* и *E. coli*. При посеве испражнений у 56% пациентов обнаружены грамположительные кокки, а у 44% — грамотрицательные палочки. У 10 из 16 пациентов выделены культуры микроорганизмов с внутренней поверхности стенок катетеров; преобладали смешанные культуры, среди которых преобладали *S. aureus* и *E. coli*. 85% штаммов *S. aureus*, выделенных со стенок мочевых катетеров, проявляли устойчивость к метициллину. У 60% культур *E. coli* определены гены

$\alpha$ -гемолизин (hly A, B, C), способствующих формированию бактериальных биопленок. При электронно-микроскопическом исследовании в двух образцах мочевых катетеров обнаружены актиномицетоподобные формы бактерий, не выявляемые при первичном бактериологическом исследовании. *Заключение.* Ранняя диагностика катетер-ассоциированных мочевых инфекций у детей с врожденными пороками развития сердца требует разработки комплексного подхода, включающего наряду с классическим микробиологическим анализом обязательное использование других современных методов диагностики.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 23—31

Ключевые слова: врожденные пороки развития сердца и почек, катетер-ассоциированная инфекция, ген hly, метициллинрезистентность, *Actinotignum*, сканирующая микроскопия

O.G.Orlova<sup>1</sup>, O.V.Rybalchenko<sup>1</sup>, M.V.Erman<sup>1</sup>, T.M.Pervunina<sup>1,2</sup>, A.Yu.Fonturenko<sup>1</sup>

## CATHETER-ASSOCIATED URINARY TRACT INFECTION IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART AND KIDNEY DISEASE

<sup>1</sup>St. Petersburg State University, <sup>2</sup>National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia

*Aim.* To detect pathogens that are capable of causing diseases or infections as postoperative complications in children with congenital heart and kidney disease, to be effective at preventing catheter-associated urinary tract infection. *Materials and methods.* Clinical material served samples of excrement, urine and urinary catheters of Foley (Unomedica) from sixteen children with congenital heart disease, who were being treated at the Almazov Medical Research Center. The isolated strains were classified according to the identification RapID Systems (USA). Antibiotic sensitivity of isolated bacteria was performed by the disk diffusion method (NICF, Russia). Scanning electron microscopy (SEM) imaging revealed several types of bacterial communities on intraluminal surface of urethral catheter. *Escherichia coli* strains were tested for presence of virulence genes  $\alpha$ -hemolysin: hly A, B, C by real-time PCR testing (using the detecting amplifier DTLite (DNA Technology, Russia)). *Results.* The main microbial agents were isolated in urines samples from 3 of 16 patients were *Staphylococcus aureus* and *E. coli*. Gram-positive cocci were found in 56% samples of excrement and Gram-negative in 44% samples. It was found that on intraluminal surface in 10 out of 16 urethral catheter samples mixed microbial cultures were isolated, *S. aureus* and *E. coli* were prevailed. Methicillin-resistant strains of *S. aureus* (MRSA) have been reported in 85% cases. *E. coli*  $\alpha$ -hemolysin (hly A, B, C) were identified in 60% strains. SEM examination two samples of urinary catheters revealed actinomycetes-like forms of bacteria that were not detected in the primary bacteriological study. *Conclusion.* Early diagnosis of catheter-associated urinary tract infections in children with congenital heart and kidney disease requires a comprehensive approach to setting detecting priorities and selecting the most effective microbiological analysis, and is mandatory to use modern diagnostic methods.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 23—31

Key words: congenital heart and kidney disease, catheter-associated urinary tract infection, hly gene, methicillin resistance, *Actinotignum*, scanning electron microscopy

## ВВЕДЕНИЕ

Врожденные пороки развития остаются на сегодняшний день одной из основных проблем медицины, они являются наиболее серьезными отклонениями в здоровье детей и вносят значительный процент в мертворождаемость, в младенческую и детскую смертность, инвалидизацию и общее ухудшение качества жизни. Врожденные пороки занимают второе место среди причин

мертворождаемости (60,75 на 100 000), неонатальной и младенческой смертности (190,0 и 344,1 на 100 000 живорожденных соответственно) а также после состояний, возникающих в перинатальном периоде (664,1 на 100 000) [2].

По регистру EUROCAT, включающем 1,5 миллиона ежегодных рождений в 22 странах, врожденные пороки сердца (ВПС) были наиболее распространенными среди нехромосомных пороков (6,5 на 1000 родившихся), а аномалии почек заняли третье место (3,1 на 1000 родившихся) [7]. В Российском регистре пороков развития врожденные пороки сердечно-сосудистой системы по распространенности занимают первое место (33,89%), а мочевыделительной системы — третье место (17,18%) [1].

Мета-анализ в более, чем в 100 публикациях с 1930 по 2009 гг. о частоте ВПС, позволил установить выраженную динамику увеличения распространенности в человеческой популяции как всех ВПС, так и отдельных нозологических форм пороков (септальные дефекты и открытый артериальный проток).

Врожденные аномалии почек и мочевого тракта составляют 20 — 30% всех пороков, идентифицированных в пренатальном периоде; 0,3 — 1,6 — на 1000 новорожденных детей; 3 — 6 — на 1000 детей всех возрастов; 34 — 59% — всех случаев хронической болезни почек у детей; 30 — 60% — детей и молодых взрослых пациентов в конечной стадии хронической почечной недостаточности (ХПН) [3]. Врожденные пороки сердца и почек могут быть изолированными, сочетанными врожденными пороками сердца и почек и частью наследственных и врожденных синдромов. G.Cocchi et al. установили, что у детей с пороками мочеполовой системы врожденные пороки сердца встречались в 10 раз чаще, чем в общей популяции детей [5]. R.Greenwood et al. отметили наличие врожденных пороков сердца у 23% детей с врожденными пороками почек и мочевыделительной системы [8]. Ежегодно в мире около 1 миллиона человек подвергаются кардиохирургическим операциям, причем развивающиеся осложнения оказывают существенное влияние на результаты лечения [16]. Любое оперативное вмешательство связано с риском развития осложнений в виде развития инфекционного процесса за счет эндогенной микробиоты или экзогенных микроорганизмов. Предотвращение развития инфекционного процесса — серьезная проблема общественного здравоохранения во всех развитых странах.

Цель работы — выявить потенциальных возбудителей заболеваний, участвующих в развитии инфекционного процесса при осложнениях в послеоперационный период у детей с врожденными пороками развития сердца и почек, для разработки эффективной профилактики катетер-ассоциированной мочевой инфекции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили образцы испражнений, мочи и мочевых катетеров Фолея (Unomedical) от шестнадцати детей с ВПС, находившихся на лечении в ФГБУ МИЦ им. В.А.Алмазова. Образцы для исследования отбирали на 5 день после операции — хирургической коррекции врожденных пороков сердца. Материал из образцов высевали на жидкую питательную среду сердечно-мозговой бульон Bio-RadLaboratories SAS (Франция) и плотную питательную среду — колумбийский агар (HiMedia, Индия) с добавлением 5% крови. Таксономическую принадлежность выделенных чистых культур определяли с помощью идентификационных систем RapID Systems (США). Чувствительность выделенных из клинического материала бактерий к антимикробным препаратам анализировали методом дисков (НИЦФ, Россия).

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

Полученные культуры *E. coli* тестировали на наличие генов *hly A, B, C* (прямой праймер (f) 5'-3'TAT-TGG-GAC-CAC-GCG-TGS-CG) (Beagle, РФ). Исследование генов проводили с помощью ПЦР в реальном времени на детектирующем амплификаторе DTlite (ДНК-технология, Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Бактериологический посев мочи выявил наличие роста микроорганизмов только у 3 из 16 пациентов. При этом титр бактерий в моче не превышал 10<sup>3</sup> КОЕ/мл. Идентификация полученных микроорганизмов показала, что у одного пациента выделен *S. aureus*, а у двух — *E. coli*.

При посеве испражнений у 56% пациентов обнаружены грамположительные кокки, среди которых преобладал *S. aureus*. У 44% детей выделены грамотрицательные палочки: *E. coli*, *Enterobacter* spp. и др.

Бактериологическое исследование смывов с внутренней поверхности стенок катетеров показало, что у 10 из 16 пациентов выделяли смешанные культуры микроорганизмов (грамположительные кокки: *S. aureus* — 70%, *Streptococcus* spp. — 30%; грамотрицательные палочки: *E. coli* — 50%, *Klebsiella oxytoca* — 20%; другие — 30%).

Все выделенные бактериальные культуры анализировали на чувствительность к антимикробным препаратам. Показано, что у 85% штаммов *S. aureus*, выделенных со стенок мочевых катетеров, выявлена полирезистентность к пяти антимикробным препаратам и более, в том числе устойчивость к метициллину.

Для оценки вирулентности выделенных культур *E. coli* применяли метод ПЦР. Обнаружено, что у 60% культур *E. coli*, выделенных со стенок мочевых катетеров, определены гены  $\alpha$ -гемолизина (*hly A, B, C*), способствующих формированию бактериальной биопленки.

Исследование поверхности мочевых катетеров, установленных у детей после проведения оперативного вмешательства, показало, что развитие бактериальных биопленок начинается на первые сутки использования катетеров. На пятые-седьмые сутки все исследуемые в работе катетеры становились в той или иной степени обсемененными бактериальными клетками. Сформировавшиеся биопленки представляли собой монокультуры, состоящие из морфологически однородных клеток (рис. 1), или поликомпонентные системы из двух и более морфологических форм бактерий. Во всех случаях наблюдали корреляцию между данными электронной микроскопии и результатами бактериологических исследований.

Особое внимание обращали на себя два образца мочевых катетеров с необычными морфологическими формами микроорганизмов, которые не были выявлены при проведении первичного бактериологического исследования.

*Образец катетера № 1. Пациент В. 1 год 6 мес. Диагноз: врожденный порок сердца. Дефекты межжелудочковой перегородки: перимембранозный и мышечные. Умеренный*

стенот митрального клапана. Незакрытое овальное окно. Состояние после суживания легочной артерии и перевязки ОАП. Операция Мюллера (сужение легочной артерии). Перенесенные заболевания: внутриутробная инфекция, двусторонняя пневмония. Анализ крови: СОЭ 29 мм/ч. Анализ мочи: единичные лейкоциты и эритроциты. Бактериологический посев мочи: нет роста микроорганизмов. Посев испражнений: первичный посев  $>10^3$  КОЕ/мл. Микроскопия испражнений: грамположительные кокки — стафилококки, в реакции латексагглютинации — *S. aureus*. Результаты первичного бактериологического посева смыва с поверхности катетера — роста микроорганизмов не обнаружено. При электронно-микроскопическом исследовании стенок мочевого катетера пациента В (рис. 2) обнаружены нитевидные клетки бактерий, по морфологии напоминающие нити актиномицетов.

Образец № 2. Пациент К. 6 мес. Диагноз: врожденные anomalies (пороки развития) сердечной перегородки: дефект межжелудочковой перегородки мышечный, открытое овальное окно. Открытый артериальный проток. Преддуктальная коарктация аорты. Гипоплазия дистальной дуги аорты. Операция: резекция суженного участка аорты; лигирование и пересечение открытого артериального протока; суживание легочной артерии. Перенесенные заболевания: инфекция мочевыводящих путей, двусторонняя пневмония, конъюнктивит, дакриоцистит, перинатальное повреждение ЦНС. Анализ крови: гранулоциты 78,4%; СОЭ 25 мм/ч; С-реактивный белок 29,37 мг/л. Анализ мочи: белок, единичные лейкоциты. Бактериологический посев мочи: нет роста микроорганизмов. Посев испражнений: первичный посев  $>10^3$  КОЕ/мл, 2 типа колоний: 1. грамположительные стафилококки, РЛА — отрицательная. 2. грамотрицательные палочки — *E. coli*. Микроскопия испражнений: *S. aureus*, *E. coli*. Результаты первичного бактериологического посева смыва с поверхности катетера: первичный посев

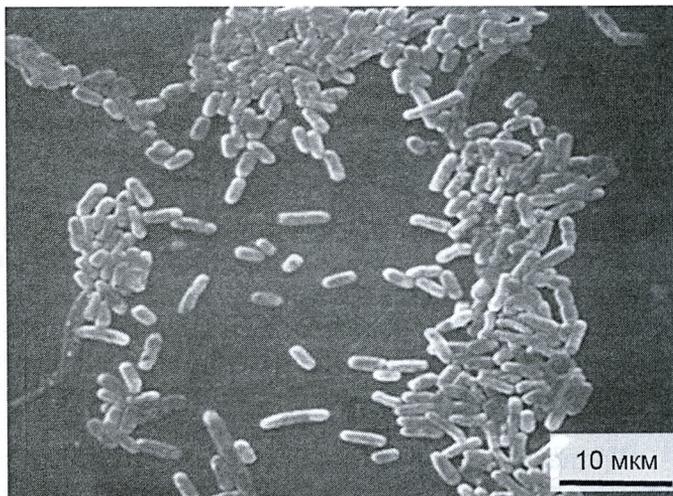


Рис. 1. СЭМ. Микроколонии бактерий палочковидной формы на поверхности мочевого катетера через двое суток после установки.

Ув.  $\times 2800$ .

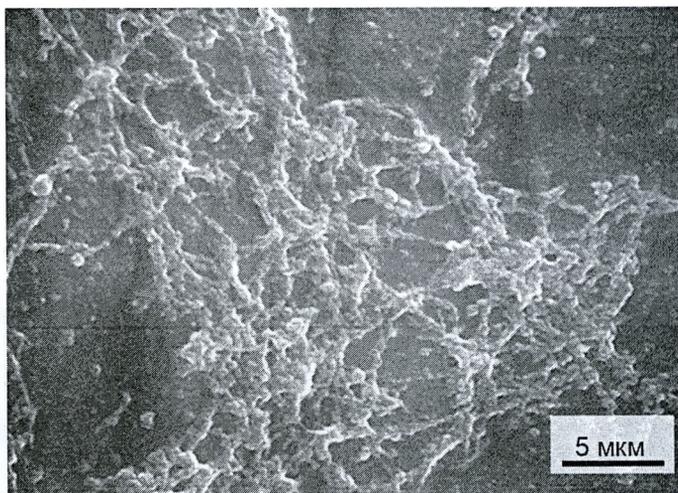


Рис. 2. СЭМ. Внутренняя поверхность стенки мочевого катетера пациента В.

На поверхности различимы нитевидные формы актиномицетоподобных клеток, единичные бактерии — форма кокков и палочек.

8 КОЕ/мл. Микроскопия: грамположительные стафилококки, РЛА — отрицательная. При электронно-микроскопическом исследовании стенок мочевого катетера пациента К. (рис. 3) обнаружены нитевидные клетки бактерий, по морфологии напоминающие нити актиномицетов, а также кокковидные клетки.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что катетеризация мочевых путей пациентов в постоперационный период может стать причиной развития инфекционного процесса. Первичным этиологическим агентом инфекции мочевых путей являются *E. coli* (80%), затем *S. aureus*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. и другие грамотрицательные бактерии. Степень и глубина развития инфекционного процесса зависит от вирулентности и чувствительности к антимикробным препаратам указанных бактерий.

Уропатогенные клетки *E. coli* (UPEC) имеют целый набор факторов вирулентности, позволяющий колонизировать поверхность слизистых оболочек организма-хозяина, повреждать и вторгаться в его ткани, преодолевая защитные механизмы. Изоляты *E. coli* из мочевых путей часто обладают специфическим набором факторов вирулентности, нераспространенным среди изолятов нормальной микрофлоры ЖКТ. Факторы вирулентности *E. coli*, вызывающие инфекцию мочевых путей, включают адгезины,  $\alpha$ -гемолизин (*hly*), цитотоксический некротический фактор, фимбрии, капсульный полисахарид K1, они обладают повышенной склонностью к образованию биопленок [10]. Способность бактерий присоединяться к уроэпителиальным клеткам, благодаря специфическим фимбриям, имеет решающее значение для иницирования инфекционного процесса.

Отличительной чертой кишечных палочек UPEC является образование биопленок, что способствует сохранению патогенных бактерий в мочевых путях и препятствует бактериальной эрадикации. Микробные биопленки

труднее уничтожить с помощью противомикробной терапии, а тесты на восприимчивость *in vitro* показывают повышенную резистентность клеток в составе биопленок [6]. Формирование биопленок *E. coli* требует набора генов, облегчающих иницирование ее образования, прикрепления и последующего созревания. Основные три детерминанты вирулентности изолятов UPEC, участвующие в формиро-

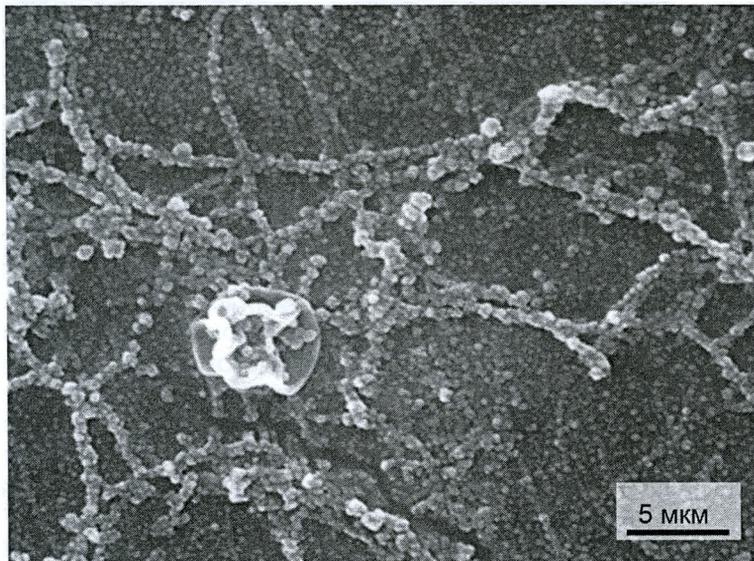


Рис. 3. СЭМ. Внутренняя поверхность стенок мочевого катетера пациента К.

На поверхности различимы длинные нитевидные формы актиномицеподобных клеток и единичные кокковидные бактерии.

вании биопленок, это фимбрии типа 1 (fim), кодируемые кластером fim гена, Р-фимбрии (pap), кодируемые геном pap, и  $\alpha$ -гемолизин (hly), член семейства токсинов RTX, наличие которых было исследовано в настоящей работе [10].

Особое внимание привлекли данные, полученные в результате электронно-микроскопического исследования стенок катетеров. В большинстве случаев данные бактериологических посевов совпадали с данными сканирующей микроскопии. Однако в двух образцах (у пациентов В. и К.) были выявлены нитевидные формы микроорганизмов. Особенности морфологии этих микроорганизмов имели сходство с морфологией клеток представителей семейства Actinomycetaceae (р. Arcanobacterium, р. Trueperella и р. Actinobaculum).

Род Actinobaculum впервые был описан как причина инфекции у человека в 1997 году [12]. Предполагалось, что представители рода, как и другие представители семейства Actinomycetaceae, являются частью комменсальной микрофлоры урогенитального тракта человека, особенно пожилых людей. В последнее время изучению представителей этого семейства уделяют много внимания ученые всего мира. Подтверждением этого служит недавние изменения в классификации, датируемые 2015 годом, которые привели к тому, что род Actinobaculum переименовали в род Actinotignum и теперь он состоит из трех видов: *A. schaalii*, *A. sanguinis* и *A. urinale* [18].

Интерес к представителям рода Actinotignum вызван тем, что его представители, являясь, очевидно, представителями нормальной микрофлоры, вызывают различные заболевания у человека. В статье R. Lotte et al. сообщают о 172 случаях инфекции, инициированных *A. schaalii*, причем 121 пациент (70%) имел инфекцию мочевого тракта (цистит, пиелонефрит, уросепсис) [13]. И хотя *A. schaalii* ассоциируются с инфекциями мочевого тракта, но также могут вызывать инвазивные инфекции, такие как гангрена Фурнье, некроз мочевого пузыря, бактериемия [14], эндокардит [9], мастит.

В 2003 году Rajkrt D. et al. сообщили о 5-летнем мальчике с пиелонефритом, вызванным *A. schaalii* [15]. В 2011 году приводится описание двух детей с ночным энурезом и хронической инфекцией мочевых путей, инфицированных *A. schaalii* [4]. Zimmermann P. et al. [19] представили собственный случай выделения *A. schaalii* у 8-месячного ребенка с люмбо-сакральным миеломенингецеле, нейрогенным мочевым пузырем и инфекцией мочевых путей. Авторы анализируют 6 педиатрических случаев с *A. schaalii* с инфекцией мочевых путей (цистит, пиелонефрит), причем только у 2 пациентов при бактериологическом посеве мочи выделены бактерии (*Klebsiella pneumoniae* и негемолитические стрептококки).

Род Actinobaculum включает факультативные анаэробные бактерии, по Граму окрашивающиеся положительно. Они растут медленно, предпочтительно в анаэробных условиях или в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Среды для культивирования должны быть обогащены кровью. Кроме того, есть мнение, что представители р. Actinotignum быстро вытесняются другими представителями нормальной микрофлоры. Крайне редкое выделение изолятов представителей р. Actinotignum связано еще и с тем, что культивирование посевов в большинстве клинических микробиологических лабораторий обычно проходит только в аэробных условиях. В настоящее время предпочтительным методом для выявления представителей р. Actinotignum считают масс-спектрометрические методы (MALDI-TOF MS) и газофазную жидкостную хроматографию [17].

До сих пор не опубликованы рекомендации по лечению инфекций, причиной которых являются *A. schaalii*. Приводится информация об эффектив-

ности лечения инфекции, связанной с *A. schaalii*, в том числе мочевых путей,  $\beta$ -лактамами препаратами и об отсутствии эффекта и нецелесообразности применения фторхинолонов и котримоксазола [11]. Продолжительность антибактериальной терапии в публикациях представлена различными сроками — от 2 недель до 45 дней.

В отечественной литературе обнаружить упоминания о выделении представителей р. Actinotignum в качестве возбудителей заболеваний человека не удалось. Обнаружение актиномицеподобных форм, предположительно представителей р. Actinotignum, свидетельствует о возможности развития инфекционного процесса, диагностика и лечение которого значительно осложнена в связи с описанными выше причинами.

Со стенок мочевых катетеров у 63% пациентов с ВПС на фоне антибиотикотерапии выделены клетки *S. aureus* и *E. coli*. О высоком патогенном потенциале бактерий свидетельствуют обнаруженные методом ПЦР *hly A*, *B*, *C*-гены, кодирующие  $\alpha$ -гемолизин *E. coli*, которые способствуют усиленному биопленкообразованию, а также устойчивость 85% изолятов *S. aureus* к метициллину.

Электронно-микроскопическое исследование внутренней поверхности мочевых катетеров у всех исследованных пациентов выявило наличие бактериальных клеток, микроколоний и сформировавшихся биопленок.

У двух из 16 пациентов на поверхности мочевых катетеров обнаружены не только микробные биопленки наиболее часто высеваемых *S. aureus* и *E. coli*, но и нитевидные формы актиномицеподобных клеток. Таким образом, электронно-микроскопическое исследование позволило получить новую информацию об активном процессе биопленкообразования на внутренних стенках катетеров не только наиболее часто выделяемых условно патогенных бактерий, но и актиномицеподобных бактериальных клеток. Ранняя диагностика катетер-ассоциированных инфекций у детей с ВПС требует разработки комплексного подхода, включающего наряду с классическим микробиологическим анализом обязательное использование других современных методов диагностики.

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Демикова Н.С., Лапина А.С. Врожденные пороки развития в регионах Российской Федерации (итоги мониторинга за 2000–2010 г.г.). Рос. вестн. перинатол. педиатр. 2012, 2: 91–98.
2. Смертность населения Российской Федерации. 2012 г. (Статистические материалы Минздрава России). М., 2014.
3. Эрман М.В., Балацкий С.Ю. Врожденные аномалии развития почек у детей. В кн.: Знание пропедевтики — основа клинического мышления педиатра. Под ред. В.В.Юрьева, В.П.Новиковой, А.С.Симаходского. СПб, ИнформМед, 2015, с. 148–164.
4. Andersen L.B., Bank S., Hertz B. et al. Actinobaculum schaalii, a cause of urinary tract infections in children? Acta Paediatr. 2012, 101 (5): e232–234.
5. Cocchi G., Magnani C., Morini M.S. et al. Urinary tract abnormalities (UTA) and associated malformations: data of the Emilia-Romagna Registry. IMER Group. Emilia-Romagna Registry on Congenital Malformations. Eur. J. Epidemiol. 1996, 12 (5): 493–497.
6. Costerton J.W. Introduction to biofilm. Int. J. Antimicrob. Agents. 1999, 11 (3–4): 217–221. doi: 10.1016/S0924-8579(99)00018-7.
7. Dolk H., Loane M., Garne E. The prevalence of congenital anomalies in Europe. Adv. Experim. Med. Biol. 2010, 686: 349–364.

8. Greenwood R.D., Rosenthal A., Nadas A.S. Cardiovascular malformations associated with congenital anomalies of the urinary tract system. Observations in a series of 453 infants and children with urinary system malformations. *Clin. Pediat.* 1976, 15: 1101-1104.
9. Hoenigl M., Leitner E., Valentin T. et al. Endocarditis caused by *Actinobaculum schaalii*. *Emerg. Infect. Dis.* 2010, 16: 1171-1173.
10. Kot B., Wicha J., Gruzewska A. et al. Virulence factors, biofilm-forming ability, and antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* strains isolated from hospitalized patients. *Turk. J. Med. Sci.* 2016, 46 (6): 1908-1914. doi: 10.3906/sag-1508-105.
11. Lotte L., Lotte R., Durand M. et al. Infections related to *Actinotignum schaalii* (formerly *Actinobaculum schaalii*): a 3-year prospective observational study on 50 cases. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015 Nov 6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.030>. pii: S1198-743X(15)00955-6.
12. Lawson P.A., Falsen E., Akervall E. et al. Characterization of some Actinomycetes-like isolates from human clinical specimens: reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Spratling) as *Actinobaculum suis* comb. nov. And description of *Actinobaculum schaalii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997, 47: 899-903.
13. Lotte R., Lotte L., Ruimy R. *Actinotignum schaalii* (formerly *Actinobaculum schaalii*): a newly recognized pathogen — review of the literature. *Clin. Microbiol. Infect.* 2016, 22: 28-36.
14. Pedersen H., Senneby E., Rasmussen M. Clinical and microbiological features of *Actinotignum bacteremia*: a retrospective observational study of 57 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2017, 36: 791-796. doi: 10.1007/s10096-016-2862-y.
15. Pajlt D., Simoons-Smit A.M., Savelkoul P.H.M. et al. Pyelonephritis caused by *Actinobaculum schaalii* in a child with pyeloureteral junction obstruction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003, 22: 438-440.
16. Rosner M.H., Portilla D., Okusa M. Cardiac surgery as a cause of acute kidney injury: pathogenesis and potential therapies. *J. Intens. Care Med.* 2008, 23: 3-18.
17. Tuuminen T., Suomala P., Harju I. *Actinobaculum schaalii*: identification with MALDI-TOF. *New Microbes New Infect.* 2014, 2: 38-41.
18. Yassin A. F., Sproer C., Pukall R. et al. Dissection of the genus *Actinobaculum*: Reclassification of *Actinobaculum schaalii* Lawson et al. 1997 and *Actinobaculum urinale* Hall et al. 2003 as *Actinotignum schaalii* gen. nov., comb. nov. and *Actinotignum urinale* comb. nov., description of *Actinotignum sanguinis* sp. nov. and emended descriptions of the genus *Actinobaculum* and *Actinobaculum suis*; and re-examination of the culture deposited as *Actinobaculum massiliense* CCUG 47753T (SDSM 19118T), revealing that it does not represent a strain of this species. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.* 2015, 65: 615-624 doi: 10.1099/ijse.0.069294-0.
19. Zimmermann P., Berlinger L., Liniger B. et al. *Actinobaculum schaalii* an emerging pediatric pathogen? *BMC Infect. Dis.* 2012, 12: 201.

Поступила 30.08.17

Контактная информация: Орлова Ольга Геннадьевна, к.б.н.,  
199106, Санкт-Петербург, ВО, 21 линия, 8а

---

С.В.Святченко<sup>1</sup>, А.Г.Дурьманов<sup>1</sup>, И.М.Суслопаров<sup>1</sup>, Н.П.Колосова<sup>1</sup>,  
Н.И.Гончарова<sup>1</sup>, О.В.Петрова<sup>1</sup>, А.В.Епанчинцева<sup>1</sup>, А.В.Максютова<sup>1</sup>, К.С.Кондик<sup>1</sup>,  
О.К.Слабода<sup>1</sup>, Е.В.Иванова<sup>2</sup>, В.Н.Михеев<sup>1</sup>, А.Б.Рыжиков<sup>1</sup>, Т.Н.Ильичева<sup>1</sup>

## ТЯЖЕЛЫЕ СЛУЧАИ ЗАБОЛЕВАНИЯ ГРИППОМ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ТЕЧЕНИЕ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ СЕЗОНОВ 2015 — 2016 и 2016 — 2017

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область; <sup>2</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области, Новосибирск

*Цель.* Сравнение популяционного иммунитета населения РФ к вирусам гриппа накануне эпидемических сезонов 2015 — 2016 и 2016 — 2017 и исследование образцов от пациентов с тяжелым течением заболевания. *Материалы и методы.* Тестирование сывороток в реакции торможения гемагглютинации с референс-антигенами. Выделение изолятов из клинического и аутопсийного материала и их характеристика. *Результаты.* По сравнению с 2015 г. к осени 2016 г. уровень популяционного иммунитета к вирусам гриппа А(Н1N1pdm09) и А(Н3N2) возрос. Эпидемический сезон 2015 — 2016, преобладающими в котором были вирусы А(Н1N1)pdm09, относившиеся по гемагглютинину к новой генетической группе 6В.1, характеризовался повышенным количеством случаев тяжелого течения, летальных исходов. Один процент исследованных изолятов имел в нейраминидазе аминокислотную замену Н275Y и был резистентен к осельтамивиру. В сезоне 2016 — 2017 случаев тяжелого течения было меньше, преобладали вирусы А(Н3N2) и В/Victoria. По гемагглютинину изоляты А(Н3N2) входили в кладу 3С.2а, а штаммы В/Victoria — в группу 1А. Все тестированные изоляты были чувствительны к антинейраминидазным препаратам. *Заключение.* Рассмотренные сезоны отличались по интенсивности эпидемического процесса, доминирующему подтипу вируса гриппа А. Иммунизация вакциной с обновленным Н1N1pdm09-компонентом необходима для формирования популяционного иммунитета к новым штаммам данного подтипа группы 6В.1. Антинейраминидазные препараты рекомендуются в терапии гриппа.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 32—39

Ключевые слова: популяционный иммунитет, сезонные вирусы гриппа, антигенная и генетическая характеристика, чувствительность к ингибиторам нейраминидазы

S.V.Svyatchenko<sup>1</sup>, A.G.Durymanov<sup>1</sup>, I.M.Susloparov<sup>1</sup>, N.P.Kolosova<sup>1</sup>,  
N.I.Goncharova<sup>1</sup>, O.V.Petrova<sup>1</sup>, A.V.Epanchintseva<sup>1</sup>, A.V.Maksyutova<sup>1</sup>, K.S.Kondik<sup>1</sup>,  
O.K.Slaboda<sup>1</sup>, E.V.Ivanova<sup>2</sup>, V.N.Mikheev<sup>1</sup>, A.B.Ryzhikov<sup>1</sup>, T.N.Ilicheva<sup>1</sup>

## SEVERE CASES OF SEASONAL INFLUENZA IN RUSSIA IN 2015 — 2016 AND 2016 — 2017

<sup>1</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region;  
<sup>2</sup>Centre of Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Region, Novosibirsk, Russia

*Aim.* Evaluation of seroprevalence of antibodies to influenza A and B viruses and analysis of specimens from severe or fatal influenza cases in Russia in 2015 — 2016 and 2016 — 2017 flu seasons. *Materials and methods.* Determination of antibody titer in human serum samples in hemagglutination inhibition assay with reference antigens. Isolation of influenza viruses from nasopharyngeal swabs and autopsy material in cell culture. Characterization of isolated strains. *Results.* In 2016, compared to 2015, the proportion of serum samples, containing antibodies to influenza viruses А(Н1N1pdm09) and А(Н3N2), increased. During the 2015 — 2016 season, elevated number of severe and fatal cases of influenza were registered. The majority of circulated strains belonged to the new clade 6В.1 of А(Н1N1)pdm09 viruses. 1% of analyzed isolates carried Н275Y amino

acid substitution in neuraminidase and were resistant to oseltamivir. In the 2016 — 2017 season, there were less severe cases of influenza. The most prevalent were influenza viruses A(H3N2) and B/Victoria. Isolated H3N2 viruses belonged to the 3C.2a subclade and B/Victoria isolates were from the 1A genetic group. All tested strains were susceptible to neuraminidase inhibitors. *Conclusions.* Flu seasons 2015 — 2016 and 2016 — 2017 differed in intensity of influenza activity and in the dominant influenza A virus subtype. Immunization with vaccine, comprising new H1N1pdm09-component, is crucial for prophylaxis of influenza infection with viruses from 6B.1 subclade in the next season. Neuraminidase inhibitors are recommended for influenza treatment.

Zh.Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 32—39

Key words: herd immunity, seasonal influenza viruses, antigenic and genetic characteristics, neuraminidase inhibitors susceptibility

## ВВЕДЕНИЕ

Эпидемический сезон по гриппу в Северном полушарии в 2015 — 2016 гг. имел существенные отличия в разных регионах. В странах Западной Европы и Юго-Восточной Азии подъем заболеваемости начался на 50 — 52 неделях 2015 г. и характеризовался плавным увеличением количества заболевших до 9 — 11 недель 2016 г., а затем снижением до фоновых значений к 15 — 16 неделям. В странах Восточной Европы и Ближнего Востока, наоборот, наблюдалось резкое повышение заболеваемости с 50 — 51 недель 2015 г., начало сезона характеризовалось высокой долей случаев тяжелого течения заболевания, в том числе завершившихся летальным исходом. Среди циркулировавших вирусов сезонного гриппа преобладал субтип А (H1N1)pdm09 во всех странах Северного полушария, за исключением Китая, где совместно циркулировали вирусы гриппа А (H1N1)pdm09, А (H3N2) и вирус гриппа В. В России резкий подъем заболеваемости начался на второй неделе 2016 г. К 12 неделе эпидемический сезон по гриппу завершился. В течение этого периода существенно преобладал субтип вируса гриппа А (H1N1)pdm09 [1].

В 2016 — 2017 гг. эпидемический сезон по гриппу начался раньше обычного: подъем заболеваемости в России был зарегистрирован на 48 — 49 неделях 2016 г. Широкое географическое распространение эпидемия получила на 2 неделе 2017 г., когда число субъектов РФ с превышением пороговых уровней заболеваемости достигло 52. Активность гриппа оставалась высокой вплоть до 10 недели 2017 г., когда эпидемия пошла на спад. На 15 неделе 2017 г. не было зарегистрировано превышения эпидемических порогов по совокупному населению ни в одном из регионов РФ, в связи с чем было объявлено о завершении эпидемического сезона. В течение сезона произошла смена доминирующего возбудителя гриппа: до 7 недели 2017 г. в циркуляции преобладал вирус гриппа А (H3N2), а начиная с 8 недели — вирус гриппа В. В целом, сезон 2016 — 2017 характеризовался более ранним, чем обычно, и более длительным, чем в прошлом сезоне, подъемом заболеваемости, меньшей интенсивностью эпидемического процесса и низкой летальностью. Осенью 2016 г. были вакцинированы около 56 млн человек, что, несомненно, повысило популяционный иммунитет к гриппу населения РФ [2].

По приказу Роспотребнадзора от 24.07.2015 № 627 в ГНЦ ВБ «Вектор» из региональных Центров гигиены и эпидемиологии (ГиЭ) поступают положительные на наличие РНК вирусов гриппа аутопсийные и клинические образцы от пациентов с тяжелым течением заболевания, в том числе завершившим-

ся летальным исходом, а также положительные клинические образцы от пациентов, вакцинированных перед эпидемией.

В целях оценки популяционного иммунитета населения РФ в ГНЦ ВБ «Вектор» проводится анализ сывороток крови здоровых доноров на наличие антител к различным субтипам вирусов гриппа А и В.

В связи с этим, целью настоящей работы явился сравнительный анализ эпидемических сезонов 2015 — 2016 гг. и 2016 — 2017 гг. по результатам тестирования популяционного иммунитета населения РФ накануне эпидемических сезонов и исследования образцов от пациентов с тяжелым течением гриппа и летальных случаев заболевания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ популяционного иммунитета к гриппу проводили с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием сывороток крови здоровых доноров, собранных в 42 регионах РФ. В РТГА использовали антигены вакцинных штаммов вирусов гриппа А — А/California/7/09 (H1N1pdm09); А/Switzerland/9715293/13 и А/Hong Kong/4801/14 (H3N2) и В — В/Brisbane/60/08 (линия Виктория), а также антигены высокопатогенных штаммов вируса гриппа А — А/rook/Chanu/32/15 (H5N1), А/Anhui/01/13 (H7N9) [5].

Сбор и ОТ-ПЦР анализ первичного материала от пациентов с гриппоподобными симптомами осуществлялся сотрудниками региональных Центров ГиЭ. Клинический материал (мазки из носа и зева), полученный от пациентов с тяжелым течением заболевания или лиц, вакцинированных от гриппа накануне эпидемии, а также аутопсийный материал (фрагменты бронхов, трахеи, легких), в котором было подтверждено наличие РНК вирусов гриппа А и В, направлялся в ГНЦ ВБ «Вектор», где из него проводилось выделение изолятов в культуре клеток МДСК линии Лондон [9].

Типирование выделенных изолятов вирусов гриппа А и В и изучение их антигенных свойств проводили в РТГА [9], используя постинфекционные хорьковые референс-сыворотки, предоставленные Сотрудничающим Центром ВОЗ по гриппу (Атланта, США). Результаты типирования в РТГА подтверждали методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, используя набор реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А и В «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» и набор для субтипирования вирусов гриппа А «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL» производства ЦНИИЭ (Москва).

В 2016 г. определение нуклеотидных последовательностей генов HA, NA и NS вирусов гриппа А и В проводили по методу Сэнгера. В 2017 г. полногеномное секвенирование осуществлялось на платформе NGS MiSeq (Illumina, США).

Фенотипическое тестирование чувствительности изолятов к осельтамивиру и занамивиру проводили флуоресцентным методом по методическим указаниям ВОЗ [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

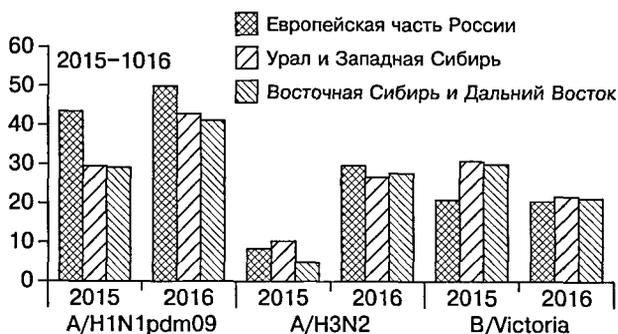
Для исследования популяционного иммунитета было протестировано 4548 образцов сыворотки крови здоровых доноров, собранных осенью 2015 года, и 4979 образцов, собранных осенью 2016 г. Результаты, полученные в РТГА с вакцинными штаммами вируса гриппа А подтипов H1N1pdm09 и H3N2 и вируса гриппа В (линия Виктория), представлены на рис.

По сравнению с осенью 2015 г. к осени 2016 г. во всех регионах выросла доля положительных сывороток к вирусам гриппа А (H1N1pdm09) и А (H3N2). Прирост доли положительных сывороток к вирусу А (H1N1pdm09) можно объяснить как вакцинацией, так и перенесенным заболеванием во время эпидемии 2015 — 2016 гг., поскольку тогда в циркуляции преобладали штаммы именно данного подтипа. Прирост доли положительных сывороток к вирусу гриппа А (H3N2), имевшему крайне ограниченное распространение на территории РФ в эпидемическом сезоне 2015 — 2016 гг., является следствием массовой вакцинации населения в сентябре—октябре 2016 года. Анализ сывороток в РТГА с высокопатогенными вирусами гриппа А H5N1 и H7N9 не выявил наличия антител к ним ни в одном образце, что свидетельствует об отсутствии в России циркуляции данных штаммов среди людей.

С декабря 2015 г. по апрель 2016 г. в ГНЦ ВБ «Вектор» поступил клинический и аутопсийный материал из ЦГиЭ шестидесяти пяти субъектов РФ. Всего было получено 1799 первичных образцов, в том числе 501 от людей, умерших предположительно от гриппа (табл.). Наиболее пострадал от эпидемии Северо-Западный регион России: из г. Санкт-Петербург были получены образцы от 112 фатальных случаев заболевания гриппом. Из поступивших образцов нами было выделено 354 штамма вируса гриппа А, из них 109 от летальных случаев; 348 изолятов принадлежали к подтипу А (H1N1pdm09), 6 изолятов относились к А (H3N2) подтипу. Все штаммы вируса гриппа А (H1N1pdm09) были охарактеризованы в РТГА с хорьковой референс-сывороткой как А/California/7/09-подобные. Для 22 штаммов А (H1N1pdm09) были определены нуклеотидные последовательности генов HA, NA и NS. По результатам филогенетического анализа гена гемагглютинина они были отнесены к двум новым субкладам,

Данные о пациентах, от которых были получены образцы

Группа	Летальные случаи		Тяжелые случаи с благоприятным исходом	
	2015—2016	2016—2017	2015—2016	2016—2017
Пол				
М	260	25	451	141
Ж	233	20	728	297
Пол не известен	8	4	119	19
Возрастная группа				
0—18 лет	20	12	436	192
19—59 лет	306	14	678	210
60 лет и старше	173	20	133	34
Возраст не известен	2	3	51	21
Беременные женщины	5	0	153	166
Вакцинированные против гриппа	8	0	48	119
Всего	501	49	1298	457



Доля сывороток, положительных на наличие антител к вакцинным штаммам вируса гриппа А подтипов H1N1pdm09 и H3N2 и вируса гриппа В.

выделенным в 2016 г. в группе 6В [3]; 19 изолятов вошли в подгруппу 6В.1, а оставшиеся 3 в 6В.2. Среди летальных случаев отмечено увеличение доли штаммов с аминокислотной заменой D222G в рецептор-связывающем сайте гемагглютинаина. Большинство проанализированных штаммов подтипа А (H1N1pdm09) были чувствительны к ингибирующему действию осельтамивира и занамивира. Два штамма, характеризовавшиеся резистентностью к осельтамивиру, имели аминокислотную замену N275Y в нейраминидазе.

В следующем эпидемическом сезоне с октября 2016 г. по апрель 2017 г. в ГНЦ ВБ «Вектор» из 29 региональных Центров ГиЭ поступил биологический материал от 506 лабораторно-подтвержденных случаев заболевания гриппом, 49 из которых были фатальными (табл.). Для подтверждения данных, полученных в Центрах ГиЭ, с помощью ОТ-ПЦР анализа было повторно проанализировано около 300 образцов клинического и 49 образцов аутопсийного материала. В ходе работы была замечена тенденция к снижению чувствительности ОТ-ПЦР тест-системы по детекции маркера Н3 в образцах с низкой концентрацией возбудителя. В результате около 10% клинических образцов, положительных на наличие гена М вируса гриппа А и типированных по нейраминидазе как N2, не определялись по субтипу гемагглютинаина, а из 42 образцов секционного материала, первоначально типированных Центрами ГиЭ в ОТ-ПЦР как А/Н3N2, лишь 28 оказались положительными при повторном анализе (что также может быть связано со снижением качества образцов в ходе транспортировки из одной лаборатории в другую).

В ходе пассирования клинического материала в культуре клеток MDCK нами было выделено 76 штаммов вируса гриппа А (H3N2), 14 штаммов вируса гриппа В/Victoria и 1 штамм вируса гриппа А (H1N1pdm09). Из 49 образцов секционного материала нами было выделено 2 изолята вируса гриппа В/Victoria и 1 изолят вируса гриппа А (H1N1pdm09). Из аутопсийного материала не удалось выделить ни одного изолята вируса гриппа А (H3N2). С помощью РТГА с использованием референс-сывороток было показано, что выделенные штаммы подтипа А (H1N1pdm09) антигенно сходны с вакцинным штаммом А/California/7/09, а все изоляты вируса гриппа В относятся к генетической линии Виктория. Проведение антигенной характеристики штаммов А (H3N2) с помощью РТГА было затруднительно, так как большинство изолятов на первом пассаже не агглютинировали эритроциты петуха, гуся и морской свинки. Агглютинация эритроцитов морской свинки появлялась после двух или более пассажей в культуре клеток MDCK. Большинство исследованных изолятов А (H3N2), культивированных подобным образом, не реагировали в РТГА с референсной сывороткой anti-A/Switzerland/9715293/13, однако взаимодействовали с хорьковой сывороткой, полученной против штамма, входящего в ту же генетическую подгруппу (3С.2а), что и вакцинный штамм А/Hong Kong/4801/14. Все штаммы, выделенные в сезоне 2016 — 2017 гг., были чувствительны к действию осельтамивира и занамивира. Для 21 штамма вируса гриппа А (H3N2), 2 штаммов А (H1N1pdm09) и 7 штаммов вируса гриппа В было проведено полногеномное секвенирование. Филогенетический анализ гена гемагглютинаина показал, что все исследованные штаммы подтипа H3N2 входят в состав подгруппы 3С.2а, к которой относится вакцинный штамм А/Hong Kong/4801/14. Анализ гена гемагглютинаина изолятов вируса гриппа А (H1N1pdm09) позволил отнести их к группе 6В.1, в которую входит штамм А/Michigan/45/15, заменивший штамм А/California/7/09 в составе вакцины, рекомендованной для использования накануне следующего эпидемического сезона. Все изоляты вируса гриппа В (Victoria), как и референс-штамм В/

Brisbane/60/08, по последовательности гена гемагглютинаина были отнесены к группе 1А.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Целью настоящего исследования явился сравнительный анализ двух последних эпидемических сезонов по гриппу. Сезоны отличались доминирующим субтипом вируса гриппа А, временем начала эпидемии, ее продолжительностью, количеством случаев тяжелого течения заболевания, а также смертностью от гриппа.

Эпидемия 2015 — 2016 гг. в России началась резким подъемом заболеваемости на второй неделе 2016 г. и продолжалась в течение 10 недель [1]. На протяжении всего сезона в циркуляции преобладал вирус гриппа А подтипа H1N1pdm09. Респираторная инфекция, вызванная данным вирусом, зачастую характеризовалась тяжелым течением, 501 смертельный исход был подтвержден лабораторными исследованиями.

Для эпидемического сезона 2016 — 2017 был характерен ранний подъем заболеваемости: в Европе он начался уже на 46, а в России на 48 неделе 2016 г. Штаммы А (H3N2) подтипа преобладали в этиологической структуре заболеваемости гриппом вплоть до 8 недели 2017 г., когда наибольшее распространение получил вирус гриппа В генетической линии Виктория. Эпидемический сезон 2016 — 2017 гг. был более длительным, чем предыдущий, однако подъем заболеваемости был менее резким, и было зарегистрировано значительно меньшее количество случаев смерти от гриппа.

Эпидемиологические данные о количестве иммунизированных среди тяжелых и фатальных случаев заболевания гриппом свидетельствуют о том, что вакцинация может оказывать протективный эффект, снижая тяжесть течения и вероятность развития осложнений, способных привести к летальному исходу. Так, в 2016 г. среди 501 человека, умершего от гриппа, только 2% составили привитые, а в 2017 г. среди 49 умерших не было ни одного человека, вакцинированного от гриппа накануне эпидемии. В связи с этим, особую актуальность имеет вакцинация людей, входящих в группы риска: детей младше 5 лет, лиц старше 65 лет, беременных, пациентов с хроническими заболеваниями, медицинских работников. Из 1298 человек, перенесших тяжелую форму гриппа в эпидемическом сезоне 2015 — 2016, в группы риска входили 60%, и подавляющее большинство этих людей не были вакцинированы. Среди них было 297 детей и подростков до 16 лет включительно, 153 беременные женщины.

В сезоне 2016 — 2017 из проанализированных нами данных 457 человек, переболевших гриппом, 119 были вакцинированы накануне эпидемии. Анализ противогриппозных вакцин в Канаде, США и Европе продемонстрировал их недостаточную протективную эффективность в отношении вируса гриппа А (H3N2) (42%, 43% и 38% соответственно) [4, 6]. Хотя имеющийся уровень эффективности является субоптимальным, до сегодняшнего дня не удалось добиться значительно лучших результатов: по данным, полученным в США и Европе, эффективность вакцины в отношении H3N2 вирусов в разные годы колебалась от 11% (ошибка в выборе вакцинного штамма, 2014 — 2015) до 42 — 43% (2011 — 2013). Большей эффективности удается достигать в отношении других подтипов вирусов гриппа. Известно, что скорость антигенного дрейфа вируса гриппа А(H3N2) превосходит скорость дрейфа других вирусов, вызывающих сезонный грипп, в связи с чем, именно данный компонент трехвалентной вакцины приходится менять чаще остальных. Тем не менее, несмотря

на субоптимальность вакцины, ее применение способствует формированию популяционного иммунитета и во многих случаях позволяет избежать заболевания или перенести его в легкой форме: в сезоне 2016 — 2017 гг. в России не было ни одного смертельного случая от гриппа среди лиц, вакцинированных осенью 2016 г. Большая часть циркулирующих штаммов H3N2 остаются антигенно-сходными с A/Hong Kong/4801/14, в связи с чем, ВОЗ вновь рекомендовала включить его в состав вакцины для следующего эпидемического сезона [8].

Несколько последних эпидемических сезонов характеризовались чередованием доминирующего в циркуляции подтипа вируса гриппа А. Так, в 2014 — 2015 гг. преобладал подтип H3N2, в 2015 — 2016 гг. — H1N1pdm09, в 2016 — 2017 гг. — вновь H3N2. В связи с этим, можно предположить, что в сезоне 2017 — 2018 гг. более широкое распространение могут получить штаммы вируса гриппа А (H1N1pdm09). Несмотря на то, что исследование циркулирующих в настоящее время штаммов H1N1pdm09 из генетической группы 6В в РТГА с хорьковыми референс-сыворотками не позволяет отличить их по антигенным свойствам от штамма A/California/7/09, осенью 2016 г. ВОЗ рекомендовала заменить его в составе вакцины на новый (A/Michigan/45/15) [8]. Необходимость замены обусловлена значимым снижением титров сывороток людей, вакцинированных старым штаммом, в РТГА с актуальными вирусами из группы 6В, по сравнению с титром при постановке РТГА с гомологичным вирусом. Вследствие этого имеющийся адаптивный иммунитет к гриппу А (H1N1pdm09), сформировавшийся в результате предыдущей вакцинации, может обладать недостаточной протективностью в отношении новых штаммов. Именно поэтому особое значение в профилактике заболеваемости гриппом в следующем эпидемическом сезоне придается иммунизации широких слоев населения вакциной обновленного состава.

Более 99% циркулирующих вирусов гриппа А и В остаются чувствительными к действию ингибиторов нейраминидазы, что позволяет рекомендовать их применение в качестве эффективного средства терапии на ранних стадиях развития гриппозной инфекции.

*Авторы выражают благодарность коллегам из Центров гигиены и эпидемиологии субъектов РФ за сбор, анализ и своевременную доставку в ГНЦ ВБ «Вектор» аутопсийных и клинических образцов и сывороток.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Роспотребнадзор. О завершении эпидемического сезона по гриппу и ОРВИ 2015-2016. URL: [http://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news\\_details.php?ELEMENT\\_ID=5995](http://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=5995).
2. Роспотребнадзор. О ситуации по заболеваемости гриппом и ОРВИ за 49 неделю (05.12.2016-11.12.2016) и ходом иммунизации населения. URL: [http://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news\\_details.php?ELEMENT\\_ID=7513](http://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=7513).
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza virus characterisation, summary Europe, March 2016. Stockholm: ECDC, 2016.
4. Flannery B., Chung J.R., Thaker S.N. et al. Interim estimates of 2016-17 seasonal influenza vaccine effectiveness, United States, February 2017. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2017, 66 (6): 167-171.
5. Katz J., Hancock K., Végouilla V. et al. Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2009, 58 (19): 521-524.
6. Kissling E., Rondy M., I-MOVE/I-MOVE+ study team. Early 2016/17 vaccine effectiveness estimates against influenza A(H3N2): I-MOVE multicentre case control studies at primary care and hospital levels in Europe. Euro Surveill. 2017, 22 (7): 30464.

7. Standard operating procedure WHO-025. Fluorometric neuraminidase inhibition assay. URL: [http://www.nisn.org/documents/A.Hurt\\_Protocol\\_for\\_NA\\_fluorescence.pdf](http://www.nisn.org/documents/A.Hurt_Protocol_for_NA_fluorescence.pdf).
8. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017–2018 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2017, 92 (11): 117–128.
9. World Health Organization surveillance network: Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: WHO Press, 2011.

Поступила 17.07.17

Контактная информация: Святченко Светлана Викторовна,  
630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, р.т.(383)363-47-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*О.Е.Гусева<sup>1</sup>, О.А.Лебедько<sup>1</sup>, Е.Б.Наговицына<sup>1</sup>, М.Н.Лазуткин<sup>2</sup>,  
Е.А.Савицкая<sup>1</sup>, С.В.Клюева<sup>3</sup>, О.В.Путилина<sup>3</sup>*

## **ОСОБЕННОСТИ ВСПЫШКИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ, ВЫЗВАННОЙ MYCOPLASMA PNEUMONIAE, У ДЕТЕЙ В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ**

<sup>1</sup>НИИ охраны материнства и детства — филиал Дальневосточного НЦ физиологии и патологии дыхания, <sup>2</sup>Дальневосточная дирекция здравоохранения — Структурное подразделение центральной дирекции здравоохранения — Филиал ОАО «РЖД», <sup>3</sup>Детская городская клиническая больница № 9, Хабаровск

*Цель.* Изучение особенностей вспышки внебольничной пневмонии, обусловленной *M. pneumoniae*, у детей в Хабаровском крае в осенне-зимний период 2016 — 2017 гг. *Материалы и методы.* Проведено исследование 30 клинических образцов — мазков с задней стенки глотки и образцов мокроты, полученных у пациентов с внебольничной пневмонией, обусловленной *M. pneumoniae*. Образцы были исследованы на наличие мутаций в гене 23S рРНК *M. pneumoniae*. *Результаты.* Возраст пациентов составил от 2 до 16 лет. В двух случаях имели место семейные очаги заболеваемости внебольничной пневмонией. В 19 образцах была выявлена мутация в 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae*. *Заключение.* Полученные данные свидетельствуют о том, что в развитии вспышки внебольничной пневмонии, обусловленной *M. pneumoniae*, у детей в Хабаровском крае в осенне-зимний период 2016 — 2017 гг. участвовали макролидрезистентные штаммы возбудителя.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 39—45

Ключевые слова: дети, *Mycoplasma pneumoniae*, вспышка, респираторная система, мутация, устойчивость к макролидам

*О.Е.Гусева<sup>1</sup>, О.А.Лебедко<sup>1</sup>, Е.Б.Наговицына<sup>1</sup>, М.Н.Лазуткин<sup>2</sup>,  
Е.А.Савицкая<sup>1</sup>, С.В.Клюева<sup>3</sup>, О.В.Путилина<sup>3</sup>*

## **FEATURES OF THE OUTBREAK OF THE COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA CAUSED BY MYCOPLASMA PNEUMONIAE AT CHILDREN IN KHABAROVSK REGION**

<sup>1</sup>Research Institute of Mother and Child Health Care — Branch of Far-Eastern Research Center of Respiratory Physiology and Pathology, <sup>2</sup>Far Eastern Directorate of Health — Structural Subdivision of Central Directorate of Health — JSC «Russian Railways», <sup>3</sup>Children's City Clinical Hospital No. 9, Khabarovsk, Russia

*Aim.* To study the features of outbreak of community-acquired pneumonia caused by *M. pneumoniae* in children in the Khabarovsk region during the autumn-winter period 2016 — 2017. *Materials and methods.* A study was conducted of 30 clinical samples — smears from the posterior pharyngeal wall and sputum samples obtained from patients with community-acquired pneumonia due to *M. pneumoniae*. Samples were examined for the presence of mutations in the 23S rRNA

gene of *M. pneumoniae*. *Results*. The age of the patients was from 2 to 16 years. In two cases, family foci of the incidence of community-acquired pneumonia occurred. In 19 samples, a mutation was detected in 23S rRNA of *M. pneumoniae*. *Conclusion*. The data obtained indicate that in the development of the outbreak of community-acquired pneumonia caused by *M. pneumoniae* in children in the Khabarovsk region in the autumn-winter period 2016 — 2017, macrolide-resistant strains of the pathogen were involved.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 39—45

Key words: children, *Mycoplasma pneumoniae*, outbreak, respiratory system, mutation, macrolide resistance

## ВВЕДЕНИЕ

*Mycoplasma pneumoniae* является этиологическим агентом целого ряда заболеваний респираторного тракта [10, 13], в структуре острых инфекций органов дыхания в период эпидемических вспышек доля *M. pneumoniae* может достигать 30 — 40% [9]. Вспышки инфекции, вызванной *M. pneumoniae*, регистрируются в разных странах с интервалами 3 — 7 лет с максимальным подъемом заболеваемости в осенне-зимний период [1, 4, 13].

На территории Российской Федерации вспышки респираторного микоплазмоза были описаны в Хабаровском крае (Хабаровск, п. Ванино) в августе 2004 г. — феврале 2005 г. [4], в Москве — в сентябре—октябре 2012 г. [2], в Смоленском регионе (п. Озерный) в феврале—марте 2013 г. [1], в Воронежской области (г. Россошь, г. Нововоронеж) в октябре—ноябре 2013 г. [6]. В 2016 г. в Хабаровском крае зарегистрировано 5 вспышек внебольничных пневмоний, в Хабаровске заболеваемость внебольничной пневмонией составила 3072 случая, превысив при этом в 1,76 раза показатели 2015 г. [3]. По данным еженедельного оперативного мониторинга заболеваемости ОРВИ Министерства здравоохранения Хабаровского края в октябре—ноябре 2016 г. число заболевших внебольничными пневмониями в два раза превысило уровень прошлого года. На долю детей пришлось 37% случаев пневмоний. Заболеваемость преимущественно протекала в среднетяжелой форме. Среди детей, заболевших пневмонией, организованные дети, посещающие детские сады и школы, составили 75%. В большинстве очагов внебольничных пневмоний установлены возбудители — *M. pneumoniae* и респираторные вирусы (письмо МЗ Хабаровского края «О проведении противоэпидемических мероприятий» от 12.12.2016 г.).

Известно, что препаратами выбора для этиотропной терапии респираторного микоплазмоза в педиатрической практике являются макролиды, к которым *M. pneumoniae* обладает природной чувствительностью. Однако ряд зарубежных публикаций в последнее время свидетельствует о появлении и нарастании вторичной устойчивости к макролидам у штаммов этого возбудителя [7, 8]. В странах Европы, Азии и Северной Америки зарегистрированы локальные вспышки респираторных инфекций, вызванных устойчивыми к макролидам штаммами *M. pneumoniae* [14, 15].

Проблема формирования антибиотикорезистентности у *M. pneumoniae* активно изучается. Одним из механизмов формирования резистентности к макролидным антибиотикам является наличие мутаций в генах 23S рРНК (главным образом, в позициях 2063, 2064 и 2617) и рибосомальных белков, приводящих к конформационным изменениям пептидилтрансферазного центра и соответственно к снижению аффинности препаратов. Выявление

соответствующих однонуклеотидных замен позволяет эффективно предсказать фенотип устойчивости к макролидам [7].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 160 клинических образцов — соскобов с задней стенки глотки (n=108) и проб мокроты (n=52), полученных в 2016 — 2017 гг. Биопробы были получены у пациентов, находившихся на лечении в педиатрическом отделении Хабаровского НИИ охраны материнства и детства, педиатрическом отделении №3 Детской городской клинической больницы № 9, детском отделении отделенческой больницы ОАО «РЖД» на станции Новый Ургал, при амбулаторном посещении консультативно-диагностического отделения клиники НИИ охраны материнства и детства по поводу инфекций нижних дыхательных путей (бронхит, пневмония).

В лаборатории молекулярно-генетических методов исследования НИИ охраны материнства и детства клинический материал был исследован на наличие ДНК *M. pneumoniae* с использованием коммерческого набора реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydomphila pneumoniae-FL*» (ЦНИИЭ, Москва) на основе технологии ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Выделение ДНК проводили с использованием набора «Рибо-Преп» (ЦНИИЭ, Москва).

Положительные образцы биопроб — соскобов с задней стенки глотки (n=28) и проб мокроты (n=2) в рамках научно-исследовательского сотрудничества были переданы для изучения в лабораторию молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета на наличие мутаций в гене 23S рРНК *M. pneumoniae*.

В качестве контроля использовали образцы ДНК контрольного штамма *M. pneumoniae* FH ATCC®15531 (последовательность гена 23S рРНК «дикого» типа), *M. pneumoniae* P05/132 (23S рДНК A2064C), *M. pneumoniae* T79 (23S рДНК A2063G), *M. pneumoniae* B 4010 (23S рДНК A2064G), *M. pneumoniae* B 6329 (23S рДНК C2617G) [7].

Наличие мутаций в гене 23S рРНК *M. pneumoniae* определяли с использованием модифицированного метода ПЦР-РВ с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером [7]. Разработанный метод обеспечивал возможность выявления любых нуклеотидных замен в позициях 2063, 2064 и 2617 в гене 23S рРНК *M. pneumoniae* (2058, 2059 и 2611 согласно нумерации для *Escherichia coli*) с помощью анализа кривых плавления зондов непосредственно после проведения амплификации в мультиплексном формате. Амплификацию и анализ кривых плавления зондов проводили с помощью Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Все образцы ДНК *M. pneumoniae*, выделенные от пациентов, также были дополнительно исследованы методом секвенирования. Идентификацию последовательностей «дикого» типа и мутаций в гене 23S рРНК проводили в соответствии с температурой плавления зондов. При выявлении с помощью ПЦР-РВ отличной от контрольного образца температуры плавления зонда, свидетельствующей о наличии мутаций в гене 23S рРНК, внутренний фрагмент длиной 747 п.н. исследовали путем дополнительной амплификации и секвенирования с внутренними праймерами. Секвенирование проводили с помощью наборов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, CA, USA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе молекулярно-генетического исследования в 30 образцах были получены положительные результаты на наличие ДНК *M.pneumoniae*. Необходимо отметить, что 95% положительных клинических образцов было получено, начиная со второй декады октября 2016 г., в период подъема заболеваемости внебольничной пневмонией детей в Хабаровске и Хабаровском крае.

Были проанализированы клинические случаи 22 пациентов с рентгенологически подтвержденной внебольничной пневмонией средней степени тяжести, в биопробах которых была выявлена ДНК *M.pneumoniae*. Возраст пациентов составил от 2 до 16 лет.

Важное значение для понимания географии распространения *M.pneumoniae* имеет место жительства пациентов. Семнадцать пациентов — жители Хабаровска и Хабаровского района (77,2%). Пятеро пациентов — жители Хабаровского края (22,7%): двое пациентов — Комсомольска-на Амуре и трое — п. Новый Ургал. Расстояние между всеми указанными населенными пунктами составляет от 270 до 338 км.

В двух случаях имели место семейные очаги заболеваемости внебольничной пневмонией: в первом случае — мать и сын, во втором случае — двое детей из одной семьи (8653, 8724 в табл.).

Средняя продолжительность пребывания пациентов в стационаре составила 12 койко-дней. У четверых пациентов отмечалось замедленное разрешение пневмонии. При этом, наибольшее количество койко-дней (27) отмечалось у пациента с пневмонией, протекающей на фоне бронхиальной астмы и пневмоплеврофиброза (8525 в табл.), а также с пневмонией (18 койко-дней), протекающей на фоне порока развития легких — простой гипоплазии средней доли (8806 в табл.). Ряд наблюдений подтверждает, что *M.pneumoniae* обуславливает более тяжелое течение неспецифических заболеваний легких, является триггером обострения хронической бронхолегочной патологии [11, 12]. У третьего пациента с длительным разрешением инфильтрации (19 койко-дней) при вирусологическом исследовании мазков ротоглотки на респираторные вирусы был выявлен вирус парагриппа 2 типа (8501 в табл.), у четвертого пациента (17 койко-дней) отмечалось стремительное, на третий день заболевания, развитие инфильтрации в легких, сопровождавшееся выраженными симптомами интоксикации и стойким фебрилитетом (8724 в табл.).

Локализация инфильтративных изменений в 95,4% случаев носила односторонний характер, практически в равной степени как слева ( $n=11$ ), так и справа ( $n=10$ ), занимая при этом от одного до трех сегментов. В одном случае инфильтрация легочной ткани носила двусторонний характер (8840 в табл.). Очаговые изменения описаны в 72,7% случаев, очагово-сливные — в 27,3% случаев. В дебюте заболевания фебрилитет отмечался у 15 пациентов — в 72,7% случаев, в 18,2% — субфебрилитет и в 9,1% случаев — пневмония была диагностирована на фоне нормотермии. У 100% пациентов при поступлении в стационар отмечались симптомы интоксикации.

В исследованиях НИИ охраны материнства и детства, проведенных ранее, по данным изучения вспышки респираторного микоплазмоза в 2004 г. [4, 5], рентгенологически определяли преимущественно однородную инфильтрацию по типу очаговых поражений с выраженным интерстициальным компонентом и медленным обратным развитием. По данным Островской О.В. и др. [5] микоплазменные пневмонии, наблюдаемые во время вспышки 2004 г., также имели более выраженную клиническую картину, чем во вневысшечный пе-

риод: в 2 раза чаще протекали с фебрильной температурой, чаще встречался малопродуктивный, сильный кашель, в большинстве случаев (70,2%) диагностировали фарингит. При спорадических случаях микоплазменных пневмоний в 4 раза чаще имела место нормотермия [5].

Из 30 биопроб, исследованных на наличие мутаций в гене 23S рРНК *M.pneumoniae* девятнадцать образцов продемонстрировали характерное снижение температуры плавления зонда ( $\Delta T_m = 10^\circ\text{C}$ ), свидетельствующее о наличии мутации в позиции А2063/2064G 23S рРНК *M.pneumoniae*. В остальных 11 образцах были выявлены специфические последовательности, которые имели профиль плавления Mrp2063-Rb, идентичный «дикому» типу (табл.).

Последующий анализ с использованием секвенирования подтвердил наличие однонуклеотидной транзиции в области связывания зонда в центральной петле домена V, которая соответствует замене А→G в позиции 2063. Это самый распространенный генотип, описанный в литературе, характеризующийся высокими значениями минимальной подавляющей концентрации (МПК) к макролидным антибиотикам.

Известно, что данные мутации приводят к нарушению связывания антибиотиков с консервативным участком-петлей V домена 23S рРНК и тем самым к формированию устойчивости к препаратам данной группы у различных видов грамотрицательных микроорганизмов [11, 14]. Анализ молекулярной характеристики *M.pneumoniae*, выявленной в регионе у детей с внебольничной пневмонией, позволил зафиксировать появление мутации в 23S рРНК у возбудителя.

В этом аспекте несомненный интерес вызывают схемы лечения пациентов с внебольничной пневмонией, обусловленной *M.pneumoniae*. Пациенты получали комбинированные схемы антибактериальной терапии — сочетание β-лактамов — цефалоспоринов III поколения с различными препаратами макролидового ряда: спирамицином, джозамицином, кларитромицином, азитромицином. Однако при анализе обратного развития клинических симптомов у пациентов статистически значимого различия при использовании различных схем сочетания препаратов выявлено не было. У 82% (n=18) восстановление пневматизации легочной ткани было достигнуто в стандартные сроки, в среднем на 10 день пребывания в стационаре.

Необходимо отметить, что ранее, в ходе молекулярно-генетического скрининга коллекции респираторных образцов, содержавших ДНК *M.pneumoniae*

#### Наличие мутации в гене 23S рРНК *M.pneumoniae* у 22 пациентов с внебольничной пневмонией

Пациент	Пол	Возраст	Дата забора биоматериала	ПЦР-мутация*
8409	М	5	20/09/2016	S (WT)
8484	Ф	9	12/10/2016	S (WT)
8501	Ф	11	18/10/2016	R (A2063G)
8525	Ф	6	21/10/2016	R (A2063G)
8542	Ф	11	21/10/2016	R (A2063G)
8543	Ф	13	21/10/2016	R (A2063G)
8545	М	14	21/10/2016	R (A2063G)
8582	М	11	31/10/2016	S (WT)
8653	М	7	14/11/2016	R (A2063G)
8655	М	9	14/11/2016	R (A2063G)
8656	Ф	14	14/11/2016	R (A2063G)
8715	М	13	25/11/2016	R (A2063G)
8724	М	12	28/11/2016	R (A2063G)
8729	М	6	28/11/2016	S (WT)
8741	М	13	30/11/2016	R (A2063G)
8757	Ф	11	02/12/2016	S (WT)
8806	Ф	9	14/12/2016	S (WT)
8818	Ф	16	19/12/2016	S (WT)
8836	Ф	10	23/12/2016	R (A2063G)
8840	Ф	8	23/12/2016	R (A2063G)
8903	М	2	24/01/2017	R (A2063G)
8981	М	10	13/02/2017	R (A2063G)

Примечание. *M.pneumoniae* — положительно у всех; \* чувствительность к макролидам (S — susceptibility, R — resistant), WT — «дикий» тип.

(в т.ч. исследование вспышки респираторного микоплазмоза в Смоленской области в 2013 гг.), не были выявлены значимые мутации, связанные со снижением чувствительности к макролидным препаратам [1, 9].

Немаловажное значение имеет тот факт, что в странах Азии, расположенных в географической близости к территории Хабаровского края, распространение резистентности к макролидам у *M. pneumoniae* составляет: Япония — 50—90%; Южная Корея — более 50%; Китай — более 90% [11, 15, 17,]. В доступной литературе нами не найдено сведений о регистрации макролидрезистентных штаммов *M. pneumoniae* на территории Российской Федерации.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в развитии вспышки внебольничной пневмонии, обусловленной *M. pneumoniae*, у детей в Хабаровском крае в осенне-зимний период 2016—2017 гг. участвовали макролидрезистентные штаммы возбудителя.

*Коллектив авторов выражает признательность зав. лаб. молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета Эйдельштейн И.А. за помощь в подготовке материалов статьи.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бобылев А.А., Рачина С.А., Эйдельштейн И.А. и др. Описание вспышки инфекции, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*, в Смоленской области. Пульмонология. 2013, 5: 97-100.
2. Гадлия Д.Д., Бакрадзе М.Д., Таточенко В.К. и др. Вспышка микоплазменной инфекции. Фарматека. 2015, 11 (304): 63-67.
3. Зайцева Т.А. О результатах федерального государственного санитарно-эпидемиологического надзора и федерального государственного надзора в области защиты прав потребителей в учреждениях здравоохранения Хабаровского края в 2016 г. и задачах на 2017 г. Материалы коллегии министерства здравоохранения Хабаровского края от 28 марта 2017 г. URL: <https://zdrav.medkhv.ru/node/5715> (дата обращения 28.04.2017).
4. Морозова О.И. Клинико-патогенетическое значение *Mycoplasma pneumoniae* в развитии бронхолегочных заболеваний у детей. Автореф. дис. канд. мед. наук. Хабаровск, 2006.
5. Островская О.В., Холодок Г.Н., Морозова Н.В. и др. Частота респираторного микоплазмоза у детей Хабаровского края с 2004 года. Дальневосточный медицинский журнал. 2016, 3: 50-53.
6. Разуваев О.А., Кокорева С.П., Трушкина А.В. Особенности микоплазменной инфекции при вспышечной и спорадической заболеваемости у детей. Лечение и профилактика. 2015, 4 (16): 6-9.
7. Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Романов А.В. и др. Выявление мутаций устойчивости к макролидам в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Тихоокеанский медицинский журнал. 2015, 1: 63-66.
8. Bebear C., Pereyre S., Peuchant O. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. Future Microbiol. 2011, 6 (4): 423-431.
9. Edelstein I., Rachina S., Touati A. et al. *Mycoplasma pneumoniae* monoclonal P1 type 2c outbreak, Russia, 2013. Emerging Infectious Diseases. 2016, 22 (2): 348-350.
10. Godron A., Pereyre S., Monet C. et al. Hemolytic uremic syndrome complicating *Mycoplasma pneumoniae* infection. Pediatr. Nephrol. 2013, 28 (10): 2057-2060.
11. Hongmei Sun, Guanhua Xue, Chao Yan et al. Changes in molecular characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens from children in Beijing between 2003 and 2015. PLoS One. 2017, 12 (1): doi: 10.1371/journal.pone.0170253.
12. Kannan T.R., Hardy R.D., Coalson J.J. et al. Fatal outcomes in family transmission of *Mycoplasma pneumoniae*. Clin. Infect. Dis. 2012, 54 (2): 225-231.
13. Polkowska A., Harjunpaa A., Toikkanen S. et al. Increased incidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in Finland, 2010–2011. Euro Surveill. 2012, 17(5): pii=20072.
14. Soo Jin Yoo, Hyo-Bin Kim, Sang-Ho Choi et al. Differences in the Frequency of 23S rRNA gene mutations in *Mycoplasma pneumoniae* between children and adults with community-

acquired pneumonia: Clinical impact of mutations conferring macrolide resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2012, 56 (12): 6393-6396.

15. Yamazaki T., Kenri T. Epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan and therapeutic strategies for macrolide-resistant *M. pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 2016, 7; doi: 10.3389/fmicb.2016.00693.

Поступила 27.07.17

Контактная информация: Гусева Ольга Евгеньевна, к.м.н.,  
680022, Хабаровск, ул. Воронежская, 49, корп.1, р.т. (4212) 76-55-35

© Д.В. ЕФРЕМЕНКО, 2018

*Д.В.Ефременко*

## **БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ: ОСОБЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

Научно обоснована номенклатура приоритетных патогенных биологических агентов (ПБА) и вызываемых ими инфекционных болезней для лабораторной диагностики при обеспечении биологической безопасности массовых мероприятий. Оценку ПБА (вирусов, бактерий, биологических токсинов I — IV групп патогенности) проводили, используя критерии, позволяющие на качественном уровне прогнозировать их потенциальное негативное воздействие. Разработана научно обоснованная номенклатура ПБА, представляющих наибольшую угрозу биологической безопасности вне зависимости от их приуроченности к территории риска и времени риска. В перечень вошли возбудители бактериальных (чума, сибирская язва, холера) и вирусных (ортопоксвирусы, филовirusы, аренавирусы, коронавирусы, ортомиксовирусы) инфекций, относящиеся к I — II группам патогенности. Подготовлена номенклатура возбудителей широко распространенных природно-очаговых (туляремия, лептоспироз, Ку-лихорадка, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, орнитоз) и убиквитарных (бруцеллез, геморрагический колибактериоз, гемолитико-уремический синдром, кишечный иерсиниоз, псевдотуберкулез, болезнь легионеров) инфекций, способных вызвать серьезное осложнение санитарно-эпидемиологической обстановки. На основании проведенной оценки опасных биологических факторов был сформирован универсальный перечень ПБА для приоритетного обеспечения готовности к лабораторной диагностике в период массовых мероприятий.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 45—52

Ключевые слова: массовые мероприятия, биологическая безопасность, лабораторная диагностика, номенклатура патогенных биологических агентов, особо опасные инфекции

*D.V.Efremenko*

## **BIOLOGICAL SAFETY OF PUBLIC EVENTS: FEATURES OF LABORATORY DIAGNOSTICS**

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

To scientifically prove the nomenclature of the priority pathogenic biological agents (PBA) and the infectious diseases caused by them for laboratory diagnostics when ensuring biological safety of public events. PBA assessment (viruses, bacteria, biological toxins I — IV of groups of pathogenicity) was carried out, using the criteria allowing to predict their potential negative impact at the qualitative level. The evidence-based nomenclature of PBA posing the greatest threat of biological safety regardless of their confinedness to the territory of risk and time of risk is developed.

The list included the bacterial (plague, anthrax, cholera) and viral agents (orthopoxviruses, filoviruses, arenaviruses, coronaviruses, orthomyxoviruses) of the I — II groups of the pathogenicity. The nomenclature of the widespread natural and focal (tularemia, leptospirosis, the Q fever, hemorrhagic fever with a renal syndrome, ornithosis) and the ubiquitous (brucellosis, hemorrhagic colibacillosis, a hemolytic-uremic syndrome, intestinal yersiniosis, pseudotuberculosis, Legionnaires' disease) infections capable to cause the serious complication of the sanitary and epidemiologic situation is prepared. On the basis of the carried-out assessment of dangerous biological factors the universal list of PBA for priority ensuring readiness for laboratory diagnostics during public events was created.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 45—52

Key words: public events, biological safety, laboratory diagnostics, nomenclature of pathogenic biological agents, especially dangerous infections

Лабораторная диагностика инфекционных болезней и индикация патогенных биологических агентов (ПБА) — одно из важных направлений работы в рамках функционирования системы надзора и контроля в области биологической безопасности [7]. Критерием ее эффективности служит способность своевременно выявлять и идентифицировать опасные биологические факторы.

Во время массовых мероприятий, особенно международных, возрастают риски заноса и трансграничного распространения инфекционных патологий, в том числе экзотических для территории проведения. Увеличивается напряженность в связи с угрозой биологического терроризма. Вероятные чрезвычайные ситуации (ЧС) рассматриваются с точек зрения потенциальной опасности для населения, дальнейшего проведения мероприятия, а также возможных политических, экономических и социальных последствий, которые могут превосходить таковые в обычных обстоятельствах [3]. В этой связи. готовность лабораторной сети должна быть повышенной, качественно и количественно соответствовать сопутствующим рискам.

Цель работы — научно обосновать номенклатуру приоритетных ПБА и вызываемых ими инфекционных болезней для лабораторной диагностики при обеспечении биологической безопасности массовых мероприятий.

При разработке перечня актуальных инфекционных нозологий изучались научно-практические и информационно-аналитические материалы, посвященные организации санитарно-эпидемиологического благополучия во время наиболее значимых международных событий, проходивших в России и за рубежом (Олимпийские игры и другие крупные спортивные соревнования, политические саммиты). Оценку ПБА (вирусов, бактерий, биологических токсинов I — IV групп патогенности) для составления соответствующей номенклатуры проводили, используя критерии, позволяющие на качественном уровне прогнозировать их потенциальное негативное воздействие.

Особенности функционирования лабораторной службы на административных территориях определяются характерными биологическими, природными и социальными факторами. Разнообразие климатогеографических условий и существующие отличия культурно-бытовых традиций этносов, населяющих Россию, влияют на показатели заболеваемости природно-очаговыми и убикуитарными инфекциями. Готовность к лабораторной диагностике обеспечивается, прежде всего, в отношении истинных и статистических эндемий, регистрирующихся в субъекте.

На период наиболее важных массовых мероприятий, учитывая возрастаю-

ший внутренний и внешний эпидемиологический риск, укрепляется санитарно-эпидемиологическая служба региона, в частности, задействуются специализированные противозидемические бригады (СПЭБ) Роспотребнадзора. В задачи СПЭБ входит выявление в биотическом и абиотическом материале возбудителей особо опасных и экзотических инфекций, лабораторная диагностика заболеваний неустановленной этиологии с тяжелым и атипичным течением, усиление местной лабораторной сети при вспышках. То есть, деятельность лабораторий бригады во многом ориентирована на предотвращение и минимизацию последствий возможных осложнений эпидемиологической обстановки. Однако очевидно, что потенциал вызывать ЧС биологического характера у различных возбудителей существенно варьирует. Таким образом, с целью разработки перечня наиболее актуальных ПБА для приоритетного обеспечения готовности к лабораторной диагностике в период массовых мероприятий необходимо определить условия их отбора. Были выбраны следующие критерии оценки опасных биологических факторов и вызываемых ими инфекционных болезней, позволяющие проводить многофакторный анализ и прогнозировать их потенциальное негативное воздействие.

1. Эпидемический потенциал возбудителя: потенциальная способность вызывать ЧС биологического характера (при единичном случае заболевания, при эпидемической вспышке, при множественных очагах инфекции); естественная восприимчивость людей; возможность передачи возбудителя от человека к человеку; возможность эпидемического распространения инфекции.
2. Механизм передачи возбудителя инфекции: вероятность реализации аэрогенного, фекально-орального, контактного механизмов.
3. Распространение инфекции (возбудителя) в мире.
4. Наличие иммунной прослойки у населения.
5. Особенности клинического течения болезни: длительность инкубационного периода; тяжесть течения манифестной формы; возможность субклинической формы (носительства возбудителя).
6. Возможность и опасность применения возбудителя в целях биологического терроризма (в соответствии с [6, 8]).

С использованием соответствующих критериев рассмотрены ПБА I — IV групп патогенности, возбудители болезней вирусной и бактериальной этиологии.

С эпидемиологической точки зрения ключевое значение среди вышеуказанных факторов имеет эпидемический потенциал патогена и непосредственно его способность вызывать ЧС, что тесно связано и зависит от механизма и путей передачи. Сведения о полноте охвата населения профилактическими прививками, особенностях клинического течения болезни, вероятности использования ПБА в целях биологического терроризма позволили дополнить и уточнить информацию о потенциальной опасности возбудителя, однако они носят вспомогательный характер и в данной статье подробно рассматриваться не будут. Обеспечение готовности к лабораторной диагностике инфекций, эндемичных для региона массового мероприятия с учетом сезонного фактора, представляет обязательное условие, этому вопросу посвящено значительное количество научных публикаций [1 — 3, 5] и предметом настоящего исследования не являлось. Целевым направлением работы было создание перечня наиболее актуальных нозологий и патогенов вне зависимости от их приуроченности к территории риска и времени риска, способных вызвать ЧС в области биологической безопасности.

Наибольшим эпидемическим потенциалом обладают возбудители с

воздушно-капельным и фекально-оральным путями передачи, к которым имеется высокая естественная восприимчивость у людей, способные передаваться от человека к человеку. При наличии даже одного источника инфекции в таком случае в эпидемический процесс может быть вовлечена значительная группа контактных лиц. Для целого ряда ПБА I — II групп патогенности ведущим механизмом передачи является контактный. В его реализации весомая роль отводится культурно-бытовым особенностям населения, что в последние годы наглядно показано на примере эпидемии болезни, вызванной вирусом Эбола в Западной Африке и вспышки сибирской

Таблица 1. Номенклатура и эпидемиологическая характеристика ПБА для приоритетного обеспечения готовности к лабораторной диагностике в период массового мероприятия: возбудители вирусных инфекций

ПБА (заболевание)	Источник и факторы передачи	Механизм передачи (пути передачи)	Распространение	
ортопокс-вирусы	вирус агуальной оспы (оспа)	отделяемое верхних дыхательных путей, пораженная кожа (гнойное отделяемое, струпья) инфицированного человека, трупа	а, к, вер (в-к, к-б, вер)	офиц. в 2 лаб. (РФ, США)
	вирус оспы безьян (оспа обезьян)	те же и биологические жидкости, мясо инфицированного животного (приматы, грызуны, белки)		ДРК (бас. р. Конго), ЦАР, Ю. Судан
фило-вирусы	вирус Эбола (болезнь, вызванная вирусом Эбола)	кровь, экскреты инфицированного человека, животного (приматы, летучие мыши и др.), трупа; контаминированные медицинские инструменты; сперма	к, г (к, к-б, пол)	Ц. и Зап. Африка
	вирус Марбург (болезнь, вызванная вирусом Марбург)	те же и отделяемое верхних дыхательных путей инфицированного человека?	те же и а?	В. и Ц. Африка
арена-вирусы	вирус Ласса (лихорадка Ласса)		а, ф-о, к, г, вер (в-п, киш, вод,	Ц. и З. Африка
	вирусы комплекса Такарибе (геморрагические лихорадки): Хунин (Аргентинская), Мачупо (Боливийская), Гуанарито (Венесуэльская), Сэбия (Бразильская)	загрязненные мочой грызунов пища, вода, др. предметы; кровь, экскреты, отделяемое верхних дыхательных путей, сперма инфицированного человека; контаминированные медицинские инструменты	к-б, к, в-к, пол, вер)	Ю. Америка
корона-вирусы	ТОРС-АКВ (тяжелый острый респираторный синдром)	отделяемое верхних дыхательных путей инфицированного человека, животного? (енотовидные собаки, барсуки, летучие мыши и др.); пища? вода?	а, ф-о? (в-к, в-п, киш? вод? к-б?)	Китай? Ю.-В. Азия?
	БВРС-КоВ (ближневосточный респираторный синдром)	экскреты и отделяемое верхних дыхательных путей инфицированного верблюда, человека (тесный контакт); верблюжьи мясо, молоко, слюна; летучие мыши и др. животные?	к, ф-о? а? (к, киш, к-б? в-к?)	Б. Восток
ортомиксо-вирусы	вирус гриппа типа А (H5) (высокопатогенный птичий грипп) вирус гриппа типа А (H7N9) (высокопатогенный птичий грипп)	инфицированные домашние и дикие водоплавающие перелетные птицы, их экскреты и секреты; контаминированная товарная продукция (тушки птиц, яйца, перо и др.), корма; больной человек? (при тесном контакте — крайне редко)	а (в-к, в-п)	В. и Ю.-В. Азия

Примечание. Сокращения механизма передачи см. в табл. 2.

**Таблица 2. Номенклатура и эпидемиологическая характеристика ПБА для приоритетного обеспечения готовности к лабораторной диагностике в период массового мероприятия: возбудители бактериальных инфекций**

ПБА (заболевание)	Источник и факторы передачи	Механизм передачи (пути передачи)	Распространение
<i>Yersinia pestis</i> (чума)	носители в природном очаге (суслики, сурки, песчанки, полевки, пищухи), синантропные грызуны (крысы, мышевидные), домашние животные (верблюды, собаки), дикие животные (зайцы, лисы), человек, их трупы; специфический переносчик — блохи, механические переносчики — клещи, вши; пища, вода, воздух	т, к, ф-о, а (т, к, пищ, вод, в-к)	Азия (Казахстан, Китай, Монголия, Вьетнам), Африка (Конго, Танзания, Мадагаскар), Северная (США) и Южная (Перу) Америка, Россия (наиб. акт. оч. — КБР, КЧР, Р. Алтай, Дагестан, Калмыкия, Тыва, Астраханская обл.)
<i>Bacillus anthracis</i> (сибирская язва)	КРС, МРС, лошади, ослы, верблюды, свиньи, дикие животные (редко), их трупы; почва, пища (продукты животноводства), вода, воздух; переносчик? (слепни, муха-жигалка, комары)	к, ф-о, а, т? (к, пищ, вод, в-п, т?)	практически повсеместное
<i>Vibrio cholerae</i> (холера)	испражнения, рвотные массы инфицированного человека	ф-о (вод, пищ, к-б)	Ю. и Ю.-В. Азия, З., Ц., В. Африка, стр. Кариб. бас.

**Примечание.** Здесь и в табл. 1 и 3: а — аэрогенный, к — контактный, вер — вертикальный, к-б — контактно-бытовой, г — гемоконтактный, пол — половой, ф-о — фекально-оральный, в-п — воздушно-пылевой, пищ — пищевой, вод — водный, в-к — воздушно-капельный, т — трансмиссивный, воз — воздушный.

язвы в Ямало-Ненецком автономном округе [4, 9, 10]. Эпидемиологическая опасность инфекций с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя напрямую зависит от соответствующей территории, сезона и наличия факторов риска. При отсутствии условий для распространения в регионе данных болезней готовность к лабораторным исследованиям должна обеспечиваться, учитывая необходимость выявления отдельных заносных случаев заболевания, которые не представляют большую угрозу биологической безопасности, а также в целях дифференциальной диагностики.

По результатам выполненной оценки опасных биологических факторов сформирован универсальный для любой территории массового мероприятия перечень ПБА вирусной (табл. 1) и бактериальной (табл. 2) природы, способных привести к ЧС биологического характера при инфицировании одного или нескольких человек, в отношении которых в случае реализации неблагоприятных сценариев комплекс противоэпидемических мер будет носить максимальный характер.

Готовность к лабораторной диагностике инфекций, имеющих повсеместное распространение, должна касаться не только эндемий с традиционно высокими показателями заболеваемости. Ряд нозологических форм, возбудители которых относятся ко II — III группе патогенности, при эпидемических проявлениях, характеризующихся вспышечной заболеваемостью, наличием множественных очагов, способны вызвать серьезное осложнение эпидемиологической обстановки и представляют весомую угрозу биологической безопасности массовых мероприятий (табл. 3). При этом обеспеченность лабораторий диагностическими препаратами для индикации и идентификации соответствующих ПБА в различных субъектах России не всегда является достаточной.

Таким образом, на основании проведенной на качественном уровне оценки опасных биологических факторов был сформирован универсальный пере-

Таблица 3. Номенклатура и эпидемиологическая характеристика ПБА для обеспечения готовности к лабораторной диагностике в период массового мероприятия: возбудители широко распространенных природно-очаговых и убиквитарных инфекций

ПБА (заболевание)	Источник и факторы передачи	Механизм передачи (пути передачи)
<i>Francisella tularensis</i> (туляремия)	основной источник — мышевидные, зайцы, крысы, хомяки, их трупы; переносчики — клещи, комары, слепни; факторы — пища, вода, воздух	т, к, ф-о, а (т, к, пища, вод, в-п)
<i>Leptospira</i> spp. (лептоспироз)	грызуны, КРС, МРС, свиньи, лошади, собаки; вода, трава, влажная почва (загрязненные мочой грызунов), молоко, мясо	к (к, пища и вод — редко)
<i>Coxiella burnetii</i> (Ку-лихорадка)	в антропургических очагах — КРС, МРС, свиньи, собаки, домашние птицы; молоко и молочные продукты, сырые животного происхождения, вода, экскреты, клещи (редко)	а, ф-о, к, т — редко (в-п, пища, к, к-б, т)
<i>Hantavirus</i> (геморрагическая лихорадка с почечным синдромом)	предметы, загрязненные экскретами грызунов, пищевые продукты, вода	а, ф-о, к (в-п, пища, вод, к)
<i>Chlamydomphila psittaci</i> (орнитоз)	синантропные, декоративные и домашние птицы (основные — семейства попугаевых и голубиных); большой человек — крайне редко; воздух, пища	а, ф-о — до 10 % (в-п, пища)
<i>Brucella</i> spp. (бруцеллез)	МРС, КРС, свиньи, олени; молоко и молочные продукты, мясо, околоплодная жидкость, abortивный материал	к, ф-о, а — редко (к, пища, в-п)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7, O104:H4 и другие серотипы продуценты веротоксина (геморрагический колибактериоз, гемолитико-уремический синдром)	загрязненные испражнениями инфицированного человека продукты, вода, бытовые предметы; испражнения КРС?	ф-о (пища, вод, к-б)
<i>Yersinia enterocolitica</i> (кишечный иерсиниоз)	основной источник — грызуны, КРС, МРС, свиньи, кролики, кошки, собаки, птицы; факторы — молоко и молочные продукты, мясо, овощи, вода	ф-о, а — редко (пища, вод, в-п)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (псевдотуберкулез)	основной источник — грызуны; факторы — овощи, зелень, соленья, репе фрукты, молоко и молочные продукты, вода	
<i>Legionella pneumophila</i> (болезнь легионеров)	вода (системы водоснабжения, кондиционирования, орошения)	а (в-к)

чень ПБА для приоритетного обеспечения готовности к лабораторной диагностике в период массовых мероприятий. Однако при подготовке необходимо учитывать масштабность события, то есть его продолжительность относительно инкубационного периода различных заболеваний, количество участников и гостей, их региональное представительство.

Наибольшую угрозу биологической безопасности представляют больные натуральной оспой и легочной формой чумы. Даже единичный случай заболевания из-за их высокой контагиозности должен рассматриваться как ЧС. Остальные возбудители из перечня приоритетных ПБА представляют максимальную угрозу при регистрации множественных очагов и вспышек инфекций. Если говорить об опасности биологического терроризма, то необходимо отметить, что все патогены из данной номенклатуры могут в том или ином виде быть использованы с этой целью.

Как потенциальные агенты биотерроризма рассматриваются также возбудители инфекций, имеющих широкое распространение (туляремии, бруцеллеза, Ку-лихорадки, геморрагического колибактериоза, гемолитико-уремического синдрома, легионеллеза) и некоторые другие ПБА [6, 8]. Например, бактерии из рода *Burkholderia*, вызывающие сап и мелиоидоз, заболеваемость которыми регистрируется в некоторых странах Азии, Африки и Южной Америки, обладают высокой контагиозностью при аэрозольном распылении. Из биологических токсинов, в этой связи, наибольшую опасность представляют ботулинические и стафилококковые. Они могут применяться как для заражения пищевых продуктов и воды, так и в виде аэрозолей. В армии США созданы запасы стафилококкового энтеротоксина типа В (SEB), который хранится в виде белого порошка, быстро растворяется в воде, переводится в аэрозольное состояние и устойчив к воздействию высокой температуры. Из-за имеющихся пробелов в иммунизации населения различных стран настороженность должна сохраняться в отношении болезней, поражающих преимущественно детский контингент, таких как менингококковая инфекция, корь, полиомиелит.

В разработанную номенклатуру ПБА не были включены возбудители инфекций с трансмиссивным механизмом передачи, так как их опасность для каждой территории в течение года различна и зависит от ряда факторов биотической и абиотической природы — наличия векторов (специфических и механических переносчиков), климатических условий, ландшафтно-географических особенностей. Следовательно, готовность к лабораторной диагностике данных нозологических форм в период массовых мероприятий также должна носить дифференцированный характер.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Брагина И.В., Кузькин Б.П., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Куличенко А.Н., Ефременко Д.В., Малецкая О.В., Кузнецова И.В., Манин Е.А., Лямкин Г.И., Кутырев В.В., Портенко С.А., Красовская Т.Ю., Пархоменко В.В., Щербина Л.И., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Тешева С.Ч., Оробей В.Г., Завора Д.Л., Брюханов А.Ф., Елдинова В.Е., Юничева Ю.В., Пиликова О.М., Дерлятко С.К. Организация работы и порядок лабораторной диагностики инфекционных болезней во время проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года. Проблемы особо опасных инфекций, 2015, 2: 13-16.
2. Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Ефременко А.А. Метод определения потребности специализированной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора в диагностических препаратах в период массовых мероприятий. Здоровье населения и среда обитания. 2017, 4: 49-52.
3. Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Оробей В.Г., Ефременко А.А., Дубянский В.М., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Семенко О.В. Применение риск-ориентированного подхода при планировании и организации противоэпидемического обеспечения массовых мероприятий. Анализ риска здоровью. 2017, 1: 4-12.
4. Малеев В.В., Tolpo F., Kopotou K.V., Sow T.I., Ицков Я.Ю., Демина Ю.В., Левковский А.Е., Коломоец Е.В., Ковалев Г.А., Хорошилов В.Ю., Омариев З.М. Эпидемиологические и клинические особенности болезни, вызванной вирусом Эбола, в Гвинейской Республике. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 3: 27-32.
5. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Брагина И.В., Кузькин Б.П., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Гуськов А.С., Иванов Г.Е., Чикина Л.В., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Тешева С.Ч., Куличенко А.Н., Ефременко Д.В., Манин Е.А., Кузнецова И.В., Пархоменко В.В., Куличенко О.А., Рафеев Г.К., Щербина Л.И., Завора Д.Л., Брюханова Г.Д., Елдинова В.Е., Юничева Ю.В., Дерлятко С.К., Комарова Н.С. Особенности функционирования и взаимодействия диагностических лабораторий, задействованных в обеспечении за-

- шиты от инфекционных болезней, при проведении XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 в Сочи. Журн. микробиол. 2015, 1: 109-114.
6. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. Вестник Российской академии наук. 2003, 73 (3): 195-204.
  7. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Актуальные проблемы биологической безопасности в современных условиях. Часть 2. Понятийная, терминологическая и определительная база биологической безопасности. Вестник Российской академии медицинских наук. 2013, 11: 4-11.
  8. Онищенко Г.Г., Шапошников А.А., Субботин В.Г., Простакишин Г.П., Аветисов Г.М. Обеспечение биологической, химической и радиационной безопасности при террористических актах. Под ред. Г.Г. Онищенко. М., 2005.
  9. Попова А.Ю., Демина Ю.В., Ежлова Е.Б., Куличенко А.Н., Рязанова А.Г., Малеев В.В., Плоскирева А.А., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Нечепуренко Л.А., Харьков В.В. Вспышка сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 году, эпидемиологические особенности. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 4: 42-46.
  10. Попова А.Ю., Сафронов В.А., Воіго М.У., Куклев Е.В., Кедрова О.В., Удовиченко С.К., Лопатин А.А., Раздорский А.С., Ежлова Е.Б., Смоленский В.Ю., Кутырев В.В. Эпидемиологические особенности болезни, вызванной вирусом Эбола, в странах Западной Африки в 2013-2015 гг. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 3: 42-48.

Поступила 10.06.17

Контактная информация: Ефременко Дмитрий Витальевич, к.м.н.,  
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*М.П.Червакова, Т.Н.Шаров, И.А.Баркова, А.М.Барков, Д.В.Викторов, А.В.Топорков*

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИММУНОГЕННЫХ БЕЛКОВ ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS* В MALDI TOF MS**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Идентификация иммуногенных белков штаммов *Bacillus anthracis*, продуцируемых в условиях, имитирующих организм хозяина. *Материалы и методы.* В работе использованы культуральные фильтраты изогенных вариантов штамма *B.anthraxis* 575/122: R02 (pXO1<sup>+</sup> pXO2<sup>+</sup>); R01 (pXO1<sup>+</sup> pXO2<sup>-</sup>); R00 (pXO1<sup>-</sup> pXO2<sup>-</sup>), полученные в условиях, имитирующих организм хозяина. В одномерном электрофорезе и иммуноблоттинге с гипериммунными сыворотками определены иммунодоминантные белки, которые идентифицированы в MALDI TOF MS. *Результаты.* В иммуноблоттинге выявлены белки м.м. 97 — 14,1 кДа. Белок 90 кДа штамма *B.anthraxis* 575/122 R01 в MALDI TOF MS идентифицирован как протективный антиген м.м. 85,810 кДа, белок м.м. 60 — как GMP синтаза м.м. 57,239 кДа. В культуральных фильтратах трех штаммов определено два общих антигена: белок с м.м. 97 кДа, идентифицированный как EA 1 *B. anthracis* м.м. 91,361 кДа и белок м.м. 45 кДа — как энолаза *B. anthracis* м.м. 46,418 кДа. *Заключение.* Таким образом, условия, имитирующие организм хозяина, способствуют продукции иммунодоминантных белков *B. anthracis*. В MALDI TOF MS подтверждены данные по молекулярно-весовой характеристике протективного антигена и белка EA1, а также ряда протеаз *B. anthracis*. Результаты могут быть использованы при выделении этих белков с целью усовершенствования диагностических и вакцинных препаратов.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 52—57

**Ключевые слова:** *Bacillus anthracis*, иммунодоминантные белки, одномерный электрофорез, иммуноблоттинг, MALDI TOF MS

## IDENTIFICATION OF IMMUNOGENIC PROTEINS OF STRAINS OF *BACILLUS ANTHRACIS* IN MALDI TOF MS

Volgograd State Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Identification of obtained in host-simulated conditions immunogenic proteins of isogenic variants of *Bacillus anthracis* 575/122. *Materials and methods.* We used culture filtrate of isogenic variants of *B. anthracis* 575/122: R02 (pXO1<sup>-</sup> pXO2<sup>+</sup>); R01 (pXO1<sup>+</sup> pXO2<sup>-</sup>); R00 (pXO1<sup>-</sup> pXO2<sup>-</sup>), obtained in host-simulated conditions. In the one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting with hyperimmune serums immunodominant proteins, that have been identified in MALDI TOF MS. *Results.* Immunoblotting revealed proteins with molecular masses in range 97 — 14.1 kDa. 90 kDa protein from strain *B. anthracis* 575/122 R01 in MALDI TOF MS was identified as protective antigen with 85.810 kDa. Protein with molecular mass 60 kDa was identified as GMP synthase with molecular mass 57.239 kDa. In the culture filtrates of three strains two common antigen were identified: protein with molecular mass 97 kDa, identified as *B. anthracis* EA 1 with molecular mass 91.361 kDa protein and 45 kDa protein as enolase *B. anthracis* with molecular mass 46.418 kDa. *Conclusion.* Thus, the conditions that simulate the host can promote the production of immunodominant proteins of *B. anthracis*. The data about molecular-weight characteristics of protective antigen and EA 1 protein as well as some of proteases of *B. anthracis* are confirmed by the MALDI TOF MS. The results can be used for isolation of these proteins to improve the diagnostic and vaccine preparations.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 52—57

**Key words:** *Bacillus anthracis*, immunodominant proteins, dimensional electrophoresis, immunoblotting, MALDI TOF MS

### ВВЕДЕНИЕ

*Bacillus anthracis* — грамположительная спорообразующая бактерия. Капсула и экзотоксин являются основными факторами вирулентности, которые детерминируются плазмидами токсинообразования (pXO1) и капсулообразования (pXO2). Продукция токсинов и капсулы возможна *in vitro*, когда микроорганизм выращивают в анаэробных условиях при температуре 37°C в минимальной безбелковой питательной среде с бикарбонатом. Считается, что таким образом создаются условия, подобные встречающимся в организме хозяина (*in vivo*) [15].

В настоящее время изучаются нативные белки *B. anthracis*, секретируемые во внеклеточную среду (секретомы), которые участвуют во взаимодействии хозяин — патоген, что делает их потенциальными мишенями для иммунодетекции и иммунопрофилактики [7, 8, 10 — 12].

Цель исследования — идентификация иммуногенных белков штаммов *B. anthracis*, продуцируемых в условиях, имитирующих организм хозяина.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы изогенные варианты вирулентного штамма *B. anthracis* 575/122, отличающиеся по набору плазмид вирулентности: токсинпродуцирующий *B. anthracis* 575/122 R01 (pXO1<sup>+</sup> pXO2<sup>-</sup>); капсулосодержащий *B. anthracis* 575/122 R02 (pXO1<sup>-</sup> pXO2<sup>+</sup>); бесплазмидный *B. anthracis* 575/122 R00 (pXO1<sup>-</sup> pXO2<sup>-</sup>) [1].

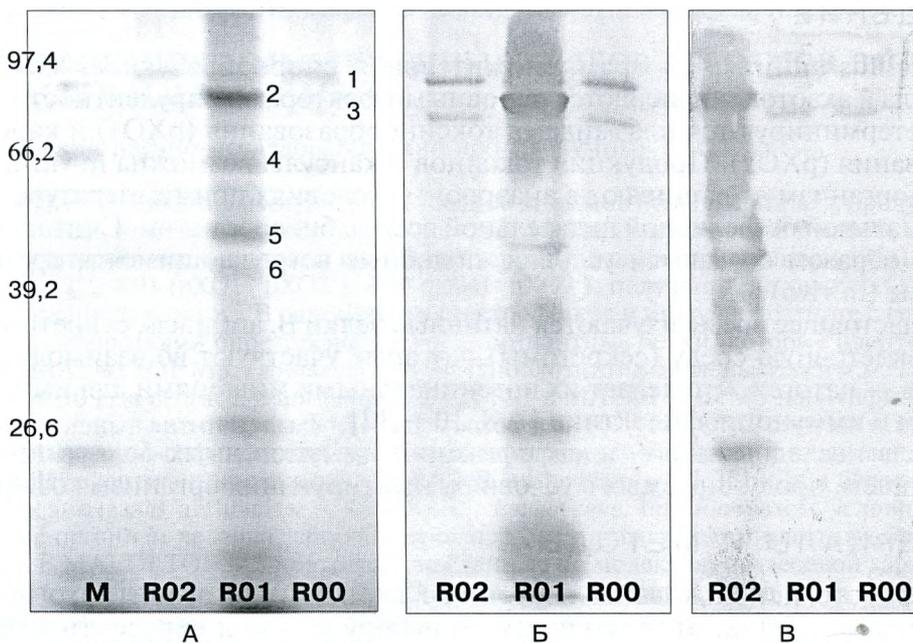
Штаммы засевали на сердечно-мозговой агар, инкубировали в течение ночи (16 часов) при 37°C. Единичные колонии суспендировали в 2 мл R среды

[13] и 1 мл полученной суспензии заседали в 100 мл R среды с 0,25% (вес/объем) глюкозы, инкубировали при 37°C в течение 4 часов со встряхиванием при 120 оборотах в минуту. Затем по 10 мл бактериальных взвесей переносили в колбы объемом 500 мл, содержащие 100 мл R среды с 0,25% глюкозы и 0,85% бикарбоната натрия (вес/объем). Три колбы помещали в условия, моделирующие организм хозяина (анаэробные), в CO<sub>2</sub> инкубатор, при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. КФ выращивали 18 часов, стерилизовали через фильтр с диаметром пор 0,20 мкм, концентрировали в 10 раз на ультрафильтре PM10 «Amicon».

Осаждение белков бесклеточных культуральных фильтратов (КФ), одномерный электрофорез и иммуноблоттинг проводили по методике, описанной ранее [1, 2]. Белковые фракции из полиакриламидных гелей вырезали, промывали и обрабатывали трипсином в соответствии с протоколом A. Shevchenko et al. [14]. Пептиды после трипсинолиза идентифицировали в MALDI-TOF MS, в качестве матрицы использовали раствор альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (10 мг/мл) в 0,1% трифторуксусной кислоты и 50% ацетонитрила. Масс-спектры получали с использованием масс-спектрометра Axima Performance™ (Shimadzu) в режиме «Linear Mode» и анализировали с использованием the Mascot Daemon software package (Matrix Science, Boston, MA). Параметры поиска были: число пропущенных сайтов гидролиза не более одного, точность определения массы ±0,5 Da.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведен электрофоретический анализ белков КФ трех генотипов штамма *B. anthracis* 575/122 (рис.). Наибольшее количество интенсивно окрашенных полос определялось у штамма *B. anthracis* 575/122 R01. Все штаммы про-



**Иммунодоминантные белки КФ изогенных вариантов *B. anthracis* 575/122, выращенных в условиях, моделирующих организм хозяина.**

А — электрофорез; Б — иммуноблоттинг с гипериммунной кроличьей сывороткой; В — иммуноблоттинг с сывороткой зараженной морской свинки. М — маркеры м.м.; R02 — КФ *B. anthracis* 575/122 R02; R01 — КФ *B. anthracis* 575/122 R01; R00 — КФ *B. anthracis* 575/122 R00.

**Иммунодоминантные белки культуральных фильтратов изогенных вариантов штамма *B. anthracis* 575/122, идентифицированные в MALDI TOF MS**

Белок м.м.(кДа)*	<i>B. anthracis</i> 575/122R01	<i>B. anthracis</i> 575/122 R02	<i>B. anthracis</i> 575/122R00
97	Белок EA1 91,361 кДа	Белок EA1 91,361 кДа	Белок EA1 91,361 кДа
90	Протективный антиген 85,810 кДа	Отсутствовал**	Отсутствовал
87	Отсутствовал	Не идентифицирован	Не идентифицирован
60	GMP синтаза 57,239 кДа	Отсутствовал	Отсутствовал
45	Энолаза 46,418 кДа	Энолаза 46,418 кДа	Энолаза 46,418 кДа
40	Ацетил гамма глутамил фосфат редуктаза <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 37, 925 кДа	Отсутствовал	Отсутствовал

Примечание. \* Мм определена по электрофоретической подвижности, \*\* на электрофореграмме не окрашивался.

дуцировали белок 97 кДа. Белок с м.м. 87 кДа не визуализировался в КФ *B. anthracis* 575/122 R01. В КФ *B. anthracis* 575/122 R02 выявлялись электрофоретические фракции, сходные с фракциями КФ *B. anthracis* 575/122 R01, за исключением ПА, но они были слабо окрашены. Следует отметить, что КФ содержали компоненты, которые не окрашивались Кумасси, но реагировали с гипериммунными сыворотками (кроличьей и морской свинки), что может свидетельствовать об их небелковой природе либо незначительном содержании. В связи с чем, для MALDI TOF MS использованы иммунодоминантные белки, которые выявлялись антисыворотками и окрашивались Кумасси — белки м.м.: 97, 90, 60, 45, 40 кДа токсинпродуцирующего штамма *B. anthracis* 575/122 R01, 97, 87 и 45 кДа бесплазмидного *B. anthracis* 575/122 R00 и капсулосодержащего *B. anthracis* 575/122 R02 штаммов.

Белковые полосы, окрашенные Кумасси, вырезали из полиакриламидного геля, промывали и обрабатывали трипсином в соответствии с методикой [14]. Протеины идентифицировали в MALDI TOF MS с помощью программного обеспечения MASCOT, сравнивая полученные масс-спектры с референтными значениями базы данных SWISS-PROT. Результаты проведенной идентификации представлены в табл.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Наряду с известными факторами вирулентности *B. anthracis* (например, ПА, ОФ, ЛФ) определен ряд антигенов, которые могут стать основой для диагностических тест-систем и вакцин [8, 11, 12]. Рекомбинантные белки обладают недостаточной иммуногенностью, в том числе, вследствие отсутствия у них патоген-ассоциированных молекулярных структур микроорганизмов, взаимодействующих с рецепторами врожденного иммунитета [4]. В связи с чем, представлялось целесообразным изучение нативных белков, накапливаемых *in vitro*, с последующей идентификацией иммунодоминантных антигенов, экспрессируемых *in vivo* [7, 15].

В настоящем исследовании одномерный электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, иммуноблоттинг и MALDI TOF MS использовали для выявления и идентификации иммунодоминантных антигенов КФ изогенных вариантов штамма *B. anthracis* 575/122. Одномерный электрофорез был выбран нами из-за возможности последующего препаративного накопления белков.

Штаммы трех генотипов *B. anthracis* 575/122 выращивали в условиях, мо-

делирующей среду хозяина, что подразумевает инкубацию в жидкой R-среде при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> [7, 13, 15]. Электрофоретическая картина при разделении белков КФ штаммов *B. anthracis* 575/122 R00 и R01 не отличалась от картины, описанной ранее [1, 2]. Мажорными белками капсулосодержащего штамма *B. anthracis* 575/122 R02 были белки с м.м. 97 и 87 кДа. При этом другие электрофоретические фракции R02 штамма совпадали со штаммом R01, но очень слабо окрашивались, несмотря на увеличение белковой нагрузки при нанесении на гель. Это можно объяснить влиянием продуктов транскрипции генов *acrA* и *atxA* на экспрессию генов *B. anthracis*. Ген *atxA*, расположенный на плазмиде *pXO1*, контролирует экспрессию путем активации или подавления более сотни генов, отвечающих за вирулентность, расположенных на обеих плаزمиде и хромосоме. Механизм взаимного регулирования генов *acrA* и *atxA* до конца не изучен [9].

Иммуноблоттинг с белками КФ штаммов, выращенных в анаэробных условиях, проводили с гипериммунными сыворотками кролика и морской свинки. Таким образом, выявляли иммунодоминантные антигены, экспрессируемые *in vivo*, которые накапливали *in vitro* в условиях, моделирующих организм хозяина [7, 15]. Иммунные сыворотки реагировали с белками м.м. 97, 90, 60, 45, 40 кДа токсинпродуцирующего штамма (*B. anthracis* 575/122 R01) 97, 87 и 45 кДа бесплазмидного (*B. anthracis* 575/122 R00) и капсулосодержащего (*B. anthracis* 575/122 R02) штаммов.

Иммунодоминантные белки, окрашенные Кумасси, идентифицировали в MALDI TOF MS, для интерпретации масс-спектрометрических данных использовали базу данных SWISS-PROT, которая на сегодняшний момент является одной из самых надежных. Данные о каждом белке, внесенном в эту базу, тщательно верифицированы и включают в себя такую информацию, как вариации структуры, функции белка, ссылки на публикации и многое другое [3]. Белок токсинпродуцирующего штамма 90 кДа был определен, как ПА м.м. 85,810 кДа. По литературным данным ПА имеет молекулярную массу 82,684 кДа, летальный фактор (ЛФ) — 90,337 кДа, отечный фактор (ОФ) — 88,808 кДа [6]. В проведенном исследовании белки, соответствующие ЛФ и ОФ, определены не были. По данным Lamonica J.M. et al. (2007), при проведении протеомного анализа ПА, ОФ и ЛФ были выявлены в КФ вирулентного штамма RA3 (*pXO1*<sup>+</sup>, *pXO2*<sup>+</sup>). Однако в токсинпродуцирующем штамме RA3R (*pXO1*<sup>+</sup>) ОФ и ЛФ не идентифицированы, а ПА был определен в значительно более низком количестве. Авторы связывают это с подавлением транскрипции генов *pXO1*, в связи с потерей плазмиды *pXO2*. Влияние *acrV*, гена регулятора *pXO2*, на гены *pXO1* не изучалось [10].

В нашем исследовании белки м.м. 87 кДа КФ штаммов *B. anthracis* 575/122 R02 и *B. anthracis* 575/122 R00 при помощи MALDI TOF MS идентифицировать не удалось, но их м.м. совпадает с м.м. белка Sap *B. anthracis* (86,7 кДа) [10].

Белки м.м. 60 кДа и 40 кДа токсинпродуцирующего штамма были идентифицированы, как GMP синтаза *B. anthracis* м.м. 57,239 кДа и ацетил гамма глутамил фосфат редуктаза *B. amyloliquefaciens* м.м. 37, 925 кДа.

При одномерном разделении белков КФ трех вариантов штамма *B. anthracis* 575/122 определено два общих антигена: белок с м.м. 97 кДа, идентифицированный как EA 1 *B. anthracis* (м.м. 91,361 кДа), белок м.м. 45 кДа, идентифицированный как энولاза *B. anthracis* (м.м. 46,418 кДа).

Энولاза *B. anthracis* является иммунодоминантным антигеном и фактором вирулентности, позволяет бактериям приобретать поверхностно-связанную

протеолитическую активность путем связывания плазминогена в организме инфицированного хозяина [5, 7, 15].

Иммунодиагностические свойства ПА и белка EA 1, выделенных препаративным электрофорезом, были изучены нами в предыдущих исследованиях [2]. Белок м.м. 46,418 кДа накоплен в препаративном электрофорезе, его свойства не изучались.

Таким образом, в MALDI TOF MS идентифицированы иммунодоминантные антигены изогенных вариантов *B. anthracis* 575/122. Данные белки *B. anthracis* продуцируются *in vivo*, могут быть накоплены в препаративном электрофорезе (*in vitro*) и использованы для усовершенствования диагностических и вакцинных препаратов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барков А.М., Новоженина А.В., Порохня С.В., Ткаченко Г.А., Липницкий А.В. Характеристика изогенных вариантов *Bacillus anthracis* с различным содержанием плазмид вирулентности. Журн. микробиол. 2015, 1: 17-22.
2. Баркова И.А., Червакова М.П., Барков А.М., Новоженина А.В., Викторов Д.В. Диагностическое значение некоторых иммунодоминантных белков изогенных вариантов *Bacillus anthracis*. Клиническая лабораторная диагностика. 2016, 61 (12): 833-838.
3. Краснов Н.В., Лютвинский Я.И., Подольская Е.П. Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в протеомном анализе. Научное приборостроение. 2010, 20 (4): 5-20.
4. Семенов Б.Ф., Зверев В.В., Хаитов Р.М. Прогноз развития вакцинопрофилактики в первые десятилетия XXI века. Иммунология. 2009, 6: 324-335.
5. Agarwal S., Kulshreshtha P., Bambah Mukku D. et al. Alpha-Enolase binds to human plasminogen on the surface of *Bacillus anthracis*. Biochim. Biophys. Acta. 2008, 1784 (7-8): 986-994.
6. Boyer A. E., Gallegos-Candela M., Lins R.C. et al. Quantitative mass spectrometry for bacterial protein toxins — a sensitive, specific, high-throughput tool for detection and diagnosis. Molecules. 2011, 16: 2391-2413.
7. Chitlaru T., Gat O., Grosfeld H. et al. Identification of *in vivo*-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome. Infect. Immun. 2007, 75: 2841-2852.
8. Chitlaru T., Zaide G., Ehrlich S. et al. HtrA is a major virulence determinant of *Bacillus anthracis*. Molecular Microbiology. 2011, 81 (6): 1542-1559.
9. Fouet A. AtxA, a *Bacillus anthracis* global virulence regulator. Res. Microbiol. 2010, 161: 735-742.
10. Lamonica J.M., Wagner M., Eschenbrenner M. et al. Comparative secretome analyses of three *Bacillus anthracis* strains with variant plasmid contents. Infect. Immun. 2005, 73: 3646-3658.
11. Liu X., Wang D., Ren J. et al. Identification of the immunogenic spore and vegetative proteins of *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R. PLoS ONE. 2013, 8 (3): e57959.
12. Pflughoeft K.J., Swick M.C., Engler D. A. et al. Modulation of the *Bacillus anthracis* secretome by the immune inhibitor A1 protease. J. Bacteriol. 2014, 196 (2): 424-435.
13. Ristroph J.D., Ivins B.E. Elaboration of *Bacillus anthracis* antigens in a new, defined culture medium. Infect. Immun. 1983, 39: 483-486.
14. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nature protocols. 2006, 1 (6): 2856-2860.
15. Walz A., Mujer C., Connolly J. et al. *Bacillus anthracis* secretome time course under host-simulated conditions and identification of immunogenic proteins. Proteome Science. 2007, 5: 11.

Поступила 20.07.17

Контактная информация: Червакова Маргарита Павловна,  
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)37-37-74

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

## **БАКТЕРИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА BORRELIA MIYAMOTOI, ВОЗБУДИТЕЛЯ ИКСОДОВОГО КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА (ИКБ-БМ)**

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

*Цель.* Целью данной работы было изучение бактерицидного действия сыворотки крови человека на *Borrelia miyamotoi* in vitro. *Материалы и методы.* Спирохеты *B. miyamotoi*, штаммы HT31 и LB-2001, инкубировали в неиммунной сыворотке здоровых доноров (СЗД), в СЗД с инактивированной нагреванием системой комплемента, а также в образцах сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ. Жизнеспособность (подвижность) боррелий после инкубации контролировали путем темнопольной микроскопии. Уровень сывороточных антител к специфическим белкам *B. miyamotoi* (ферменту GIpQ и поверхностным белкам Vlp15/16, Vlp18, Vsp1, Vlp5) измеряли с помощью специально разработанного планарного белкового иммуночипа. *Результаты.* Боррелии полностью сохраняют жизнеспособность в неиммунной СЗД, но их подвижность частично или полностью подавляется при добавлении сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ или кроличьих антител к *B. miyamotoi*. Имобилизирующее действие иммунной сыворотки в существенной степени ингибируется при ее инактивации нагреванием, что указывает на опосредованность этого эффекта системой комплемента. *Заключение.* Антитело-зависимое комплемент-опосредованное бактерицидное действие сыворотки крови человека, вероятно, не является единственным, 100% эффективным механизмом защиты человека от инфекции *B. miyamotoi*, но требует поддержки со стороны клеточного иммунитета.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 58—67

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, *Borrelia miyamotoi*, бактерицидное действие сыворотки, in vitro, антитела, система комплемента

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

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

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

*Aim.* Our aim was to study the bactericidal effect of human serum on *Borrelia miyamotoi* in vitro. *Materials and methods.* *B. miyamotoi* spirochetes (strains HT31 and LB-2001) were incubated in non-immune serum of healthy donors (SHD) and in heat inactivated complement-depleted SHD, as well as in serum samples of the patients recovered from ITBB-BM. The viability, that is motility, of borrelia after incubation was investigated by dark-field microscopy. The levels of serum antibody to *B. miyamotoi*-specific proteins (GIpQ enzyme and four variable major proteins Vlp15/16, Vlp18, Vsp1, and Vlp5) were measured by specially designed plane protein microarray. *Results.* *Borrelia* fully retain their viability in non-immune SHD, but their motility is partially or completely suppressed by the addition of serum from ITBB-BM convalescents or rabbit antibodies to *B. miyamotoi*. The immobilizing effect of the immune serum is substantially inhibited by its heat-inactivation, which indicates that immobilizing effect is mediated by the complement system.

*Conclusion.* Antibody-dependent complement-mediated bactericidal action of human blood serum is probably not the only and 100% effective mechanism for human defense against *B. miyamotoi* infection, but requires support from cellular immunity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 58—67

Key words: ixodes tick-borne borreliosis, *Borrelia miyamotoi*, serum bactericidal activity, *in vitro*, antibodies, complement system

## ВВЕДЕНИЕ

Иксодовый клещевой боррелиоз, вызванный *Borrelia miyamotoi* (ИКБ-БМ) — ранее неизвестное инфекционное заболевание, открытое в России [2, 18]. В отличие от «классического» иксодового боррелиоза — болезни Лайма (БЛ), вызываемой *B. burgdorferi sensu lato*, ИКБ-БМ представляет собой генерализованную инфекцию с преобладанием лихорадочного синдрома и возможностью преходящих нарушений функций печени, почек, сердца и других органов [1, 5, 6, 8]. У иммунокомпromетированных пациентов инфекция *B. miyamotoi* может становиться хронической и сопровождаться таким угрожающим жизни осложнением как менингоэнцефалит [13, 14].

Боррелии вида *B. miyamotoi* обнаруживаются повсеместно в иксодовых клещах, распространенных в зонах умеренного климата Евразии и Северной Америки, и генетически принадлежат к группе боррелий — возбудителей клещевых возвратных лихорадок (КВЛ) [17, 26]. При условии адекватной антибиотикотерапии рецидивов ИКБ-БМ не возникает; в естественных условиях, без антибиотикотерапии возможны, как и при КВЛ, новые приступы лихорадки через 1 — 2 недели [9]. Для понимания динамики инфекционного процесса при ИКБ и КВЛ необходимо, в первую очередь, ответить на ряд вопросов: что позволяет возбудителям в течение инкубационного периода успешно размножаться в крови и тканях организма человека, несмотря на сопротивление иммунной системы? Что происходит на стадии естественной, без антибиотикотерапии элиминации возбудителя в ходе выздоровления? Какие эффекторные звенья иммунитета критически необходимы для выздоровления? Почему выздоровление не всегда бывает полным и возможны рецидивы или хронизация боррелиозов? История изучения БЛ насчитывает более 30 лет, а КВЛ — даже более 100 лет, тем не менее, убедительных и полных ответов на сформулированные выше вопросы не получено. Предполагается, что вирулентные штаммы возбудителей КВЛ и БЛ защищены от бактериолитического действия системы комплемента (СК) млекопитающих, поскольку экспрессируют на своей поверхности ряд фактор Н-связывающих белков (Fhbp). Такие белки-липопротеины выявлены у *B. burgdorferi s.l.* (OspE, BbCRASPs, BaCRASPs), *B. hermsii* (BhCRASPs или FhbA) и других боррелий [4, 20, 21, 23]. В свою очередь, фактор Н и фактор Н-похожие белки хозяина способствуют инактивации фактора С3b, распаду С3-конвертазы и, тем самым, ингибируют сборку мембраноатакующих комплексов (МАК) комплемента на поверхности бактерий. Защищенные в результате этой «молекулярной мимикрии», по крайней мере, от активации СК по альтернативному пути, боррелии размножаются и накапливаются в кровотоке, при КВЛ до таких высоких концентраций как  $10^8$  боррелий на мл крови [4]. Ряд экспериментов показывает, что Т-независимая продукция специфических IgM необходима и достаточна для защиты мышей от КВЛ [12]. При этом важными антигенами возбудителей

КВЛ являются вариабельные основные липопротеины наружной мембраны — variable major lipoproteins (VMPs), разделяемые на два семейства: variable small lipoproteins (Vsp) и variable large lipoproteins (Vlp). Vlp, в свою очередь, разделяются на подсемейства alpha, beta, gamma и delta. Антитела к VMPs потенциально могут быть протективными. Однако у возбудителей КВЛ от 26 до 80 вариантов генов Vsp и Vlp, хотя в каждый отдельный момент активен только ген, находящийся в специальном месте экспрессии на линейной плазмиде. Остальные варианты находятся на молчащих архивных плаزمиде, но в процессе рекомбинации могут заместить работающий ген [11, 24]. По мере того, как вырабатываются антитела к первому серотипу, количество боррелий в крови уменьшается, при возникновении нового удачного сероварианта боррелии вновь накапливаются в крови.

Сведения о взаимодействии нового возбудителя *B. miyamotoi* с иммунной системой человека практически отсутствуют. В заголовках двух публикаций сообщается, что боррелии вида *B. miyamotoi* являются комплемент-резистентными [22, 25], в третьей статье уточняется, что резистентность обеспечивается фактор Н-связывающим белком CbiA [19]. Это весьма неточное утверждение, поскольку реально в этих исследованиях показано только, что бактерицидное действие сыворотки крови человека не реализуется в условиях отсутствия анти-боррелиозных антител, то есть по механизму активации альтернативного и/или лектинового пути СК. В нашей работе рассматривается взаимодействие *B. miyamotoi* с сывороткой крови в более физиологических условиях, в первую очередь, при добавлении сыворотки переболевших ИКБ-БМ, богатой специфическими антителами к VMPs.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на базе ООО МО «Новая больница» Екатеринбург и Республиканской клинической инфекционной больницы Удмуртской Республики в эпидемический сезон (июнь—июль) 2015 и 2016 гг. Критерием включения пациента было подозрение на клещевую инфекцию. Применялись как стандартные диагностические методы (определение IgM и IgG к боррелиям и вирусу клещевого энцефалита), так и оригинальные методики специфических ПЦР, выявляющих ДНК *B. miyamotoi* или *B. burgdorferi* s.l., описанные в деталях ранее [2, 18]. ИКБ-БМ диагностировался на основании детекции ДНК *B. miyamotoi* в крови больного при отсутствии лабораторных признаков иных инфекций. Образцы сыворотки крови больных ИКБ-БМ собирались во время лечения и на стадии реконвалесценции — через 1 и 3 месяца после начала заболевания и затем хранились и транспортировались в условиях глубокой заморозки до момента использования в эксперименте.

Для серологической дифференциации ИКБ, вызываемых *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*, предложено использовать антитела к ферменту глицерофосфодиэстер-фосфодиэстеразе (GlpQ), который не синтезируется видами *B. burgdorferi* s.l., но встречается у *B. miyamotoi* [17, 24, 26]. Разработанный в ЦНИИ эпидемиологии планарный белковый биочип включает белки-антигены как *B. burgdorferi* s.l., так и *B. miyamotoi* (GlpQ, Vlp15/16, Vlp18, Vsp1, Vlp5), для которых были получены генноинженерные конструкции, кодирующие антигенную область, фрагмент белка или полную последовательность белка. Антигены были экспрессированы в *Escherichia coli*, очищены методами аффинной и ионообменной хроматографии и нанесены на иммуночип/слайд с альдегидным покрытием 3D-Aldehyde Glass Slides (PolyAn, Германия). Учет результатов анализа после нанесения на иммуночип сыворотки крови больных

и вторичных антител к иммуноглобулинам человека проводили с помощью многоканального флуоресцентного сканера MarS (Ditabis, Германия), а обсчет, стандартизацию и интерпретацию результатов — с использованием специально разработанного программного обеспечения StarSky. Уровень специфических IgM и IgG характеризовали полуколичественным способом по величине стандартизованного оптического сигнала [10].

В работе использованы два штамма *V. miyamotoi* HT31 и LB-2001, из коллекции Академического медицинского центра, Амстердам. Штамм HT31 принадлежит к азиатскому генотипу и изолирован от клеща *Ixodes persulcatus* в Японии, получен из хранилища Центров по контролю заболеваемости, США. Штамм LB-2001, принадлежащий к американскому генотипу, получен из Йельского университета, ранее изолирован от клеща *Ixodes scapularis*. Штаммы первых пассажей (до десятого) хранились в условиях глубокой заморозки, для целей данной работы они подращивались в ранее разработанной специализированной среде МКР-FS [16, 25] при 33°C до окончания логарифмической фазы роста приблизительно через неделю при концентрации около 10<sup>7</sup> боррелий/мл. После центрифугирования и отмывки свежей средой МКР-FS готовили суспензию боррелий, содержащую точно 10<sup>7</sup> живых подвижных спирохет на мл (компонент 1 экспериментальной среды). Подсчет клеток и контроль их жизнеспособности проводили методом темнопольной микроскопии.

Экспериментальная среда состояла из двух-трех компонентов (табл.). В лунки с U-образным дном полипропиленового 96-луночного планшета до-

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

Номер п/п	Состав экспериментальной среды, в которой проводится инкубация боррелий			Доля подвижных боррелий (%), среднее±стандартное отклонение		
	Компонент 1 (сыворотка крови)	Компонент 2	Компонент 3 (штамм <i>V. miyamotoi</i> )	В начале инкубации	Через час инкубации	Через 3 часа инкубации
1	СЗД50	нет	LB-2001	95.1±2.4	91.6±1.9	90.1±1.5
2	ИН-СЗД50	нет	LB-2001	95.4±1.4	91.8±2.2	91.9±2.9
3	СЗД50	нет	HT31	90.7±1.9	86.7±3.2	85.3±3.5
4	ИН-СЗД50	нет	HT31	95.0±1.0	95.0±1.0	95.9±1.4
5	СЗД50	Анти- $\Psi$ sp1 IgG, 100 мкг/мл	LB-2001	92.1±1.7	<b>0.3±0.5</b>	<b>0.0</b>
6	ИН-СЗД50	Анти- $\Psi$ sp1 IgG, 100 мкг/мл	LB-2001	91.1±1.3	<b>49.8±3.1</b>	<b>6.5±4.8</b>
7	СЗД50	Анти- $\Psi$ sp1 IgG, 20 мкг/мл	LB-2001	95.3±1.1	<b>39.2±6.3</b>	<b>1.7±3.2</b>
8	ИН-СЗД50	Анти- $\Psi$ sp1 IgG, 20 мкг/мл	LB-2001	96.6±0.6	83.9±6.3	<b>33.9±8.8</b>
9	СЗД50	активированный зимозан, 0.05%	LB-2001	94.8±1.7	88.9±1.8	90.5±1.6
10	СЗД50	активированный зимозан, 0.05%	HT31	90.3±2.1	84.8±6.7	90.4±4.2
11	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код MIR-4672-D2	HT31	96.7±0.8	<b>68.6±4.3</b>	<b>58.0±4.9</b>
12	СЗД25	С-ИКБ-БМ5, код MIR-4672-D2	HT31	96.7±0.8	92.9±2.9	71.7±1.7
13	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код MIR-4672-D2	HT31	96.7±0.8	95.1±1.7	95.3±1.1
14	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код SHU-7-3М	HT31	96.7±0.8	<b>69.0±3.0</b>	<b>59.5±3.5</b>
15	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код SHU-7-3М	HT31	96.7±0.8	88.9±2.6	94.9±1.6
16	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код SH1-3-1М	HT31	96.7±0.8	<b>56.1±5.1</b>	<b>47.2±3.7</b>
17	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код SH1-3-1М	HT31	96.7±0.8	89.3±2.2	88.5±1.9

Примечание. СЗД50 — сыворотка крови здорового донора, 50%; СЗД25 — СЗД, 25%; ИН-СЗД50 — инактивированная нагреванием СЗД, 50%; ИН-СЗД25 — ИН-СЗД, 25%. С-ИКБ-БМ — сыворотка крови переболевшего ИКБ-БМ, взятая на стадии реконвалесценции, 25%. Код соответствует пациенту и времени взятия образца сыворотки. С-ИКБ-БМ5 — С-ИКБ-БМ, разведенная МКР-FS, 5%. ИН-С-ИКБ-БМ — инактивированная нагреванием С-ИКБ-БМ, 25%. Компонент 3 — суспензия боррелий в среде МКР-FS, 5x10<sup>6</sup> на мл. Указаны финальные концентрации сыворотки, антител, зимозана и боррелий после их смешивания в составе экспериментальной среды инкубации. Жирным шрифтом выделены условия, в которых число подвижных боррелий ниже 70%.

бавляли компонент 1, сыворотку крови здорового донора (СЗД) без IgM и IgG к боррелиям. В отсутствии второго компонента объем компонента 1 составлял 50% от общего объема экспериментальной среды, то есть обычно 50 мкл. В некоторых опытах вместо СЗД использовали инактивированную нагреванием СЗД (ИН-СЗД). Известно, что после инактивации сыворотки нагреванием (56°C, 1 час) литическая активность СК равна нулю, в то время как большинство других белков, включая антитела, остаются интактными. В качестве 2 компонента мог быть использован раствор поликлональных кроличьих IgG к Vsp1 [24] в различных концентрациях в фосфатном буфере (ФБ) в объеме 5 мкл или для контроля эффекта этих антител просто ФБ 5 мкл. При этом объем компонента 1 уменьшали до 45 мкл. Еще в одном эксперименте компонентом 2 служила взвесь активированного зимозана в ФБ. Чаще всего в качестве компонента 2 как источник специфических антител использовали сыворотку крови переболевших ИКБ-БМ в объеме 25 мкл. При этом для стандартизации условий эксперимента (активности СК, биохимического состава сыворотки и т.п.) в экспериментальной среде присутствовал и компонент 1 — СЗД — в объеме 25 мкл. Третьим компонентом, также в объеме 50% от общего объема или 50 мкл, была суспензия боррелий. Таким образом, во всех экспериментальных условиях в начале эксперимента в лунке находилось  $5 \times 10^6$ /мл спирохет, 90 — 97% из которых были подвижными.

После окончательного заполнения лунок планшет немедленно заклеивали и помещали в термостат для инкубации в микроаэробных условиях. Через 1 час и 3 часа инкубации из каждой лунки отбирали по 4 капли экспериментальной среды с боррелиями объемом 5 мкл и наносили по отдельности на предметное стекло под покровное стекло. Оценка доли подвижных и неподвижных боррелий проводилась немедленно методом темнопольной микроскопии независимым исследователем, не оповещенным о статусе изучаемого образца (контроль или опыт и т.п.). В каждой капле определяли состояние не менее 100 боррелий, как правило, в 5 — 6 полях зрения. Ранее было показано, что оценка числа подвижных боррелий в остром эксперименте, длящемся 1 — 3 часа, практически равноценна оценке способности боррелий к росту в аналогичных условиях в эксперименте, длящемся трое суток: иммобилизация 100% боррелий соответствует 100% ингибированию роста, иммобилизация 50% боррелий соответствует окончательной гибели 50% боррелий на более поздних стадиях инкубации и т.п. [15, 19]. Визуально первая стадия лизиса боррелий, следующая за иммобилизацией, выражается в нарушении строгой штопорообразной формы спирохет, их скрючивании, появлении многочисленных выпячиваний (blebs) наружной мембраны.

Все статистические расчеты и оценки проведены с помощью лицензионной программы IBM SPSS Statistics 19. Для оценки значимости различий распределений количественных и качественных переменных использовали стандартные непараметрические методы [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При инкубации в течение 1 — 3 часов в среде МКР-FS боррелии сохраняют подвижность; то же самое наблюдается и при инкубации в среде, содержащей 50% СЗД (табл. строки 1 и 3) или же 50% ИН-СЗД (строки 2 и 4). Добавление 100 мкг/мл IgG к Vsp1 приводит к быстрой и необратимой иммобилизации и лизису боррелий штамма LB-2001, которые экспрессируют именно этот VMP (строка 5); использование ИН-СЗД вместо СЗД замедляет, но не прекращает этот процесс (строка 6). При использовании меньшей кон-

центрации антител к Vsp1 (20 мкг/мл) иммобилизация в СЗД также существенно замедляется (строка 7), а иммобилизация в ИН-СЗД незначительна (строка 8) — через 3 часа и даже через 24 часа инкубации (данные не приводятся) часть боррелий сохраняет жизнеспособность. На штамм НТ31, не экспрессирующий белки семейства Vsp, антитела к Vsp1 не действуют (данные не приводятся).

Если в среду, содержащую СЗД и боррелии, добавляется активированный зимозан в количестве (0,05% по весу), достаточном для связывания и потребления присутствующих компонентов СК, значимой иммобилизации боррелий также не происходит (строки 9 и 10). Это значит, что отсутствует так называемый «эффект свидетеля», когда образующиеся в ходе активации СК растворимые МАК неспецифически связываются с соседними клетками, вызывая их повреждение.

Наибольшее число экспериментов поставлено в условиях, когда в среде инкубации присутствуют 25% СЗД, не содержащей антител к боррелиям (как стандартизованный источник компонентов СК), и 25% сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ, взятой на стадии реконвалесценции, до 3 месяцев после начала заболевания (как источник специфических противоборрелиозных антител). Сыворотку крови, взятую во время лечения, нельзя было использовать, так как она содержала антибиотик. Как и ожидалось, эффект различных образцов сыворотки переболевших варьировал в широком диапазоне: от 0 до 100% иммобилизованных спирохет. В среднем через 1 час инкубации  $70 \pm 15\%$  (среднее  $\pm$  стандартное отклонение,  $M \pm SD$ ) спирохет штамма НТ31 были подвижными (изучено 20 образцов от 14 больных). Через 3 часа эта величина менялась незначительно — до  $66 \pm 19\%$ .

В табл. приведено несколько примеров иммобилизирующего действия сыворотки крови переболевших (строки 11, 14, 16), его ингибирования при предварительной инактивации СК нагреванием (строки 13, 15, 17) или при разбавлении сыворотки переболевших (строка 12).

На основании данных табл. возможны многочисленные сравнения проявлений эффекта иммобилизации в различных условиях. Для краткости величины уровня значимости всех подобных сравнений не приводятся. При рассмотрении табл. можно воспользоваться «правилом двух сигм»: если диапазоны  $M_1 - 2xSD_1$  и  $M_2 + 2xSD_2$  не пересекаются, то величины  $M_1$  и  $M_2$  заведомо различны ( $p < 0,05$ ).

Из 20 образцов сыворотки, исполь-

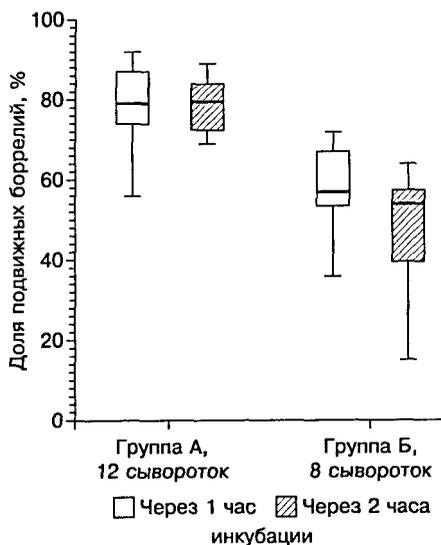


Рис. 1. Влияние содержания IgM к VMPs на иммобилизацию *V. miyamotoi*.

Ось ординат — доля подвижных боррелий штамма НТ31 после 1 и 3 часов инкубации в смеси образцов сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ (компонент 2) и сыворотки крови здорового донора (компонент 1). Группа А — образцы сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ, не содержащие IgM к VMP или содержащие антитела только к одному из 4 VMPs; Б — образцы сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ, содержащие IgM к двум или более из 4 VMPs. Достоверность различия между группами А и Б по критерию Манна-Уитни  $p = 0,0007$  и  $0,00002$  для 1 и 3 часов инкубации соответственно.

зованных в опытах со штаммом НТ31, 15 содержали IgM к G1pQ и 14 — IgG; только в двух образцах отсутствовали и IgM, и IgG. Однако ни наличие, ни уровень антител к этому внутриклеточному ферменту не коррелировали с иммобилизующим действием сыворотки. Также эффект сыворотки переболевших не коррелировал и с уровнем IgM или IgG к каждому из 4 VMPs по отдельности. Влияние IgM (но не IgG) к VMPs проявлялось следующим образом: 14 образцов сыворотки содержали IgM к V1p15/16, 9 к V1p5, по 4 образца — антитела к V1p18 или Vsp1. При этом 6 использованных образцов не содержало антител ни к одному из 4 VMPs, 6 — только антитела к V1p15/16, и 2, 4 и 2 образца содержали IgM к двум, трем или 4 VMPs соответственно. Иммобилизующий эффект был значительно выше у образцов, содержащих антитела к 2 и более VMPs (рис. 1) и коррелировал с суммарной концентрацией IgM к VMPs (рис. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты позволяют прийти к некоторым выводам и гипотезам, пока предварительным, поскольку наша работа является первым исследованием такого типа. Как и некоторые другие, хотя и не все, патогенные боррелии [19, 22, 25] *B. miyamotoi* успешно выживают в неиммунной сыворотке крови человека. Это означает, что активация СК по альтернативному и лектиновому пути и последующая сборка МАК на поверхности боррелий ингибируются, вероятно, за счет присутствия специальных белков, отвечающих за «молекулярную мимикрию» [4, 21, 23]. При таких генерализованных инфекциях, как ИКБ-БМ, активация СК может идти не только на поверхности собственно бактерий, но и на поверхности эндотелия сосудов и клеток крови. Активированные компоненты СК гипотетически могли бы атаковать боррелии за счет «эффекта свидетеля» (bystander lysis), однако в опытах с активированным зимозаном нами подобного явления не обнаружено.

Специфические антитела способны инициировать иммобилизацию и гибель *B. miyamotoi*, судя по всему, двумя способами. Первый способ не требует активации СК и реализуется при очень высоких, практически не физиологических концентрациях антител, заключааясь, по-видимому, в нарушении структуры липидной наружной мембраны. Второй способ предполагает активацию СК по классическому пути и образование МАК, поскольку не функционирует при «декомплементации» сыворотки нагреванием. Эффект антител дозозависим и снижается при разбавлении сыворотки как источника антител. При анализе связи содержания IgM и IgG к специфическим белкам *B. miyamotoi* (VMPs и G1pQ) и иммобилизующего действия конкретного образца сыворотки на штамм НТ31 обращает на себя внимание несколько обстоя-

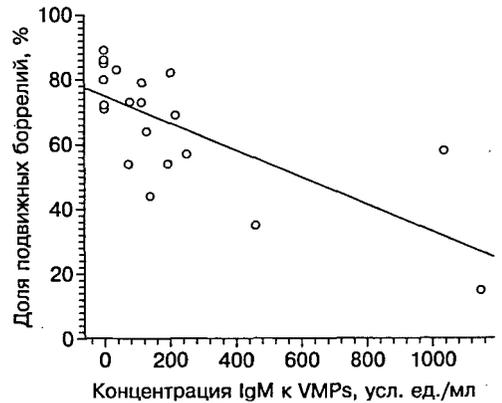


Рис. 2. Влияние содержания IgM к VMPs на иммобилизацию *B. miyamotoi*.

Ось ординат — доля подвижных боррелий штамма НТ31 после 3 часов инкубации в смеси образцов сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ (компонент 2) и сыворотки крови здорового донора (компонент 1). Ось абсцисс — суммарный уровень антител к 4 VMPs (V1p15/16, V1p5, V1p18 и Vsp1). Кружки представляют результаты отдельных экспериментов с 20 образцами сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ, линия — линейная аппроксимация взаимосвязи, коэффициент корреляции Спирмена 0,70,  $p=0,001$ .

тельств. На фоне наличия IgM не удается выявить заметного влияния присутствия IgG в образце. В этой связи, планируется изучить эффект IgG с использованием «поздних» образцов, взятых спустя год и позже от начала заболевания. Антитела к GlpQ, хотя и являются хорошим диагностическим серомаркером инфекции ИКБ-БМ, вероятно, слабо участвуют в иммобилизующем действии сыворотки и не являются протективными. Эффект антител к VMPs максимален при их высокой концентрации и в большей степени выражен при синэргичном действии антител к нескольким VMPs, чем при воздействии только антител к наиболее распространенному в изученных условиях VMP, то есть к Vp15/16. Примечательно, что при анализе клинических проявлений ИКБ-БМ выясняется, что тяжесть заболевания в большей степени коррелирует также с суммарным количеством антител к VMPs, а не с уровнем антител к отдельным VMP [Платонов А.Е. и др., 2017].

Теоретически рассуждая, полное выздоровление, хотя бы и после нескольких приступов ИКБ, должно сопровождаться полной и окончательной элиминацией боррелий из организма. В наших экспериментах даже в самых «бактерицидных» образцах сыворотки переболевших сохраняется некоторое количество жизнеспособных, подвижных боррелий. Можно сформулировать ряд объяснений этому факту. Во-первых, у всех наших больных выздоровление было достигнуто путем ранней антибиотикотерапии. Возможно, при этом продукция достаточного количества антител не запускается. Во-вторых, «бактерицидное» действие сыворотки может быть крайне узкоспецифичным, то есть 100% эффект будет достигаться только против штамма, вызвавшего заболевание, или «очень похожих» изолятов, а не против лабораторных штаммов HT31 и LB-2001. Предварительные опыты с клиническими изолятами *B. miyamotoi*, которые удалось получить [7, 16], свидетельствуют в пользу этого предположения. В-третьих, следует ожидать синэргичного действия защитных сил организма против генерализованной инфекции ИКБ-БМ: в элиминации *B. miyamotoi* могут принимать участие не только антитела и СК, но и фагоциты крови, резидентные макрофаги, дендритные клетки. В любом случае, исследование взаимодействия различных компонентов иммунной системы с *B. miyamotoi* должно быть продолжено и расширено в контексте патогенеза этой новой, практически неизученной инфекции.

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Багаутдинова Л.И., Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Стуколова О.В., Шипулин Г.А., Малеев В.В., Дударев М.В. Катамнез больных иксодовыми клещевыми боррелиозами, вызванными *Borrelia miyamotoi* или *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Терапевтический архив. 2016, 88 (11): 43-54.
2. Карань Л.С., Колясникова Н.М., Махнева Н.А. Топоркова М.Г., Надеждина М.В., Есаулкова А.Ю., Романенко В.В., Арумова Е.А., Платонов А.Е., Малеев В.В. Применение ПЦР в режиме реального времени для диагностики различных клещевых инфекций. Журн. микробиол. 2010, 3: 72-77.
3. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М., Издательство РАМН, 2000.
4. Платонов А.Е., Малеев В.В., Карань Л.С. Боррелиозные возвратные лихорадки: забытые и новые. Терапевтический архив. 2010, 82 (11): 74-80.
5. Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Малеев В.В. Применение метода «дерева решений» для

- построения алгоритма дифференциальной диагностики природно-очаговых инфекций. *Терапевтический архив*. 2013, 85 (11): 21-26.
6. Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Карань Л.С., Шипулин Г.А., Гордыгина Е.В., Малинин О.В., Малеев В.В. Состояние системы свертывания крови и микроциркуляторные нарушения при иксодовом клещевом боррелиозе, вызванном *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2015, 87 (11): 26-32.
  7. Платонов А.Е., Koetsveld J., Колясникова Н.М., Сарксян Д.С., Топоркова М.Г., Шипулин Г.А., Novius J.W. Микробиологическое подтверждение этиологии «иксодового клещевого боррелиоза в безэритемной форме» — инфекции, вызываемой *Borrelia miyamotoi*. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017, 92 (1): 29-35.
  8. Сарксян Д.С., Платонов А.Е., Карань Л.С., Малинин И.Е., Халитова Л.И., Шахов В.И., Дударев М.В., Малинин О.В., Малеев В.В. Клинические особенности «нового» клещевого боррелиоза, вызываемого *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2012, 84 (11): 34-41.
  9. Сарксян Д.С., Малеев В.В., Платонов А.Е., Платонова О.В., Карань Л.С. Рецидивирующее (возвратное) течение заболевания, вызванного *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2015, 87 (11): 18-25.
  10. Стуколова О.А., Колясникова Н.М., Сарксян Д.С., Топоркова М.Г., Koetsveld J., Карань Л.С., Черкашина А.С., Маркелов М.Л., Долгова А.С., Novius J.W., Шипулин Г.А., Платонов А.Е. Разработка и использование планарного белкового биочипа для серологической диагностики клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*. В: *Молекулярная диагностика 2017*. Под ред. Покровского В.И. Тамбов, ООО фирма «Юлис», 2017, 2: 151-152.
  11. Barbour A.G. Multiple and diverse vsp and vlp sequences in *Borrelia miyamotoi*, a hard tick-borne zoonotic pathogen. *PLoS One*. 2016, 11 (1): e0146283.
  12. Colombo M.J., Alugupalli K.R. Complement factor H-binding protein, a putative virulence determinant of *Borrelia hermsii*, is an antigenic target for protective B1b lymphocytes. *J. Immunol*. 2008, 180 (7): 4858-4864.
  13. Gugliotta J.L., Goethert H.K., Berardi V.P., Telford S.R. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *New Engl. J. Med*. 2013, 368 (3): 240-245.
  14. Novius J.W., de Wèver B., Sohne M. et al. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet*. 2013, 382 (9892): 658.
  15. Koetsveld J., Draga R.O.P., Wagemakers A. et al. In vitro susceptibility of the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2017, Jul 3. doi: 10.1128/AAC.00535-17.
  16. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A. et al. Development and optimization of an in vitro cultivation protocol allows for isolation of *Borrelia miyamotoi* from patients with hard tick-borne relapsing fever. *Clin. Microbiol. Infect*. 2017, 23 (7): 480-484.
  17. Krause P.J., Fish D., Narasimhan S., Barbour A.G. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clin. Microbiol. Infect*. 2015, 21 (7): 631-639.
  18. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M. et al. Humans infected with the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis*. 2011, 17 (10): 1816-1822.
  19. Rottgerding F., Wagemakers A., Koetsveld J. et al. Immune evasion of *Borrelia miyamotoi*: CbiA, a novel outer surface protein exhibiting complement binding and inactivating properties. *Sci. Rep*. 2017, 7 (1): 303.
  20. Schott M., Grosskinsky S., Brenner C. et al. Molecular characterization of the interaction of *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* with human complement regulators. *Infect. Immun*. 2010, 78 (5): 2199-2208.
  21. Stone B.L., Brissette C.A. Host immune evasion by Lyme and relapsing fever *Borreliae*: findings to lead future studies for *Borrelia miyamotoi*. *Front. Immunol*. 2017, 8: 12.
  22. Teegler A., Herzberger P., Margos G. et al. The relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* resists complement-mediated killing by human serum. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014, 5 (6): 898-901.
  23. Tsao J.I. Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Vet. Res*. 2009, 40 (2): 36.

24. Wagemakers A., Koetsveld J., Narasimhan S. et al. Variable major proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J. Immunol.* 2016, 196 (10): 4185-4195.
25. Wagemakers A., Oei A., Fikrig M.M. et al. The relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* is cultivable in a modified Kelly-Pettenkofer medium, and is resistant to human complement. *Parasit. Vectors* 2014, 7: 418.
26. Wagemakers A., Staarink P.J., Sprong H., Novius J.W. *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol.* 2015, 31 (6): 260-269.

Поступила 21.08.17

Контактная информация: Платонов Александр Евгеньевич, д.б.н., проф.,  
111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а, р.т. (495) 976-96-46

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Г.Т.Урядова, Е.А.Горельникова, Н.А.Фокина, А.С.Долмашкина, Л.В.Карпунина*

## **ВЛИЯНИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ НА СИНТЕЗ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ МАКРОФАГАМИ МЫШЕЙ ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

*Цель.* Изучение влияния экзополисахаридов (ЭПС) молочнокислых кокков на цитокиновую активность макрофагов мышей при фагоцитозе *in vitro* *Staphylococcus aureus* 209-Р. *Материалы и методы.* В работе использовали ЭПС *Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus lactis* B-1662. На 1, 3, 5 и 7 выделяли альвеолярные (АМФ) и перитонеальные (ПМФ) макрофаги и моделировали процесс фагоцитоза *in vitro*. Через 30 минут, 1, 6 и 24 часа определяли содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$ . *Результаты.* ЭПС оказывали неоднородное влияние на продукцию цитокинов. Наибольшее действие на синтез ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$  оказывал ЭПС *S. thermophilus*. *Заключение.* Результаты исследований позволяют говорить о возможности использования ЭПС *S. thermophilus* в качестве профилактического иммуностимулятора для коррекции цитокинового статуса животных.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 67—71

Ключевые слова: экзополисахариды, цитокины, фагоцитоз, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* B-1662

*Г.Т.Урядова, Е.А.Горельникова, Н.А.Фокина, А.С.Долмашкина, Л.В.Карпунина*

## **EFFECT OF EXOPOLISACCHARIDES OF LACTIC ACID BACTERIA ON THE SYNTHESIS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES BY MACROPHAGIC MICE IN PHAGOCYTOSIS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Vavilov State Agrarian University, Saratov, Russia

*Aim.* Study of the effect of exopolysaccharides (EPS) of lactic acid cocci on cytokine activity of macrophages of mice with phagocytosis *in vitro* *Staphylococcus aureus* 209-Р. *Materials and methods.* The EPS of *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis* B-1662 was used in the work. At 1, 3, 5 and 7, AMP and PMP were isolated and the phagocytosis process was modeled *in vitro*. After 30 minutes, 1, 6 and 24 hours, the content of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  was determined. *Results.* EPSs had an ambiguous effect on the production of cytokines. The greatest effect on the synthesis was provided by EPS of *S. thermophilus*. *Conclusion.* The results of the study allow us to talk about the possibility of using EPS of *S. thermophilus* as a preventive immunomodulator for correction of the cytokine status of animals.

Key words: exopolysaccharides, cytokines, phagocytosis, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* B-1662

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы большое внимание уделяется изучению роли экзополисахаридов в организме человека и животных. Известно, что ЭПС таких молочнокислых бактерий, как *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *L. rhamnosus*, *L. kefiranofaciens* обладают иммуностимулирующим эффектом [2, 4, 7 — 12]. Биополимеры этих бактерий способны повышать продукцию иммунокомпетентными клетками провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1 $\alpha$  (ИЛ-1 $\alpha$ ) и фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), играющих важную роль в активации макрофагов и лимфоцитов.

В настоящей работе было изучено влияние экзополисахаридов *Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus lactis* B-1662 на цитокиновый статус лабораторных мышей при фагоцитозе *in vitro* *Staphylococcus aureus* 209-P.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ранее выделенные нами ЭПС из *S. thermophilus* и *L. lactis* B-1662 [5, 6]. Культура *S. thermophilus* была получена из Всероссийского НИИ молочной промышленности, Москва, *L. lactis* B-1662 — из Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Пушкино-на-Оке.

Экзополисахариды в концентрации 0,06 г/мл вводили по 0,2 мл внутрибрюшинно беспородным мышам-самцам массой 18 — 20 г возрастом 2 — 3 месяца. Концентрация была подобрана из расчета предельно допустимой дозы ЭПС (0,06%) для организма животных [1]. Альвеолярные (АМФ) и перитонеальные (ПМФ) макрофаги выделяли из легких и брюшной полости по общепринятой методике [3] на 1, 3, 5 и 7 сутки после введения экзополисахаридов. В качестве объекта фагоцитоза использовали суточную культуру *S. aureus* 209-P, полученную из музея кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И.Разумовского. Провоспалительные цитокины ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$ , продуцируемые макрофагами в процессе фагоцитоза, определяли с помощью иммуноферментных моноклональных тест-систем (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург). Результаты учитывали на микропланшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при 450 нм. По значениям оптической плотности стандартных образцов строили калибровочные кривые и с учетом оптической плотности образцов определяли концентрации цитокинов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В процессе исследований было показано, что изучаемые ЭПС способны индуцировать провоспалительные цитокины ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$ , но характер воздействия оказался различен. Так, альвеолярные макрофаги под действием экзополисахарида *S. thermophilus* были наиболее активны в продуцировании ИЛ-1 $\alpha$  через 24 ч на 1 и 7 сутки процесса фагоцитоза, что в обоих случаях в 1,4 раза больше контрольных значений (табл. 1). Аналогичную тенденцию к повышению продукции ИЛ-1 $\alpha$  наблюдали в отношении перитонеальных макро-

фагов на 5 и 7 сутки эксперимента. Продукция ПМФ ИЛ-1 $\alpha$  под действием ЭПС *S. thermophilus* через 24 ч фагоцитоза была выше контрольных значений в 3,3 и 1,3 раза для 5 и 7 суток соответственно (табл. 1).

В отношении ФНО- $\alpha$  альвеолярные макрофаги были наиболее активны на 1, 3 и 5 сутки: значения отличались от контрольных в 1,4 раза для 1 и 5 суток и в 1,2 раза для 3 суток (на протяжении всего эксперимента наблюдали последовательное увеличение содержания цитокина в крови). Перитонеальные макрофаги были активны в синтезе ФНО- $\alpha$  на 1 и 5 сутки эксперимента: к 24 ч концентрация цитокина была больше контрольных значений в 2,1 и 1,3 раза соответственно (табл. 1).

При изучении влияния ЭПС *L. lactis* В-1662 на продукцию ИЛ-1 $\alpha$  было показано неоднозначное его влияние на различные макрофаги. Так, в отношении АМФ не было замечено увеличения продукции ИЛ-1 $\alpha$  под влиянием ЭПС лактококка. Однако перитонеальные макрофаги к 24 ч продуцировали ИЛ-1 $\alpha$  больше контрольных в 2,1 и 7,75 раза на 1 и 7 сутки соответственно (табл. 2).

При изучении влияния ЭПС *L. lactis* В-1662 на продукцию ФНО- $\alpha$  макро-

Таблица 1. Влияние экзополисахарида *S. thermophilus* на синтез ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$  макрофагами мышей при фагоцитозе *in vitro* *S. aureus* 209-Р

Макрофаги		Время процесса фагоцитоза			
		30 мин	1 ч	6 ч	24 ч
Содержание ИЛ-1 $\alpha$ , нг/мл					
Контроль	АМФ	54,30 $\pm$ 0,12	84,30 $\pm$ 0,14	54,30 $\pm$ 0,12	558,00 $\pm$ 0,13
	ПМФ	51,30 $\pm$ 0,12	57,30 $\pm$ 0,11	53,30 $\pm$ 0,13	100,00 $\pm$ 0,15
1 сутки					
	АМФ	51,30 $\pm$ 0,22*	44,80 $\pm$ 0,12	40,30 $\pm$ 0,24*	782,00 $\pm$ 0,11
	ПМФ	96,80 $\pm$ 0,12	53,80 $\pm$ 0,21*	55,30 $\pm$ 0,31*	84,80 $\pm$ 0,12
3 сутки					
	АМФ	76,30 $\pm$ 0,12	106,30 $\pm$ 0,15	180,80 $\pm$ 0,22*	211,80 $\pm$ 0,17
	ПМФ	65,30 $\pm$ 0,13	115,30 $\pm$ 0,20	79,30 $\pm$ 0,21*	74,30 $\pm$ 0,13
Опыт	5 сутки				
	АМФ	82,80 $\pm$ 0,15	89,30 $\pm$ 0,21	84,80 $\pm$ 0,12	121,80 $\pm$ 0,23*
	ПМФ	120,30 $\pm$ 0,17	134,30 $\pm$ 0,31*	111,80 $\pm$ 0,12	328,30 $\pm$ 0,28*
7 сутки					
	АМФ	94,30 $\pm$ 0,22*	97,30 $\pm$ 0,25*	118,30 $\pm$ 0,17*	771,80 $\pm$ 0,18*
	ПМФ	154,30 $\pm$ 0,20*	133,80 $\pm$ 0,21*	143,30 $\pm$ 0,42*	133,30 $\pm$ 0,22*
Содержание ФНО- $\alpha$ , нг/мл					
Контроль	АМФ	1,24 $\pm$ 0,22	1,32 $\pm$ 0,12	1,35 $\pm$ 0,17	1,60 $\pm$ 0,23
	ПМФ	1,20 $\pm$ 0,28	1,45 $\pm$ 0,23	2,30 $\pm$ 0,32	1,42 $\pm$ 0,15
1 сутки					
	АМФ	1,48 $\pm$ 0,22	1,45 $\pm$ 0,12	1,80 $\pm$ 0,28	2,21 $\pm$ 0,30*
	ПМФ	1,27 $\pm$ 0,27	1,55 $\pm$ 0,18	2,80 $\pm$ 0,23	3,00 $\pm$ 0,27*
3 сутки					
	АМФ	1,48 $\pm$ 0,15	1,51 $\pm$ 0,18	2,00 $\pm$ 0,20	1,79 $\pm$ 0,28*
	ПМФ	1,48 $\pm$ 0,27	1,50 $\pm$ 0,22	1,43 $\pm$ 0,12	1,79 $\pm$ 0,17
Опыт	5 сутки				
	АМФ	2,19 $\pm$ 0,18	1,52 $\pm$ 0,30	1,50 $\pm$ 0,17	1,48 $\pm$ 0,22
	ПМФ	1,70 $\pm$ 0,17	1,85 $\pm$ 0,18	2,26 $\pm$ 0,25	1,94 $\pm$ 0,13
7 сутки					
	АМФ	1,50 $\pm$ 0,21	1,50 $\pm$ 0,17	1,58 $\pm$ 0,28*	1,65 $\pm$ 0,21
	ПМФ	1,34 $\pm$ 0,20	1,39 $\pm$ 0,15	1,32 $\pm$ 0,31*	1,60 $\pm$ 0,25

Примечание: \* Достоверные различия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

Таблица 2. Влияние экзополисахарида *L. lactis* В-1662 на синтез ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$  макрофагами мышей при фагоцитозе *S. aureus* 209-Р

Макрофаги		Время процесса фагоцитоза			
		30 мин	1 ч	6 ч	24 ч
Содержание ИЛ-1 $\alpha$ , нг/мл					
Контроль	АМФ	54,30 $\pm$ 0,12	84,30 $\pm$ 0,14	54,30 $\pm$ 0,12	558,00 $\pm$ 0,13
	ПМФ	51,30 $\pm$ 0,12	57,30 $\pm$ 0,11	53,30 $\pm$ 0,13	100,00 $\pm$ 0,15
1 сутки					
	АМФ	120,80 $\pm$ 0,11	119,30 $\pm$ 0,17	77,30 $\pm$ 0,20*	131,30 $\pm$ 0,15*
	ПМФ	107,30 $\pm$ 0,12	169,30 $\pm$ 0,25*	146,80 $\pm$ 0,21*	150,00 $\pm$ 0,25*
3 сутки					
	АМФ	80,30 $\pm$ 0,13	60,30 $\pm$ 0,32*	47,80 $\pm$ 0,12*	59,80 $\pm$ 0,19*
	ПМФ	98,30 $\pm$ 0,12	66,80 $\pm$ 0,18*	87,30 $\pm$ 0,21*	114,80 $\pm$ 0,23*
Опыт	5 сутки				
	АМФ	97,30 $\pm$ 0,27*	79,80 $\pm$ 0,17	50,80 $\pm$ 0,11*	51,80 $\pm$ 0,13
	ПМФ	58,30 $\pm$ 0,25*	89,30 $\pm$ 0,21	52,80 $\pm$ 0,25*	57,80 $\pm$ 0,18
7 сутки					
	АМФ	65,80 $\pm$ 0,21*	94,80 $\pm$ 0,13	110,30 $\pm$ 0,16*	150,80 $\pm$ 0,15*
	ПМФ	53,80 $\pm$ 0,20	64,30 $\pm$ 0,17	46,80 $\pm$ 0,22*	775,80 $\pm$ 0,31*
Содержание ФНО- $\alpha$ , нг/мл					
Контроль	АМФ	1,24 $\pm$ 0,22	1,32 $\pm$ 0,12	1,35 $\pm$ 0,17	1,60 $\pm$ 0,23
	ПМФ	1,20 $\pm$ 0,28	1,45 $\pm$ 0,23	2,30 $\pm$ 0,32	1,42 $\pm$ 0,15
1 сутки					
	АМФ	1,37 $\pm$ 0,12	1,29 $\pm$ 0,13	1,39 $\pm$ 0,28	2,20 $\pm$ 0,11
	ПМФ	1,34 $\pm$ 0,11	1,50 $\pm$ 0,18	1,37 $\pm$ 0,16	1,40 $\pm$ 0,18
3 сутки					
	АМФ	1,30 $\pm$ 0,22	1,37 $\pm$ 0,32*	1,51 $\pm$ 0,15	2,40 $\pm$ 0,21*
	ПМФ	1,50 $\pm$ 0,20	1,35 $\pm$ 0,18*	1,50 $\pm$ 0,21	1,69 $\pm$ 0,17*
Опыт	5 сутки				
	АМФ	1,45 $\pm$ 0,15*	1,37 $\pm$ 0,21*	1,47 $\pm$ 0,17	1,39 $\pm$ 0,11
	ПМФ	1,58 $\pm$ 0,12*	1,45 $\pm$ 0,17*	1,43 $\pm$ 0,18	1,40 $\pm$ 0,21
7 сутки					
	АМФ	1,50 $\pm$ 0,23	1,40 $\pm$ 0,13	1,42 $\pm$ 0,21*	1,57 $\pm$ 0,17
	ПМФ	1,40 $\pm$ 0,15	1,44 $\pm$ 0,27	1,60 $\pm$ 0,25*	1,58 $\pm$ 0,15

Примечание: \* Достоверные различия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

фагами более активны в отношении синтеза данного цитокина были АМФ на 1 и 3 сутки эксперимента — к 24 часам опытное значение превышало контрольное в 1,4 и 1,5 раза соответственно. Перитонеальные макрофаги, выделенные от мышей, которым вводили ЭПС *L. lactis* В-1662, во все сроки исследования не были активны в продукции ФНО- $\alpha$  (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Из данных литературы известно, что ЭПС, синтезированные молочнокислыми бактериями, составляющими основу слизистой оболочки кишечника, способны поддерживать гомеостаз кишечника, влиять на систему иммунитета через цитокины, синтезируя их в кровь, т.е. регулировать защитный иммунитет [12]. Полисахариды, синтезируемые бактериями рода *Lactobacillus*, обладают иммуностимулирующим эффектом и активацией макрофагов и лимфоцитов [7, 8, 10, 11], иммуномодулирующими свойствами в отношении спленоцитов мышей за счет стимуляции выработки макрофагами ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-12, ИФ- $\gamma$  [9].

В настоящем исследовании нами было показано, что ЭПС *S. thermophilus* и *L. lactis* В-1662 оказывают влияние на продукцию цитокинов макрофагами в процессе фагоцитоза *in vitro*. При моделировании процесса фагоцитоза ЭПС термофильного стрептококка, по сравнению с ЭПС *L. lactis* В-1662, оказывал более выраженное воздействие на синтез провоспалительных цитокинов, в особенности ФНО- $\alpha$ . Представленные результаты коррелируют с полученными нами ранее данными [2, 4], согласно которым ЭПС других молочнокислых бактерий — *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* В-1596, *L. delbrueckii* В-1936 и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* способствуют синтезу ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$  перитонеальными и альвеолярными макрофагами в процессе фагоцитоза бактерий [2, 4].

Таким образом, на основании полученных результатов можно говорить о возможном участии экзополисахаридов *S. thermophilus* и *L. lactis* В-1662 в регуляции цитокинового статуса в организме животных при фагоцитозе *S. aureus* 209-Р.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Булдаков А.С. Пищевые добавки. СПб: УТ, 1996.
2. Горельникова Е.А., Карпунина Л.В. Действие экзополисахаридов лактобацилл на фагоцитарную и цитокиновую активность *in vitro* и в организме животных при моделировании инфекционного процесса. Журн. микробиол. 2015, 5: 44-50.
3. Кондратьева И.А., Воробьева И.В., Буракова О.В. Практикум по иммунологии. М.: Издательство Московского университета, 2001.
4. Правдивцева М.И., Горельникова Е.А., Карпунина Л.В. Влияние экзополисахаридов лактобацилл на синтез ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$  макрофагами мышей при фагоцитозе *Staphylococcus aureus*. Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. 2011, 4: 14-16.
5. Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В. Выделение экзополисахарида из *Lactococcus lactis* при различных условиях культивирования. Аграрный научный журнал. 2016, 12: 40-42.
6. Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В. Физико-химические свойства экзополисахарида *Lactococcus lactis*. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2017, 2 (19): 74-77.
7. Arai K.I., Lee F., Miyajima A. et al. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. Annual. Rev. Biochem. 1990, 59: 783-836.
8. Benjamini E., Sunshine G., Leskowitz S. Immunology, a short course. WILEY-LISS, New York, 1996, p. 451-453.
9. Chabot S., Yu H. et al. Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- $\gamma$  in mouse splenocytes. Lait. 2001, 81: 683-697.
10. Kitazawa H., Nishimura J., Harata T., Itoh T. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Int. J. Food Microbiol. 1998, 40: 169-175.
11. Kitazawa H., Ishii Y., Uemura J. et al. Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Food Microbiology. 2000, 17: 109-118.
12. Vinderola G., Perdigon G., Duarte J. et al. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. Cytokine. 2006, 36: 254-260.

Поступила 17.07.17

Контактная информация: Урядова Галина Тимофеевна,  
410012, Саратов, Театральная пл., 1, р.т. (8452)23-32-92

*О.В.Васильева, А.С.Волынкина, И.В.Кузнецова, С.В.Писаренко, А.Н.Куличенко*

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА SHIGELLA SONNEI-2013, ВЫДЕЛЕННОГО ПРИ ВСПЫШКЕ ДИЗЕНТЕРИИ В РЕСПУБЛИКЕ АБХАЗИЯ В 2013 ГОДУ**

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Изучить молекулярно-генетические свойства штамма *Shigella sonnei*-2013, выделенного во время вспышки дизентерии в Республике Абхазия в 2013 г. *Материалы и методы.* Генетическое типирование исследуемого штамма осуществляли методом мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). Анализировали нуклеотидные последовательности фрагментов 7 консервативных генов «домашнего хозяйства» *adk*, *fumC*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*, *gyrB*. Секвенированные фрагменты ДНК сравнивали с референсными последовательностями из базы данных *Escherichia coli* MLST. Филогенетический анализ проводили с помощью метода UPGMA и компьютерной программы START 2. Полногеномное секвенирование выполняли на генетическом анализаторе Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM™) с использованием фрагментных библиотек (shot-gun). Картирование ридов проводили в программе GS Reference Mapper. *Результаты.* Определен сиквенс-тип исследуемого штамма — ST-152, являющийся одним из распространенных генотипов для *S. sonnei*. Показана высокая степень сходства полученных контигов с последовательностью хромосомы и плазмид А, В, С и Е штаммов *S. sonnei* 53G и *S. sonnei* Ss046. Выявлены контиги с высоким процентом сходства с последовательностью плазмиды вирулентности pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30). В геноме штамма *S. sonnei*-2013 обнаружены нуклеотидные последовательности 136 генов, расположенных на плазмиде pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30). Обнаружены гены, контролирующие биосинтез пилей IV типа, участвующих в адгезии к абиотическим поверхностям и формировании биопленки. *Заключение.* Выявлены структурные особенности штамма, обусловленные наличием фрагментов плазмиды вирулентности pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30).

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 72—76

Ключевые слова: дизентерия, *S. sonnei*, MLST-генотипирование, полногеномное секвенирование

*O.V.Vasileva, A.S.Volynkina, I.V.Kuznetsova, S.V.Pisarenko, A.N.Kulichenko*

## **MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF SHIGELLA SONNEI-2013 STRAIN ISOLATED DURING THE OUTBREAK IN DYSENTERY IN THE REPUBLIC ABKHAZIA IN 2013**

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Study of molecular-genetic properties of *Shigella sonnei*-2013 strain isolated during the outbreak in dysentery in the republic Abkhazia in 2013. *Materials and methods.* Genetic typing of the tested strains using multilocus sequence typing (MLST). Analyzed of nucleotide sequence fragments 7 of conservative «housekeeping» genes *adk*, *fumC*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*, *gyrB*. Sequenced of DNA fragments compared with reference sequences from database of *Escherichia coli* MLST. Phylogenetic analysis was performed using UPGMA method and computer program START 2. Whole-genome sequencing performed on a genetic analyzer Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM™) using fragment libraries (shot-gun). Aligning reads have been carried out with the program GS Reference Mapper. *Results.* Defined sequence — type of the studied strain — ST-152, one of the most common genotypes for *S. sonnei*. Demonstrated the high degree of similarity obtained contig to the sequences of the chromosome and plasmids А, В, С и Е strains *S. sonnei* 53G and *S. sonnei* Ss046. Identified contigs with a high percentage similarity to the sequence of virulence plasmid pO26-Vir of *E. coli* O26:H11 (H30). In the genomic *S. sonnei*-2013 revealed nucleotide sequence of 136 genes were found located on the pO26-Vir strain of *E. coli*

O26:H11 (H30). Discovered genes controlling biosynthesis of type IV pili involved in adhesion to abiotic surfaces and biofilm formation. *Conclusion.* Identified structural peculiarities of strain induced by fragments of virulence plasmid pO26-Vir strain *E. coli* O26:H11 (H30).

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.1, P. 72—76

Key words: dysentery, *S. sonnei*, MLST genotyping, whole-genome sequencing

## ВВЕДЕНИЕ

В конце ноября 2013 г. в г. Ткуарчал была зафиксирована вспышка кишечной инфекции. Всего с 24.11.2013 г. по 20.12.2013 г. зарегистрировано 1260 больных, в том числе 390 детей в возрасте до 14 лет и 870 взрослых. Причиной вспышки было бактериальное загрязнение водозабора на р. Геджирке, являющейся источником питьевого водоснабжения для города. Результаты лабораторных исследований показали, что этиологическим фактором заболевания явилась *Shigella sonnei*. Особенностью вспышки была реализация водного пути передачи инфекции, как правило, не являющегося основным для *S. sonnei*.

Цель работы — изучить молекулярно-генетические свойства штамма *Shigella sonnei*-2013, выделенного во время вспышки дизентерии в Республике Абхазия в 2013 г.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

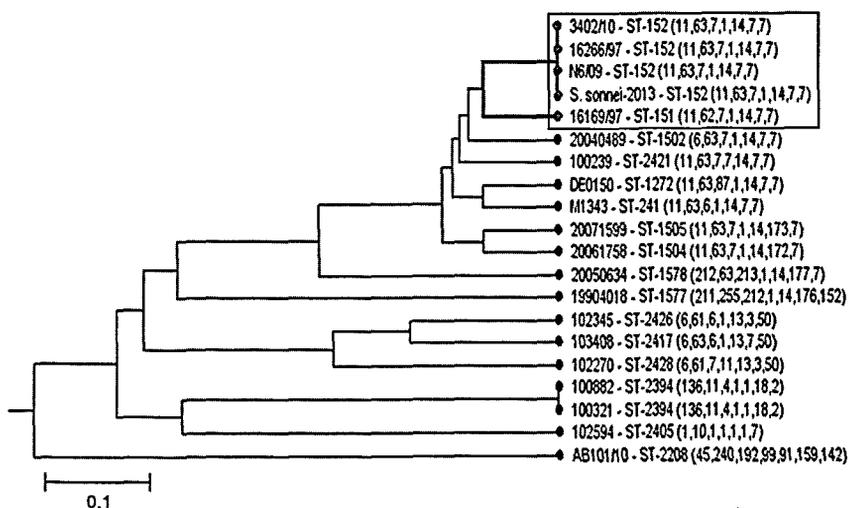
Выделение и исследование возбудителя шигеллеза проводили в соответствии с [2], определение чувствительности выделенных штаммов шигелл к антибактериальным препаратам — в соответствии с [1].

Генетическое типирование исследуемого штамма осуществляли методом мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). Анализировали нуклеотидные последовательности фрагментов 7 консервативных генов «домашнего хозяйства»: *adk* — adenylate kinase, *fumC* — fumarate hydratase, *gyrB* — DNA gyrase, *icd* — isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase, *mdh* — malate dehydrogenase, *purA* — adenylosuccinate dehydrogenase, *recA* — ATP/GTP binding motif. Секвенированные фрагменты ДНК сравнивали с референсными значениями из базы данных *E. coli* MLST, доступной на сайте <http://mlst.ucc.ie>, и использовали для проведения филогенетического анализа.

Полногеномное секвенирование выполняли на генетическом анализаторе Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM™) с использованием соответствующих фрагментных библиотек (shot-gun). Выделение ДНК штаммов для получения геномных библиотек проводили с использованием набора для выделения геномной ДНК бактерий ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit («Invitrogen», США) в соответствии с протоколом производителя. При сборке контигов (фрагментов геномной последовательности) и определении их взаимного расположения использовали программу Newbler Assembler 2.9 (454 Life Science).

Достоверность наличия целевого фрагмента в геноме оценивали, анализируя специфичность картирования ридов на референсную последовательность плазмиды вирулентности pO26-Vir штамма *E. coli* O26, депонированную в базе данных NCBI (FJ 386569).

Специфичным считали картирование, при котором наблюдается равномерное покрытие ридами более 90% референсной последовательности. При



Дендрограмма филогенетического родства штамма *S. sonnei*-2013.

этом различия консенсусной и референсной нуклеотидных последовательностей генов-мишеней не должны превышать 3%. Картирование ридов проводили в программе GS Reference Mapper.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Этиологическим агентом эпидемической вспышки ОКИ в г. Ткуарчал была *S. sonnei* (штамм *S. sonnei*-2013) с типичными морфологическими и биохимическими свойствами.

Изоляты *S. sonnei*-2013 чувствительны к антибактериальным препаратам: левомицетину, ципрофлоксацину, ломефлоксацину, цефотаксиму, цефтриаксону, фуразолидону и дизентерийному бактериофагу.

Проведено мультилокусное сиквенс-типирование исследуемого штамма. Установлены аллельные типы исследуемых генов: *adk* — 11, *fumC* — 63, *icd* — 7, *mdh* — 14, *purA* — 7, *recA* — 7, *gyrB* — 7, нуклеотидные замены на исследуемых локусах не выявлены. В результате анализа определен сиквенс-тип исследуемого штамма — ST-152, один из распространенных генотипов для *S. sonnei* [3]. Штаммы с ST-152 были выделены в Германии в 2009 г. и в Китае в 2009 — 2010 гг. Данные о российских штаммах шигелл в базе данных *E. coli* MLST отсутствуют. В соответствии с полученными сведениями, с помощью метода UPGMA и компьютерной программы START 2 построена дендрограмма, отображающая степень филогенетического родства штаммов рода *Shigella* (рис.).

Геном исследованного штамма *S. sonnei*-2013 представлен 410 контигами общим размером 4 471 773 п.н. Сравнение контигов с базой нуклетидных последовательностей NT проводили с помощью ресурса BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Анализ показал высокую степень сходства (99%) полученных контигов с последовательностью хромосомы и плазмид А, В, С и Е штаммов *S. sonnei* 53G и *S. sonnei* Ss046. Однако были выявлены контиги с высоким процентом сходства с последовательностью плазмиды вирулентности pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30).

*E. coli* O26:H11 штамм H30 впервые описан в 1977 году Konowalchuk J. et al. [6] и отнесен к шига-токсинпродуцирующим штаммам (STEC), являющим-

ся актуальной проблемой общественного здравоохранения во многих странах мира. Штаммы группы STEC могут вызывать заболевания с различными клиническими проявлениями: от колита и гемоколита без внекишечных осложнений до «геморрагического» колита с развитием гемолитико-уремического синдрома [4, 7, 10].

Штамм *E. coli* O26:H11 (H30) содержит 6 плазмид, наибольшая из них — pO26-Vir размером 168 kb включает 196 генов, ряд транспозонов и вставочных элементов. Плазида состоит из двух регионов. Первый включает гены вирулентности, второй — гены переноса и гены, регулирующие биосинтез пилей IV типа. Вирулентный регион плазмиды pO26-Vir включает ген *toxВ*, ген серин-протеазы *espP*, каталазы-пероксидазы *katP* и кластер гемолизина (*hlyA-D*). Регион, содержащий гены переноса, состоит из генов *traL-traV* протяженностью 111,774 — 134,889 bp [9]. Регион, контролирующий биосинтез пилей IV типа, состоит из 10 тесно связанных между собой генов (*pilL-pilV*) [8].

С целью выявления генов плазмиды pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30) в геноме штамма *S. sonnei*-2013 проведено картирование ридов на специфичные нуклеотидные последовательности генов плазмиды pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30).

В геноме штамма *S. sonnei*-2013 обнаружены нуклеотидные последовательности 136 генов, расположенных на плазмиде pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30), из них 74 с предполагаемыми функциями и 62 с известными. К последним относятся 14 генов, расположенных в *tra* кластере (гены переноса *traL-traW*) и 10 генов, регулирующих биосинтез пилей IV типа (*pilL-pilV*) (табл.), и 38 генов, отвечающих за репликацию, транскрипцию, трансляцию, конъюгацию, стабилизацию плазмиды и другие функции. Покрытие всех выявленных локусов ридами является специфичным, риды картировались на 100 % длины референсных последовательностей генов-мишеней.

Следует отметить, что в геноме *S. sonnei*-2013 отсутствуют гены *toxВ*, *espP*, *katP*, *hlyA-D*, входящие в вирулентный регион плазмиды pO26-Vir, но имеются гены, регулирующие биосинтез пилей IV типа (*pilL-pilV*). Пили IV типа присутствуют у некоторых патогенных бактерий (энтеротоксигенных, энтеропатогенных, энтероаггративных *E. coli*) и являются одним из факторов патогенности, обеспечивающим прикрепление к клеткам кишечного эпителия. Пили IV участвуют в адгезии к абиотическим поверхностям и формировании биопленки [5].

Анализ результатов секвенирования показал высокую степень сходства нуклеотидной последовательности хромосомной ДНК с последовательностями ранее секвенированных штаммов, опубликованными в базе данных GeneBank. В связи с этим, результаты MLST-типирования, основанного на секвенировании участков хромосомных генов, не позволили выявить значительные отли-

Гены плазмиды pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30), выявленные в геноме *S. sonnei*-2013

Наименование целевого участка	Число специфично картированных ридов	% от общего числа картированных ридов
Гены <i>Tra</i> кластера		
L, J, V, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, W	30 172	60,0
Гены, регулирующие биосинтез пилей IV типа		
<i>pilN</i>	3628	7,2
<i>pilV</i>	3505	7,0
<i>pilR</i>	2948	5,9
<i>pilO</i>	2427	4,8
<i>pilU</i>	1481	2,9
<i>pilS</i>	1468	2,9
<i>pilL</i>	1345	2,7
<i>pilT</i>	1235	2,5
<i>pilP</i>	998	2,0
<i>pilM</i>	862	1,7

чия данного штамма от ранее описанных. При анализе данных полногеномного секвенирования выявлены структурные особенности генома — наличие фрагментов плазмиды вирулентности pO26-Vir E. coli (H30), обусловивших отличительные особенности штамма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 2.4.1890-04. М., 2010.
2. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями. МУ 04-723/3. М., 1984.
3. Cao Y. et al. Multi-locus sequence typing (MLST) and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (REP-PCR), characterization of *Shigella* spp. over two decades in Tianjin China. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genetics*. 2012, 3 (4): 321-332.
4. Hiruta N., Murase T., Okamura N. An outbreak of diarrhea due to multiple antimicrobial-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 in a nursery. *Epidemiol. Infect.* 2000, 127 (127): 221-227.
5. Klausen M. et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild-type, flagella, and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* 2003, 48 (6): 1511-1524.
6. Konowalchuk J., Speirs J.I., Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1997, 18 (3): 775-779.
7. Misselwitz J. et al. Cluster of hemolytic-uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11. *Pediatr. Infect. Dis.* 2003, 22 (4): 349-354.
8. Srimanote P., Paton A.W., Paton J.C. Characterization of a novel type I pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.* 2002, 70 (60): 3094-3100.
9. Pina M. et al. The complete DNA sequence and analysis of the virulence plasmid and of five additional plasmids by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strain H30. *Intern. J. Med. Microbiol.* 2011, 301: 192-203.
10. Werber D. et al. A multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance. *J. Infect. Dis.* 2002, 186 (3): 419-422.

Поступила 05.09.17

Контактная информация: Васильева О.В.,  
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Л.В.Пузырева<sup>1</sup>, Л.А.Родькина<sup>2</sup>, А.В.Мордык<sup>1</sup>, В.Д.Конченко<sup>2</sup>, Л.М.Далабаева<sup>2</sup>

### АНАЛИЗ ИНФЕКЦИЙ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ С ИССЛЕДОВАНИЕМ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА МАТЕРИАЛА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

<sup>1</sup>Омский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>Инфекционная клиническая больница № 1, Омск

*Цель.* Изучение частоты, характеристики инфекций нижних дыхательных путей и результатов микробиологических исследований биоматериала у ВИЧ-инфицированных пациентов. *Материалы и методы.* Использовались материалы Инфекционной клинической больницы № 1 г. Омск за 5 лет (2012 — 2016). *Результаты.* Из пролеченных 1926 ВИЧ-инфицированных инфекций нижних дыхательных путей встретились у 538 пациентов. На долю бактериальных пневмоний приходилось 45,2%, летальность при которых составила 18,1%. Был проведен анализ результатов микробиологических исследований биоматериалов у ВИЧ-инфицированных пациентов. Из мокроты наиболее часто выделялись *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* и другие микроорганизмы. Частой находкой в биоматериале были *Streptococcus viridans* и грибы рода *Candida*.

**Заключение.** Полученные результаты требуют дальнейших исследований для сопоставления клинико-рентгенологических проявлений и результата микробиологического исследования биоматериалов ВИЧ-инфицированных больных.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 76—84

**Ключевые слова:** инфекции нижних дыхательных путей, микробиологическое исследование, ВИЧ-инфицированные пациенты, бактериальная пневмония, мокрота, микроорганизмы

L.V.Puzyreva<sup>1</sup>, L.A.Rodkina<sup>2</sup>, A.V.Mordyk<sup>1</sup>, V.D.Konchenko<sup>2</sup>, L.M.Dalabaeva<sup>2</sup>

## ANALYSIS OF LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTIONS WITH A RESEARCH OF A MICROBIAL LANDSCAPE OF MATERIAL AT HIV-POSITIVE PATIENTS

<sup>1</sup>Omsk State Medical University, <sup>2</sup>Infectious Hospital No. 1, Omsk, Russia

**Aim.** Study of frequency, the characteristic of lower respiratory tract infections, and results of microbiological researches of biomaterial at HIV-positive patients. **Materials and methods.** Materials of the Infectious hospital No. 1 of Omsk in 5 years (2012 — 2016) were used. **Results.** From the treated 1926 HIV-positive patients, lower respiratory tract infections occurred in 538 patients. 45,2% at which lethality was 18,1% fell to the share of bacteriemic pneumonia. The analysis of results of microbiological researches of biomaterials at HIV-positive patients was carried out. In a sputum *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* and other microorganisms was most often allocated. *Streptococcus viridans* and mushrooms of the sort *Candida* were a frequent find in biomaterial. **Conclusion.** The received results demand further researches for comparison of clinicoradiological implications and result of a microbiological research of biomaterials of HIV-positive patients.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 76—84

**Key words:** lower respiratory tract infections, microbiological research, HIV-positive patients, bacteriemic pneumonia, sputum, microorganisms

## ВВЕДЕНИЕ

Инфекции нижних дыхательных путей (ИНДП) являются основной причиной заболеваемости и смертности среди людей, живущих с вирусом иммунодефицита человека. Частота их снизилась после появления высокоактивной антиретровирусной терапии, однако у этих пациентов сохраняется крайне высокий риск развития данных инфекционных заболеваний по сравнению с общей популяцией и имеются более высокие показатели смертности [21].

Эпидемиология ВИЧ-ассоциированных легочных заболеваний является комплексной и изменяется под влиянием различных факторов, в частности, региональной распространенности возбудителей болезней, таких как туберкулез, а также доступности к услугам здравоохранения, в основном, к антиретровирусной терапии и антибактериальной профилактике [22].

На первом месте у иммунокомпromетированного населения регистрируется туберкулез органов дыхания, развитие которого зависит от уровня CD4+ лимфоцитов в крови (менее 350 кл/мкл). На втором месте по частоте инфекционной патологии респираторного тракта находятся бактериальные пневмонии, которые могут встречаться при достаточно высоком количестве CD4+ лимфоцитов (от 500 кл/мкл и ниже) [7, 9]. Основными этиологическими агентами ИНДП у ВИЧ-инфицированных больных, по мнению ряда авторов,

являются *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* [3, 16]. К редким проявлениям инфекционной патологии органов дыхания у пациентов с ВИЧ предлагают относить кандидозное, аспергиллезное, криптококковое поражения [17], а также выделение в биологическом материале *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia spp.* и др. [14]. Нередко встречаются смешанные инфекции, что усложняет своевременную постановку диагноза [3].

У пациентов с ИНДП на фоне ВИЧ-инфекции регистрируется неблагоприятный исход, несмотря на интенсивность антибактериальной терапии, что объясняется массивностью поражения, сочетанной патологией, экзогенной интоксикацией и т.д. [4, 6, 8, 10].

Изучение этиологических агентов ИНДП является важным ориентиром эмпирической терапии, оказывает существенное влияние на прогноз пациентов и требует постоянного обновления в условиях конкретной территории.

Цель работы — изучение частоты, характеристики инфекций нижних дыхательных путей, а также результатов микробиологических исследований биоматериала у ВИЧ-инфицированных пациентов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использовались данные 5 инфекционного отделения (ВИЧ-инфекции и СПИД-маркерных заболеваний) и отделения клинико-лабораторной диагностики Инфекционной клинической больницы № 1 Омска в период с 01.01.2012 по 01.01.2017 гг.

На первом этапе исследования была проанализирована структура ВИЧ-инфицированных пациентов с инфекционной патологией нижних дыхательных путей (n=526). При анализе летальных исходов группа исследования составила 313 чел. без пациентов с выявленным туберкулезом органов дыхания.

На втором этапе проведено сопоставление микробиологических исследований мокроты, бронхо-альвеолярного лаважа, плеврального экссудата у пациентов в группе исследования (n=232) с клинико-рентгенологической картиной пневмонии. Приведены данные результата мазка из зева на грибы рода *Candida*.

Критерии включения: ВИЧ-инфекция, наличие рентгенологических изменений органов дыхания или подозрение на инфекцию нижних дыхательных путей.

Поиск микобактериальной культуры первоначально проводился у всех ВИЧ-инфицированных пациентов в ИКБ № 1 при исследовании мокроты простой микроскопией с окраской по Цилю-Нильсену. Также материал направлялся на базу Клинического противотуберкулезного диспансера для проведения молекулярно-генетической диагностики (метод ПЦР для обнаружения ДНК МБТ), люминесцентной микроскопии и посева на МБТ на систему *Vastec*. При положительном результате осуществлялась консультация врача фтизиатра и перевод в специализированное медицинское учреждение.

Бактериологическое исследование материала проводилось для выделения чистой культуры возбудителей и их идентификации. Исследование начиналось с первичной микроскопии, что давало ориентировочные представления о наличии в клиническом материале различных морфологических форм микроорганизмов (кроме мазка из зева). Затем проводился первичный посев на следующие питательные среды: кровяной агар (для выделения стафилококков и стрептококков), сывороточный агар (для роста стрептококков, пневмококков и др), среду Эндо (для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*), среду

Сабуро (для выделения грибов), шоколадный агар (для выделения и культивирования патогенных бактерий). В последующем проводилось накопление чистой культуры, изучение комплекса биологических свойств полученного материала и окончательная идентификация возбудителя, согласно общепринятым алгоритмам микробиологических исследований [2].

Выполненная работа не ущемляла прав, не подвергала опасности пациентов в группе исследования. Описательная статистика результатов исследования представлена в виде процентных долей и их стандартных ошибок, которые рассчитывались по формуле: квадратный корень из  $[P \times (100 - P)] / n$ , где  $P$  — процентная доля,  $n$  — число наблюдений в группе. Количественные данные представлены в виде  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение пяти лет в условиях 5 инфекционного отделения ИКБ № 1 Омска было пролечено 1926 ВИЧ-инфицированных пациентов.

В ИКБ № 1 пациенты наиболее часто поступали либо по направлению из Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями — 449 (23,3±0,96%), либо переводом из других лечебных учреждений, при затяжном течении, трудно дифференцируемой патологии или низкоэффективном лечении — 1012 (52,5±1,14%). В иных случаях — 348 (18,1±0,88%) больных были доставлены скорой медицинской помощью в связи с ухудшением состояния. Оставшиеся 117 (6,1±0,55%) ВИЧ-инфицированных пациентов были госпитализированы при самообращении.

Из всех госпитализированных больных лиц с инфекционной патологией нижних дыхательных путей (ИНДП) было 538 (27,9±1,02%) пациентов. Наиболее часто из ИНДП регистрировалась бактериальная пневмония — 243 (45,2±2,15%). Туберкулез органов дыхания, несомненно, встречается довольно часто у ВИЧ-инфицированных больных. В нашем исследовании он был выявлен у 225 (41,8±2,13%) пациентов, что объясняется проведением дифференциальной диагностики как на догоспитальном этапе, так и в других стационарах терапевтического профиля. Подтвержденная пневмоцистная пневмония зарегистрирована у 54 (10,0±1,3%) ВИЧ-инфицированных, а ЦМВ-пневмония только у 7 (1,3±0,49%). Отсутствие ЦМВ-пневмонии в 2012 и 2013 гг. объясняется низкой информированностью, слабой диагностической и лабораторной базой в тот период времени. Кандидозная пневмония была подтверждена у 8 (1,5±0,52%), а аспергиллезное поражение легочной ткани у 1 (0,2±0,19%) ВИЧ-инфицированного пациента.

Среди ВИЧ-инфицированных пациентов с ИНДП преобладали лица мужского пола 81,6±1,67% (439), женщин было 18,4±1,67% (99). Средний возраст мужчин в группе исследования составил 37,1±7,2 лет, женщин — 31,9±3,3 лет. Средний срок от момента выявления ВИЧ-инфекции до госпитализации в стационар составил 2,8±1,3 лет.

При анализе больных ВИЧ-инфекцией были установлены следующие клинико-патогенетические варианты заболевания в соответствии с классификацией [5]. Наиболее часто ИНДП встречались у пациентов с 4Б (253; 47,0±2,15%) и 4А(198; 36,7±2,08%) стадиями ВИЧ-инфекции. Реже зарегистрированы стадии 4В — у 74 (13,8±1,48%) больных и 2В — у 13 (2,4±0,66%) ВИЧ-инфицированных. Уровень CD4+лимфоцитов в группе исследования составил 88,89±32,08 кл/мкл, а вирусная нагрузка РКН ВИЧ составляла 1 617 006±817 565,4 копий/мл крови.

В дальнейшем мы проанализировали летальные исходы у пациентов с ИНДП (n=313), исключая группу больных с верифицированным туберкулезом, которые были переведены в специализированное медицинское учреждение. Всего в течение 5 лет было зарегистрировано 70 неблагоприятных исходов у ВИЧ-инфицированных с ИНДП. У пациентов с бактериальными пневмониями отмечено 44 (18,1±2,47%) летальных исхода, у больных с пневмоцистной пневмонией — 18 (33,3±6,42%). Кандидозное поражение легочной ткани привело к смертельному исходу у 3 (37,5±17,12%) больных ВИЧ-инфекцией. Наименьшая выживаемость наблюдалась у больных с ЦМВ-пневмонией — 71,4±17,07% (5).

Летальность при бактериальных пневмониях у ВИЧ-инфицированных больных по результатам нашего исследования составила 18,107%, от пневмоцистных пневмоний — 33,33%, при ЦМВ-пневмониях — 71,43%, при кандидозном поражении легочной ткани — 37,5%. Всего летальность при ИНДП составила 22,37%.

На следующем этапе был проведен анализ микробиологического исследования мокроты и другого материала в группе пациентов с бактериальными пневмониями.

Наиболее частым методом диагностики и верификации заболеваний органов дыхания является микробиологическое исследование мокроты в виду его доступности и простоты забора материала.

Возбудителей ИНДП делят на три группы, согласно их приоритетности. К наиболее патогенным относятся *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*. Микроорганизмы среднего уровня патогенности в развитии ИНДП являются *Candida albicans*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, энтеробактерии, а низкого — *Mycoplasma pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia spp.*, *Legionella pneumophila* и ряд других микроорганизмов [12]. Также известно, что при обнаружении микроорганизмов в разведении 10<sup>5</sup> КОЕ/мл результат оценивается как контаминация мокроты. Клинически значимым числом для мокроты является 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> КОЕ/мл. Для бронхиальных смывов после бронхо-альвеолярного лаважа — 10<sup>4</sup> — 10<sup>5</sup> КОЕ/мл.

Из проанализированного 251 результата микробиологического исследования мокроты проведено в 235 случаях, бронхо-альвеолярного лаважа — в 13, плеврального экссудата — в 2 случаях.

Роста микрофлоры при исследовании мокроты не было выявлено в 38 (15,1±2,26%) образцах. У 89 (35,5±3,02%) больных в мокроте были обнаружены *Streptococcus viridans* в различных разведениях (чаще от 10<sup>6</sup>), которые, как известно, являются симбионтами микрофлоры верхних дыхательных путей. Также часто в мокроте выявлялась *S. albicans* — у 92 (39,1±3,18%) ВИЧ-инфицированных пациентов (от единичных колоний — 56 колоний до массивного роста), *S. krusei* — у 27 (11,5±2,08%) (от 10<sup>3</sup> КОЕ/мл до массивного роста), *S. glabrata* — у 4 (1,7±0,84%) (все 10<sup>5</sup> КОЕ/мл), *S. tropicalis* — у 1 (17,0±2,45%) (10<sup>4</sup> КОЕ/мл) иммунокомпрометированного больного. При проведении мазка из зева грибы рода *Candida* встречались у 139 (59,1±3,21%) больных, что объясняется развитием кандидоза ротоглотки при выраженном иммунодефицитном состоянии больных. Поэтому выделение *Streptococcus viridans* и грибов рода *Candida* не являлось абсолютным доказательством наличия ИНДП у ВИЧ-инфицированных больных.

Наиболее часто встречались комбинации *Streptococcus viridans* и гри-

бов рода *Candida* — у 51 (21,7±2,69%) больного. В некоторых случаях у 32 ВИЧ-инфицированных пациентов, несмотря на результат микробиологического исследования (наличие условно патогенной флоры), наблюдалась клинико-рентгенологическая картина пневмоний преимущественно нижнедолевой (правосторонней у 25, левосторонней у 8).

Среди патогенной флоры наиболее часто определялся рост *S. aureus* в 19

случаях (табл.). Указанный возбудитель у ВИЧ-инфицированных больных часто является проявлением сепсиса [3]. Этим же коллективом авторов отмечено, что в 30,1% случаев возбудителем ИНДП являлся *S. pneumoniae*, однако в нашем исследовании указанная флора не была выявлена ни в одном случае.

Нередко в мокроте определялась *Pseudomonas aeruginosa* (2,6±3,21%), являющаяся частой причиной заболеваний органов дыхания [1].

*Enterococcus faecalis* является представителем нормальной микрофлоры кишечника человека, который в определенных условиях вызывает различные инфекции, в том числе пневмонии и сепсис, характеризующийся высокой устойчивостью к противомикробным препаратам и 24% летальностью в течение месяца [24]. *E. faecalis* был выявлен у 5,1±1,44% ВИЧ-инфицированных пациентов с признаками ИНДП.

*Streptococcus pyogenes* является одним из основных возбудителей инфекционной патологии человека, вызывающих широкий спектр гнойных и негнойных заболеваний, например, фарингит, рожистое воспаление, сепсис, менингит, пневмонию, и особенно тяжелые проявления некротизирующего фасциита и синдрома стрептококкового токсического шока [18]. У пациентов с ВИЧ-инфекцией колонизация данного возбудителя проявляется наиболее тяжелой клинической картиной [23]. В нашем исследовании *S. pyogenes* был выделен в мокроте у 3,8±1,25% иммунокомпromетированных больных с клинико-рентгенологически подтвержденным распространенным тяжелым течением внебольничной пневмонии.

Кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань, крупная составляющая лимфоидной системы, является основным местом синтеза ВИЧ, что приводит к ее истощению, в первую очередь, CD4+ Т-клеток, т.е. CD4-экспрессирующих Т-клетки, расположенные в собственной пластинке слизистой оболочки, взаимодействующих с антигенами и микробными телами. Масштаб истощения оказывает негативное влияние на иммунную систему человека, что, по мнению многих авторов, объясняет возникновение инфекционной патологии кишечника у ВИЧ-инфицированных больных [19, 23].

В нашем исследовании клебсиеллезная пневмония была подтверждена у

Результаты микробиологического исследования мокроты у ВИЧ-инфицированных пациентов с ИНДП (n=235)

Возбудитель	Степень разведения		Частота выявления, абс (%)
	min КОЕ/мл	max КОЕ/мл	
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>8</sup>	19 (8,1±1,78)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>7</sup>	17 (7,2±1,69)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	6 (2,6±3,21)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>8</sup>	9 (3,8±1,25)
<i>Enterobacter cloacae</i>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	2 (0,9±0,6)
<i>Enterococcus faecalis</i>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	12 (5,1±1,44)
<i>Escherichia coli</i>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	7 (3,0±1,11)
<i>Salmonella enteritidis</i>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	2 (0,9±0,6)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	3 (1,3±0,73)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	2 (0,9±0,6)
<i>Cryptococcus</i> (подтвержденные ПЦР)	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	3 (1,3±0,73)
Плесневые грибы		массивный рост	2 (0,9±0,6)

7,2±1,69% больных. Выделение в мокроте *Escherichia coli* наблюдалось у 3,0±1,11%, *Enterobacter cloacae* и *Salmonella enteritidis* — у 0,9±0,6% ВИЧ-инфицированных пациентов с клиническими проявлениями ИНДП.

Стафилококки как повсеместно распространенная грамположительная кокковая флора встречаются на всем протяжении желудочно-кишечного тракта, слизистых и т.д. Несмотря на то, что *Staphylococcus epidermidis* является симбионтом микрофлоры кожи человека, он был обнаружен в мокроте у 1,3±0,73% ВИЧ-положительных пациентов в  $10^{6-7}$  КОЕ. У этих же больных в дальнейшем был установлен ангиогенный сепсис. *Staphylococcus haemolyticus* является частым возбудителем ангины, фарингитов, бронхита, пневмоний, а у детей нередко причиной сепсиса [15]. При микробиологическом исследовании мокроты *S. haemolyticus* был выделен у 0,9±0,6% ВИЧ-инфицированных пациентов в значимом разведении —  $10^7$  КОЕ.

Люди подвергаются воздействию грибов в течение всей жизни через вдыхание, пищеварения и/или травматической инокуляции грибных частиц. Подавляющее большинство этих встреч проходит бессимптомно, и меньше чем 100 из примерно 5 миллионов видов грибов могут вызывать инфекционные заболевания человека. Грибы могут либо существовать в виде сферических дрожжевых клеток (например, *Cryptococcus*) или как формы, которые образуют ветвящиеся трубчатые гифы (например, грибов *Aspergillus fumigatus*) [20].

Патогенные грибки вызывают целый ряд синдромов у иммунокомпетентных и ослабленным иммунитетом лиц с опасным для жизни заболеванием, в первую очередь, у ВИЧ-инфицированных. Дрожжеподобные грибы рода *Cryptococcus* у иммунокомпетентных лиц могут стать причиной различных оппортунистических инфекций, из которых наиболее тяжелым является криптококковый менингит [13]. Дрожжеподобные грибы рода *Cryptococcus* были выявлены в мокроте у 1,3±0,73% ВИЧ-инфицированных пациентов, которые в дальнейшем были подтверждены методом ПЦР диагностики. У этих больных был повторно выделен *C. neoformans* в крови и ликворе, что подтвердило развитие генерализованного криптококкоза, в том числе с поражением легочной ткани.

Массивный рост плесневых грибов был заподозрен у 0,9±0,6% ВИЧ-инфицированных больных. В обоих случаях было проведено серологическое исследование на антитела к грибам *Aspergillus fumigatus*, в результате которого наличие грибов подтвердилось.

В некоторых случаях встречалась ассоциация патогенных микроорганизмов в мокроте. По одному случаю были зарегистрированы сочетания *E. faecalis* и *K. pneumoniae*, *S. enteritidis* и *S. aureus*, *S. pyogenes* и *S. aureus* (0,4±0,42%).

При исследовании бронхо-альвеолярного лаважа (n=13) были верифицированы следующие микроорганизмы: *K. pneumoniae* — у 5 (38,5±13,49%), *P. aeruginosa* — у 3 (23,1±11,69%), *S. pyogenes* — у 2 (15,4±10,01%), *E. faecalis* — у 2 (15,4±10,01%) и *E. coli* — у 1 (7,7±7,39%) ВИЧ-инфицированного пациента.

При микробиологическом исследовании плеврального экссудата (n=2) были выделены культуры *S. enteritidis* и *K. pneumoniae* (50,0±35,36%).

Примечательно, что у одной пациентки, с выявлением *S. enteritidis* в мокроте и плевральной жидкости, а у другой в мокроте и крови был диагностирован сальмонеллезный сепсис, закончившийся летально в обоих случаях.

Таким образом, ИНДП встречаются почти у каждого третьего ВИЧ-инфицированного пациента, обратившегося за медицинской помощью, среди которых превалирует бактериальное поражение респираторного тракта с летальностью 22,4%.

У всех ВИЧ-инфицированных пациентов с наличием клинико-рентгенологических проявлений ИНДП необходимо в первые сутки госпитализации проводить исследование мокроты на микрофлору, что поможет в выборе дальнейшей тактики лечения. При невозможности исследования мокроты необходимо провести забор бронхо-альвеолярного лаважа, что только повысит качество микробиологического результата исследования.

Разнообразие возбудителей в биологических материалах у ВИЧ-инфицированных пациентов диктует проведение дальнейших научных исследований для разработки алгоритмов диагностики и лечения ИНДП.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Благовидов Д.А., Симонова О.И., Костинов М.П. и др. Синегнойная инфекция у больных с хроническими неспецифическими заболеваниями легких и проблемы её вакцинопрофилактики. *Российский педиатрический журнал*. 2015, 6: 54-60.
2. Донецкая Э.Г. Клиническая микробиология: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. М., GEOTAR-Медиа, 2011.
3. Николенко В.В., Воробьева Н.Н., Николенко А.В. и др. Клинические особенности течения внебольничных пневмоний, вызванных *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, у ВИЧ-инфицированных пациентов. *Пермский медицинский журнал*. 2016, 33 (5): 9-14.
4. Поваляева Л.В., Бородулин Б.Е., Бородулина Е.А. и др. Факторы риска смерти пациентов с внебольничной пневмонией в современных условиях. *Казанский медицинский журнал*. 2012, 93 (5): 816-820.
5. Покровский В.В., Покровский В.И. ВИЧ-инфекция и СПИД. Клинические рекомендации. М., 2010.
6. Пузырева Л.В., Сафонов А.Д., Конченко В.Д. и др. Причины летального исхода у пациентов с воспалительными изменениями в легочной ткани при ВИЧ-инфекции. *Крымский терапевтический журнал*. 2016, 28 (1): 66-70.
7. Пузырева Л.В., Сафонов А.Д., Мордык А.В. Заболевания органов дыхания при ВИЧ-инфекции. *Журнал инфектологии*. 2016, 8 (2): 17-25.
8. Пузырева Л.В., Сафонов А.Д., Назарова О.И. и др. Основные клинические причины летальных исходов у ВИЧ-инфицированных больных в Омской области в 2012—2015 годах. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2016, 8 (3): 59-64.
9. Сабитова Р.Я. Особенности клинических проявлений внебольничных пневмоний у пациентов с ВИЧ-инфекцией. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2011, (1-2): 50-52.
10. Столбова М.В., Пугаева М.О., Боркина А.Н. и др. Особенности внебольничной пневмонии у дезоморфиновых и полинаркоманов с ВИЧ-инфекцией. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2011, 131 (2): 303-306.
11. Унгуряну Т.Н., Гржибовский А.М. Краткие рекомендации по описанию, статистическому анализу и представлению данных в научных публикациях. *Экология человека*. 2011, 5: 55-60.
12. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Авдеев С.Н. и др. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. М., 2014.
13. Bruni G.O., Battle B., Kelly B. et al. Comparative proteomic analysis of Gib2 validating its adaptor function in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*. 2017 Jul 7;12 (7): e0180243.
14. Carroll K.C., Adams L.L. Lower respiratory tract infections. *Microbiol Spectr*. 2016 Aug; 4(4). doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0029-2016.
15. Da F, Joo H.S., Cheung G.Y.C. et al. Phenol-soluble modulins of *Staphylococcus haemolyticus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2017 May 24;7:206.
16. Figueiredo-Mello C., Naucler P., Negra M.D. et al. Prospective etiological investigation of

- community-acquired pulmonary infections in hospitalized people living with HIV. *Medicine* (Baltimore). 2017 Jan; 96 (4): e5778.
17. Guto J.A., Bii C.C., Denning D.W. Estimated burden of fungal infections in Kenya. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2016 Aug 31; 10 (8): 777-784.
  18. Imöhl M., Fitzner C., Perniciaro S. et al. Epidemiology and distribution of 10 superantigens among invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Germany from 2009 to 2014. *PLoS One.* 2017 Jul 18; 12 (7): e0180757.
  19. Li Q.S., Duan L.J., Estes J.D. et al. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature.* 2005, 434: 1148-1152.
  20. Lionakis M.S., Iliev I.D., Hohl T.M. Immunity against fungi. *JCI Insight.* 2017 Jun 2; 2 (11). pii: 93156.
  21. Madeddu G., Laura Fiori M., Stella Mura M. Bacterial community-acquired pneumonia in HIV-infected patients. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2010 May; 16 (3): 201-207.
  22. Murray J.F. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated pulmonary disease. *Clin. Chest. Med.* 2013 Jun; 34 (2): 165-179.
  23. Zajac V., Matelova L., Liskova A. et al. Confirmation of HIV-like sequences in respiratory tract bacteria of Cambodian and Kenyan HIV-positive pediatric patients. *Med. Sci. Monit.* 2011 Feb 25; 17 (3): CR154-158.
  24. Zhang Y., Du M, Chang Y. et al. Incidence, clinical characteristics, and outcomes of nosocomial *Enterococcus* spp. bloodstream infections in a tertiary-care hospital in Beijing, China: a four-year retrospective study. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2017 Jul 4; 6: 73.

*Поступила 27.07.17*

Контактная информация: Пузырева Лариса Владимировна, к.м.н.,  
644099, Омск, ул. Ленина, 12, р.т. (3812) 53-26-66

---

## ОБЗОРЫ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Н.П.Храпова, Л.К.Меринова, Т.В.Замарина, Д.М.Фролов, Т.В.Сенина, И.И.Корсакова*

### **ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА В ПРОБАХ С ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ И БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

В обзоре обобщены основные сведения о разработке и диагностических возможностях реакции латекс-агглютинации (РЛА), применяемой для целей обнаружения и последующей идентификации возбудителя мелиоидоза. Как свидетельствуют опубликованные данные, применение мелиоидозных моноклональных антител различной эпитопной направленности для изготовления суспензионного носителя — основного детектирующего ингредиента этой реакции, способствует повышению диагностических возможностей данного метода (его чувствительности и специфичности), что неоднократно было подтверждено специалистами, работавшими как в зонах эндемичного распространения *Burkholderia pseudomallei*, так и вне этих территорий. Как отметило большинство авторов публикаций, после внедрения этой реакции в практическую работу профильных лабораторий, низкокзатратная коммерческая продукция (тестовый набор реагентов для реакции латекс-агглютинации) может найти широкое применение как в стационарных, так и мобильных лабораториях. Несомненными достоинствами метода являются его простота, наглядность, пригодность для работы с различными образцами с объектов внешней среды и биологического материала, а также полученные доказательства возможности ис-

пользования РЛА для обеспечения эффективной дифференциации *B. pseudomallei* от авирулентных родственных бактерий и выявления возбудителя на ранних стадиях заболевания за относительно короткие промежутки времени, что делает ее перспективным методом диагностики мелиоидоза, потенциально смертельной инфекции, требующей раннего начала соответствующей антибиотикотерапии.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 84—92

Ключевые слова: реакция латекс-агглютинации, *Burkholderia pseudomallei*, моноклональные антитела

*N.P.Khrapova, L.K.Merinoва, T.V.Zamarina, D.M.Frolov, T.V.Senina, I.I.Korsakova*

## APPLICATION OF MONOCLONAL ANTIBODY-BASED LATEX AGGLUTINATION TEST FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF THE AGENT OF MELIOIDOSIS IN CLINICAL AND ENVIRONMENTAL OBJECTS

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

The review summarizes the basic information on the development and diagnostic capabilities of the latex agglutination test (LAT), used for detection and subsequent identification of melioidosis pathogen. According to the published literature, the use of melioidosis monoclonal antibodies of various epitope direction for coat the latex beads (suspension carrier), the main detection ingredient of this reaction, contributes to an increase in the diagnostic capabilities of this method: its sensitivity and specificity, which has been repeatedly confirmed by specialists working both in endemic zone distribution of *Burkholderia pseudomallei* and outside these territories. As most authors of the publications noted, after introduction of this reaction into practical work of profile laboratories, low-cost commercial products (test set of reagents for latex agglutination reaction) can find wide application both in stationary and mobile laboratories. The undoubted merits of the method are its simplicity, clarity, suitability for working with various samples from objects of the external environment and biological material, as well as obtained evidence of the suitability of LAT to ensure effective differentiation of *B. pseudomallei* from avirulent related bacteria and detection of the causative agent in the early stages of the disease for relatively short intervals, which makes it a promising method for diagnosing melioidosis, a potentially fatal infection requiring an early onset appropriate antibiotic therapy.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 84—92

Key words: latex agglutination, *Burkholderia pseudomallei*, monoclonal antibody

Возбудитель мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) — микроорганизм II группы патогенности (опасности) для человека, внесенный в список «В» вероятных агентов биотерроризма [9, 17]. Согласно зарубежной градации этот микроорганизм классифицируют как «агент выбора первого уровня» (Tier 1 select agent) [15, 20]. В род *Burkholderia* входят также филогенетически близкие виды *Burkholderia mallei* и *Burkholderia thailandensis*, отличающиеся от возбудителя мелиоидоза по признакам патогенности и способности к существованию во внешней среде [1, 21].

Степень риска предполагаемой реализации применения *B. pseudomallei* в качестве биологического агента неизвестна, поэтому основное внимание специалистов, занимающихся вопросами индикации возбудителей особо опасных инфекционных болезней, сконцентрировано на вопросах эффективности, доступности и безопасности лабораторных методов экспресс-обнаружения и последующей достоверной идентификации возбудителя мелиоидоза.

Эндемичные территории распространения *B. pseudomallei* находятся,

преимущественно, в северо-восточном Таиланде и в районе северной территории Австралии [10, 12]. Не остаются без внимания сведения о тенденции глобального распространения *B. pseudomallei* и расширения географических зон обитания этого микроорганизма [11, 13]. Все чаще появляются сообщения о регистрируемом росте числа спорадических случаев заболевания мелиоидозом в различных странах за пределами Азиатско-Тихоокеанского региона, в том числе в Европе, Индии, Северной и Южной Америке, Западной Африке, что вызывает повышенную настороженность профильных специалистов, занимающихся вопросами эпиднадзора за мелиоидозной инфекцией [21].

В гиперэндемичных регионах Таиланда при септицемической форме мелиоидоза в течение первых 48 ч после госпитализации летальность может достигать 90% при отсутствии лечения [10]. В связи с этим, врачи уделяют повышенное внимание вопросам ранней диагностики заболевания, так как она способствует своевременному началу антибиотикотерапии и в ряде случаев может привести к существенному снижению летальности, по крайней мере наполовину [31]. В то же время, следует обратить внимание на мнение профессионалов, анализирующих состояние диагностики мелиоидоза в клинических лабораториях различного уровня, работающих за пределами эндемичных регионов, сотрудники которых не располагают всем набором современных средств (питательных сред, диагностических наборов), необходимых для работы с первичными образцами проб, предположительно контаминированные патогенными буркхольдериями. В подобных случаях неидентифицированные изоляты из лабораторий первичного уровня необходимо направлять в Референс-центры для окончательной идентификации полученной пробы [17]. T. Inglis et al. отметили также, что этиологический агент мелиоидоза, *B. pseudomallei*, может оказаться трудным объектом для надежной идентификации в обычных клинических лабораториях вследствие ограниченного опыта микробиологов в части практической работы с патогенными буркхольдериями и недостатка утвержденных диагностических реагентов. Все это препятствует быстрому обнаружению *B. pseudomallei* [18].

Современные схемы индикации и идентификации возбудителя мелиоидоза, перечни методов и средств, применяемых на этапах проведения диагностики, включающей клинические, эпидемиологические и диагностические (этиологические) критерии тестирования различных проб, постоянно пополняются вновь разрабатываемыми и апробируемыми не только высокотехнологичными методами, но и относительно простыми в исполнении методами, доступными для применения как в стационарных лабораториях любой степени оснащенности, так и в полевых условиях [2, 3, 7, 21, 26].

В последнее время заметно повысился интерес к внедрению в практику суспензионных латексных носителей для методов обнаружения возбудителей особо опасных инфекций, в том числе возбудителя мелиоидоза. Этому способствовал ряд причин: повышение качества синтетических носителей, в частности, латексных частиц целевого назначения, накопление сведений о преимуществах применения моноклональных антител (МКА) по сравнению с поликлональными антителами в качестве детектирующего агента в реакции латекс-агглютинации [6, 27], а также доказательства успешной лиофилизации суспензионных частиц, нагруженных МКА заданной специфичности, без потери иммунологической активности, что особенно важно для работы в условиях чрезвычайных ситуаций. Известно, что для постановки правильного диагноза необходимым условием является выделение чистой культуры, «золотого стандарта диагностики», которое при традиционном выполнении

культивирования изучаемых образцов материала требует не менее 3 — 4 суток. Стала очевидной необходимость разработки быстрого, эффективного, высокочувствительного и специфичного метода, отвечающего современным требованиям, воспроизводимого как в условиях стационарной, так и мобильной лаборатории, простого в постановке и учете результатов.

Как свидетельствуют данные многочисленных исследований, проводившихся большей частью специалистами, работавшими в зонах эндемичного распространения возбудителя мелиоидоза, этим критериям соответствовала реакция латекс-агглютинации (РЛА) с применением МКА к диагностически значимым антигенным мишеням, чаще всего к экзополисахариду 200 kDa, ЛПС или белку наружной мембраны 30 kDa *B. pseudomallei* [14, 16, 29]. Одной из первых публикаций, посвященных разработке теста латекс-агглютинации на основе МКА к экзополисахариду с м.м.  $\geq 150$  kDa для ускоренной идентификации *B. pseudomallei*, была статья I. Steinmetz et al. [29]. Авторы этой работы с помощью РЛА изучили 74 штамма *B. pseudomallei*, изолированные из внешней среды и клинического материала, отобранные в районах Юго-Восточной Азии, северной территории Австралии и Африки. Четкая специфическая агглютинация была зарегистрирована в реакциях с вирулентными  $Aga^+$  штаммами *B. pseudomallei*, но не с *Burkholderia* подобными авирулентными изолятами ( $Aga^+$ ), в частности не с *B. thailandensis* и другими видами бактерий. Впервые о возможности дифференциации таких штаммов в лабораторных условиях сообщили V. Wuthiekanum et al. [32, 34] и M.D. Smith et al. [28], которые установили, что авирулентные штаммы ( $Aga^+$ ), изолированные из внешней среды, способные ассимилировать L-арабинозу, отличаются от вирулентных клинических изолятов *B. pseudomallei* ( $Aga^-$ ) тем, что они не обладают таким свойством. Позже после получения МКА к экзополисахариду *B. pseudomallei* с м.м. 200 kDa и их использования для диагностических целей было установлено, что дифференциацию вирулентных ( $Aga^-$ ) и авирулентных ( $Aga^+$ ) штаммов *B. pseudomallei* можно осуществлять по признаку наличия или отсутствия этого антигена на поверхности бактериальной клетки соответственно [8, 25], что впоследствии было многократно подтверждено специалистами, работавшими в эндемичных районах распространения возбудителя мелиоидоза [29, 32]. Преимущества использования МКА для приготовления латексного диагностикума стали очевидны в сравнении с применением поликлональных антител, так как ранее РЛА, разработанная с применением поликлональной смеси иммуноглобулинов, не обеспечивала эффективную дифференциацию *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* [6, 27]. Важным итогом этих работ явились доказательства того, что РЛА на основе МКА — простой, быстрый и высокоспецифичный способ идентификации культур *B. pseudomallei*, изолированных из проб клинического материала и образцов почвы, собранных в различных географических регионах [25, 30].

Мишенями для идентификации *B. pseudomallei* в пробах клинического материала могут служить различные диагностически значимые антигены возбудителя мелиоидоза, в том числе, белок наружной мембраны с м.м. 30 kDa, локализованный на поверхности этих бактерий [16, 22]. Антиген 30 kDa, по данным авторов, накапливается в жидкой среде культивирования буркхольдерий. Установлено, что МКА к данному белку в реакции агглютинации (РА) взаимодействовали с *B. pseudomallei*, но не с *B. thailandensis* [22]. Использование этих МКА в реакции агглютинации с клиническими изолятами позволило авторам в 243 случаях получить положительные результаты [23]. РА с другими видами грамотрицательных бактерий оказались негативными, за

исключением положительной РА с одним штаммом возбудителя сапа *B. mallei*. Отмечено также, что МКА этого типа обладали кросс-реактивностью в отношении грамположительных *Bacillus spp.* и *Streptococcus pyogenes*. При использовании вышеназванных МКА в качестве основы при разработке РЛА чувствительность реакции достигла 100%, а специфичность колебалась в диапазоне от 85,96 до 96,49% в зависимости от режима предварительного подращивания тестируемой пробы. Получены доказательства того, что сочетанное применение культурального метода в режиме подращивания исследуемого материала с последующей постановкой РЛА можно применять для ускоренной диагностики мелиоидоза в обычной бактериологической лаборатории. Этот метод позволяет сокращать время обнаружения искомым бактерий в пробе крови, по крайней мере, на 2 дня по сравнению с традиционным культуральным методом.

Диагностическая ценность РЛА была подтверждена также двумя независимыми группами исследователей из Таиланда. Первая группа [14] для быстрой идентификации *B. pseudomallei* разработала тест-набор для РЛА на основе МКА Vps-L1 к липополисахаридному (ЛПС) антигену возбудителя мелиоидоза. Этот набор реагентов был использован при проверке 88 образцов проб крови пациентов, предположительно больных мелиоидозом. В 96,8% случаев в исследованных образцах был выявлен ЛПС возбудителя мелиоидоза и подтверждена специфичность использованных диагностических реагентов. Оценивая полученные результаты, авторы работы пришли к заключению о том, что выявление ЛПС *B. pseudomallei* в РЛА с применением суспензионного носителя, нагруженного МКА, гомологичными данному антигену, целесообразно применять для быстрой идентификации бактерий в образцах культивируемых проб крови больных с септикопиемической формой заболевания. Работа участников второй группы [24] также была связана с обследованием больных септицемическим мелиоидозом. После разработки теста латекс-агглютинации (Mab-LA) на основе смеси из трех вариантов МКА различной эпитопной направленности его применили для тестирования 396 гемокультур с положительным бактериальным ростом, из числа которых 75 культур, согласно данным общепринятых биохимических тестов, являлись представителями вида *B. pseudomallei*. Чувствительность и специфичность теста Mab-LA составила 95% и 100% соответственно. Метод был признан надежным и удобным для ускоренной диагностики острой формы мелиоидоза, позволяющим сократить время, которое обычно используют для воспроизведения традиционной схемы лабораторного анализа (3 — 4 дня), до 30 ч. При этом отмечено, что большая часть этих 30 ч уходит на подращивание достаточного количества бактерий для постановки реакции Mab-LA, которая сама по себе требует не более 5 минут.

Одно из наиболее масштабных исследований проб клинического материала больных с приобретенной септиемией было проведено в Таиланде [5]. Для быстрой идентификации *B. pseudomallei* авторы публикации использовали тест латекс-агглютинации, разработанный на основе одного из вариантов МКА, взаимодействующих с антигеном 200 kDa возбудителя мелиоидоза. Исследованию подлежали 1369 изолятов, выделенных после культивирования образцов крови больных септиемией, поступивших из 12 госпиталей, находившихся на территории северо-восточного региона Таиланда. В результате культивирования исследуемого материала процент идентифицированных штаммов *B. pseudomallei* из общего числа 1369 изолятов составил 15% (204 изолята). При проверке этих штаммов в реакции латекс-агглютинации были

получены 194 положительных результата. Чувствительность реакции достигла 95%, что сравнимо с чувствительностью методик выделения чистых культур, а также совпала с результатами биохимических тестов. Авторы подтвердили высокую степень воспроизводимости данного метода, не требующего дорогого и сложного оборудования, его экономичность и простоту в исполнении.

Позже сопоставимое по объему исследование, направленное на выявление и идентификацию *V. pseudomallei* в пробах крови септицемических больных, было предпринято Ekro P. et al., которые использовали РЛА на основе МКА к белку 30 kDa для обнаружения *V. pseudomallei* в культивируемых образцах крови 1139 пациентов с приобретенной септициемией [16]. Согласно более ранним исследованиям, примененный диагностикум выявлял только вирулентные, не утилизирующие арабинозу (Ara<sup>-</sup>) клинические изоляты, и не взаимодействовал с другими грамотрицательными бактериями, включая *V. thailandensis*. Чувствительность и специфичность реакции были равны 96,75% и 99,61% соответственно. При проведении исследования авторы использовали ранее разработанную методику подращивания образцов крови больных, доставленных из 11 госпиталей регионального и провинциального уровня, расположенных на северо-востоке Таиланда [24]. Из 1139 протестированных образцов 123 были идентифицированы как *V. pseudomallei*, из которых в РЛА 119 образцов продемонстрировали положительные результаты. Четыре образца выдали ложноположительные ответы, похожие на результаты, зарегистрированные ранее, обусловленные перекрестной активностью МКА 30 kDa в отношении стрептококка группы А и *Bacillus spp.* При использовании РЛА для идентификации *V. pseudomallei* напрямую без подращивания в 309 образцах среды культивирования крови, полученных из двух региональных больниц, были зарегистрированы положительные результаты, при этом показатели чувствительности и специфичности соответствовали 95,24 и 99,65%. Один образец с ложноположительным результатом в РЛА сравнили с результатами биохимических тестов и установили, что перекрестная активность была обусловлена присутствием в пробе стрептококка группы А. Ранее авторы данной работы установили повышение специфичности РЛА при исследовании проб, прошедших два этапа подращивания: первый — в среде для культивирования проб крови больного, второй — дополнительный этап подращивания в сердечно-мозговом бульоне (ВНВ), по сравнению с тестированием первичного высева на этапе культивирования (96,49% против 85,96%). При сравнении данных, полученных в исследовании, о котором идет речь, с ранее опубликованными результатами группы N. Anuntagool et al. [5], применявшими для изготовления латексного диагностикума МКА к 200 kDa антигену, установлено, что как в первом, так и во втором исследовании результаты РЛА были сопоставимыми. В целом, РЛА с применением МКА к белку наружной мембраны 30 kDa *V. pseudomallei* хорошо себя проявила в условиях диагностических лабораторий в сельской местности, обеспеченных минимумом оборудования и относительно мало подготовленным персоналом. Авторам удалось получить доказательства пригодности РЛА для обеспечения эффективной дифференциации *V. pseudomallei* от авирулентных родственных бактерий и выявления возбудителя на ранних стадиях заболевания за относительно короткие промежутки времени, что делает ее перспективным методом диагностики мелиоидоза [16].

Простой, надежный и оригинальный способ дифференциации *V. pseudomallei* и *V. thailandensis* был предложен V. Wuthiekanun et al. [32]. Его особен-

ность состояла в одновременном применении двух тест-систем для латекс-агглютинации, приготовленных на основе МКА. Анти-ЛПС система взаимодействовала как с *B. pseudomallei*, так и с *B. thailandensis*, в то время как МКА к экзополисахариду агглютинировали только возбудитель мелиоидоза. В сравнении с классическими биохимическими тестами этот метод обладает высокой степенью воспроизводимости результатов и точностью. Он особенно полезен для идентификации буркхольдерий в образцах внешней среды, которые могут содержать как тот, так и другой микроорганизмы, например, образцы почвы из района эндемичного распространения *B. pseudomallei*, в которой возможно присутствие *B. thailandensis*.

Несмотря на то, что многие исследователи сообщали об эффективности применения РЛА для идентификации *B. pseudomallei* и отмечали ее высокую чувствительность и специфичность, этот метод пока не вышел за пределы регионов эндемичного распространения *B. pseudomallei*. Коммерческий диагностический набор реагентов для РЛА был разработан и апробирован, по видимому, только в Австралии [18].

Большой интерес представляют исследования, посвященные сравнительному анализу методов, применяемых для точной идентификации *B. pseudomallei* [4], в частности системы API 20NE и реакции латекс-агглютинации с применением МКА к экзополисахариду 200 kDa. При апробации API 20NE системы для идентификации *Burkholderia* spp. корректная идентификация *B. pseudomallei* была получена в 99% случаев при тестировании 800 изолятов этого микроорганизма, а при тестировании 19 изолятов *B. serasia* правильный ответ был получен в 17 случаях (89%). При этом стало очевидно, что данная система не позволяет дифференцировать *B. pseudomallei* и *B. mallei*, а также не пригодна для идентификации изолятов *B. thailandensis*. В то же время, реакция латекс-агглютинации была положительной в 796 из 800 (99,5%) случаев при работе с *B. pseudomallei* и отрицательной при проверке других 120 оксидазо-положительных грамотрицательных бактерий. Обобщая результаты работы, авторы данной публикации подчеркнули несколько важных моментов, сопряженных с характером выполненных исследований. Важно иметь в виду, что прямое сравнение РЛА с системой API 20NE невозможно, так как она не обеспечивает альтернативную бактериальную идентификацию негативных изолятов; РЛА — высокочувствительная и специфичная реакция для идентификации *B. pseudomallei*, но она не способна дифференцировать *B. pseudomallei* и *B. mallei*. После внедрения этой реакции в практическую работу профильных лабораторий низкочатратная коммерческая продукция (тестовый набор реагентов для реакции латекс-агглютинации) может найти широкое применение как в стационарных, так и мобильных лабораториях.

Альтернативой автоматизированным методам обнаружения буркхольдерий является прямое тестирование пробы с целью выявления в ней антигена с помощью иммунофлуоресцентного метода или реакции агглютинации [19, 33]. Быстрое иммунофлуоресцентное обнаружение *B. pseudomallei* и *B. mallei* применяют при исследовании клинических образцов до того, как будет выделена чистая культура. Как было установлено, прямой метод флуоресцирующих антител (МФА) высокоспецифичен при поиске *B. pseudomallei* в образцах клинического материала (>99%). Однако, по данным V.Wuthiekanun et al. [33], чувствительность этого метода в конкретных условиях оказалась ниже (66%). При этом РЛА на основе поли- и моноклональных антител против *B. pseudomallei* проявила 100% чувствительность и 90% специфичность при тестировании образцов культуральной среды, в которую была засеяна проба крови больного [19]. В связи с этим, следует согласиться с суждением о том, что

быстрый и высокочувствительный тест необходим для клинических лабораторий и оперативного применения в полевых условиях [15, 26]. Относительно недавно В. Duval et al. разработали тест латекс-агглютинации, с помощью которого возможна идентификация как *B. pseudomallei*, так и *B. mallei* изолятов [15]. В этом тесте авторы использовали МКА, которые специфичны в отношении капсульного полисахарида, продуцируемого *B. pseudomallei* и *B. mallei*, но отсутствующего у близкородственных видов буркгольдерий. Всего были протестированы 110 штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* и 36 штаммов близкородственных бактерий. При постановке реакции с *B. pseudomallei* и *B. mallei* (110) были получены 109 положительных результатов, чувствительность реакции составила 99,1%. По мнению авторов, именно быстрые диагностические тесты для идентификации патогенных буркгольдерий явятся существенным подспорьем для специалистов в условиях состоявшегося биотеррористического события. В целом, разработанная реакция окажется наиболее востребованной в клинических лабораториях [15].

Что касается лабораторий первичного уровня, то до тех пор, пока современные диагностические системы не станут для них доступными, основной объем работы с пробами материала, подозрительного на принадлежность к *B. pseudomallei*, будет состоять из определения минимального набора фенотипических признаков этого микроорганизма и выполнения биохимических тестов, применяемых при постановке ориентировочного диагноза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Илюхин В.И., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г., Антонов В.А., Меринова Л.К., Сеимова И.К. *Burkholderia thailandensis*: биологические свойства, идентификация и таксономическая позиция. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002, 1: 7-11.
2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Г.Г.Онищенко, В.В.Кутырев (ред.). М., ЗАО «Шико», 2013.
3. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство. Г.Г.Онищенко, В.В.Кутырев (ред.). Саратов, ООО «Буква», 2014.
4. Amornchai P., Chierakul W., Wuthiekanun V. et al. Accuracy of *Burkholderia pseudomallei* identification using the API 20NE system and a latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45 (11): 3774-3776.
5. Anuntagool N., Naigowit P., Petkanchanapong V. et al. Monoclonal antibody-based rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture fluid from patients with community-acquired septicemia. *J. Med. Microbiol.* 2000, 49 (12): 1075-1078.
6. Anuntagool N., Intachote P., Wuthiekanun V. et al. Lipopolysaccharide from nonvirulent Ara<sup>+</sup> *Burkholderia pseudomallei* isolates in immunologically indistinguishable from lipopolysaccharide from virulent Ara<sup>-</sup> clinical isolates. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998, 5 (2): 225-229.
7. Anuntagool N., Intachote P., Naigowit P. et al. Rapid antigen detection assay for identification of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei* infection. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34 (4): 975-976.
8. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P. et al. Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the in vivo growth of virulent Ara<sup>-</sup> and avirulent Ara<sup>+</sup> *Burkholderia pseudomallei*. *Acta. Trop.* 2000, 74 (2-3): 221-228.
9. Bossi P., Guihot A., Bricare F. Emerging or re-emerging infections that can be used for bioterrorism. *Presse Med.* 2005, 34 (2 Pt 2): 149-155.
10. Chaowagul W., White N.J., Dance D.A. et al. Melioidosis: a major cause of community acquired septicemia in northeastern Thailand. *J. Infect. Dis.* 1989, 159 (5): 890-899.
11. Currie B.J., Dance D.A., Cheng A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008, 102 (1): 1-4.
12. Currie B.J., Fisher D.A., Howard D.M. et al. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 2000, 31 (4): 981-986.
13. Dance D.A. Melioidosis as an emerging global problem. *Acta. Trop.* 2000, 74 (2-3): 115-119.

14. Dharakul T., Songsivilai S., Smithikarn S. et al. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood cultures by latex agglutination using lipopolysaccharide-specific monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999, 61 (4): 658-662.
15. Duval B.D., Elrod M.G., Gee J.E. et al. Evaluation of a latex agglutination assay for the identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014, 90 (6): 1043-1046.
16. Ekpo P., Rungpanich U., Pongsunk S. et al. Use of protein-specific monoclonal antibody-based latex agglutination for rapid diagnosis of *Burkholderia pseudomallei* infection in patients with community-acquired septicemia. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007, 14 (6): 811-812.
17. Gilad J., Schwartz D., Amsalem Y. Clinical features and laboratory diagnosis of infection with the potential bioterrorism agents *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Int. J. Biomed. Sci.* 2007, 3 (3): 144-152.
18. Inglis T.J., Merritt A., Chidlow G. et al. Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43 (5): 2201-2206.
19. Jedudason M.V., Balaji V., Sirisinha S. et al. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture supernatants by a coagglutination assay. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005, 11: 925-936.
20. Khan A.S., Levitt A.M., Sage M.J. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. *MMWR Recomm. Rep.* 2000, 49 (RR-4): 1-14.
21. Lau S.K., Sridhar S., Ho C.C. et al. Laboratory diagnosis of melioidosis: past, present and future. *Exp. Biol. Med.* 2015, 240: 742-751.
22. Pongsunk S., Ekpo P., Dharakul T. Production of specific monoclonal antibodies to *Burkholderia pseudomallei* and their diagnostic application. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 1996, 14 (1): 43-47.
23. Pongsunk S., Thirawattanasuk N., Piyasangthong N. et al. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood cultures by a monoclonal antibody assay. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37 (11): 3662-3667.
24. Samosornsuk N., Lulitanond A., Saenla N. et al. Shot report: evaluation of a monoclonal antibody-based latex agglutination test for rapid diagnosis of septicemic melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999, 61 (5): 735-737.
25. Sirisinha S., Anuntagool N., Intachote P. J. et al. Antigenic differences between clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol. Immunol.* 1998, 42 (11): 731-737.
26. Sirisinha S., Anuntagool N., Dharakul T. et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. *Acta Trop.* 2000, 74 (2-3): 235-245.
27. Smith M.D., Wuthiekanun V., Walsh A.L. et al. Latex agglutination test for identification of *Pseudomonas pseudomallei*. *J. Clin. Pathol.* 1993, 46: 374-375.
28. Smith M.D., Angus B.J., Wuthiekanun V. et al. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 1997, 65 (10): 4319-4321.
29. Steinmetz I., Reganzerowski A., Brenneke B. et al. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* by latex agglutination based on an exopolysaccharide-specific monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37 (1): 225-228.
30. Thephai C., Dharakul T., Smithikarn S. et al. Differentiation between non-virulent and virulent *Burkholderia pseudomallei* with monoclonal antibodies to the Ara<sup>+</sup> and Ara<sup>-</sup> biotypes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001, 65 (1): 10-12.
31. White N.J., Dance D.A., Chaowagul W. et al. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. *Lancet.* 1989, 2 (8665): 697-701.
32. Wuthiekanun V., Anuntagool N., White N. et al. Shot report: a rapid method for the differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002, 66 (6): 759-761.
33. Wuthiekanun V., Desakorn V., Wongsuvan G. et al. Rapid immunofluorescence microscopy for diagnosis of melioidosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2005, 12: 555-556.
34. Wuthiekanun V., Smith M.D., Dance D.A. et al. Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. *J. Med. Microbiol.* 1996, 45: 408-412.

*Поступила 24.07.17*

Контактная информация: Корсакова Ирина Игоревна, к.м.н.,  
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)37-36-74

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ**

Ростовский-на Дону научно-исследовательский противочумный институт

Токсины — высокомолекулярные соединения, образуемые микроорганизмами, животными, растениями и обладающие антигенными свойствами. В последнее время в связи с возникшей угрозой террористических действий идентификация ряда бактериальных токсинов становится особенно актуальной. Новый подход в идентификации токсинов связан с развитием масс-спектрометрии и позволяет успешно проводить анализ большинства природных токсинов. Метод MALDI-MS позволяет проводить детекцию таких токсинов, как Shiga-toxin *Escherichia coli*, delta-toxin *Staphylococcus aureus*, цитотоксин *Bacillus cereus*, ботулинический нейротоксин, холерный токсин. Аналитические и диагностические характеристики метода, простота и скорость исследования свидетельствуют о перспективе внедрения метода в практику лабораторной диагностики при определении токсинопродукции исследуемых микроорганизмов.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 93—101

Ключевые слова: MALDI-MS спектрометрический анализ, времяпролетная масс-спектрометрия, бактериальные токсины, матрица, калибратор, Mascot, идентификация

*M.V.Poleeva, O.S.Chemisova*

## **THE USE OF MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS FOR THE DETECTION OF BACTERIAL TOXINS**

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

Toxins — molecular weight compounds produced by microorganisms, animals, plants and possessing antigenic properties. Recently due to the perceived threat of terrorist actions identification of a number of bacterial toxins is especially important. A new approach in the identification of toxins associated with the development of mass spectrometry and can be successfully used for analysis of most environmental toxins. The method of MALDI-MS allows the detection of toxins such as Shiga-toxin *Escherichia coli*, delta-toxin of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* particular, botulinum neurotoxin, cholera toxin. Analytical and diagnostic characteristics of the method, the simplicity and speed studies indicate the long term implementation of a method in the practice of laboratory diagnostics in determining toxinproducing of the studied microorganisms.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 93—101

Key words: MALDI-MS spectrometric analysis, time-of-flight mass spectrometry, bacterial toxins, matrix, calibrant, Mascot, identification

Токсины — высокомолекулярные соединения, образуемые микроорганизмами, животными, растениями, обладающие антигенными свойствами и сильным токсическим действием на человеческий организм. Наиболее токсичными являются бактериальные токсины. К сильным токсинам, продуцируемым микроорганизмами, относятся ботулинический, столбнячный, холерный токсины [14]. Они определяют основные симптомы инфекционных болезней человека и животных, а также рассматриваются в качестве биологического оружия [6, 39].

Большинство биологических токсинов имеют полипептидную природу, однако известны и низкомолекулярные соединения, имеющие высокую токсичность [16, 18, 33]. Большая часть токсинов представляют собой А-В структуру, что предполагает наличие двух компонентов — В-субъединицы, которая участвует в связывании токсина с рецептором на поверхности клетки хозяина и способствует транспортировке токсина в клетку хозяина; и А-субъединицы — проявляющей энзиматическую (токсическую) активность в клетке хозяина. Структура В-доменов зависит от структуры рецепторов-мишеней, с которыми взаимодействует токсин. А-субъединицы более консервативны, чем В, особенно в участках, критических для их ферментативной активности [11, 20].

Идентификация токсинов в различных средах — одна из наиболее сложных задач в аналитической токсикологии. В последнее время из-за возникшей угрозы террористических действий детекция ряда бактериальных токсинов в связи с их потенциальной опасностью становится особенно актуальной. Для идентификации и анализа токсинов используются различные лабораторные методы, включающие тесты на животных, микробиологические методы, ПЦР-анализ, иммунологические методы. Все эти методы не лишены недостатков [15, 28, 29].

О масс-спектрометрии (МС) как о методе исследования биологических образцов заговорили с появлением так называемых мягких методов ионизации: электрораспыления и лазерной десорбции на матрице (MALDI — Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, матрично активированная лазерная десорбция/ионизация) [10, 12]. Масс-спектрометрия — метод исследования вещества, основанный на определении отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации представляющих интерес компонентов пробы. Совокупность значений  $m/z$  и относительных величин токов этих ионов, представленная в виде графика, называется масс-спектром вещества [6, 7, 21, 25, 26]. Широкое применение в задачах идентификации белков по массам пептидов, входящих в их состав, нашли времяпролетные масс-спектрометры (TOF) с источником ионизации MALDI.

С развитием масс-спектрометрии связан и новый подход в идентификации токсинов, что позволяет успешно анализировать термолабильные нелетучие соединения, к которым и относится большинство природных токсинов. Основное преимущество метода MALDI-MS состоит в том, что этим методом можно определять молекулярные массы цельных белков без предварительного расщепления на пептиды. Несмотря на то, что некоторые белки отсутствуют в базах данных, используемый метод сравнения аминокислотных последовательностей, определенных в ходе исследования (например, тандемный MS-MS анализ), с последовательностями уже определенных белков позволяет если не идентифицировать белки, то хотя бы определить их класс [6].

Характер масс-спектров сильно зависит от многих параметров: природы матрицы, способа приготовления образца, количественного соотношения матрица/анализируемое соединение, длины волны, долготы импульса и мощности лазерного излучения. Поэтому анализ каждого типа соединений требует оптимального подбора многих этих параметров [9].

*Матрица MALDI* — нелетучий твердый материал, обеспечивающий процессы десорбции и ионизации посредством поглощения лазерного излучения. Как результат, и матрица, и любой образец, встроенный в нее, испаряется. Матрица также служит для того, чтобы минимизировать ущерб образцу от лазерного излучения путем поглощения большей части падающей энергии [21, 26].

Основные требования к материалу матрицы заключаются в его высокой способности поглощать лазерное излучение; кристаллизоваться с включением в структуру молекул анализируемого вещества; инертности по отношению к анализируемому веществу; хорошей растворимости в растворителях, используемых для растворения образца, низкой летучести в условиях вакуума. Матрицы обладают селективностью и по отношению к классу анализируемых соединений. Во многом это определяется различной природой механизмов образования ионов анализируемого вещества. Чаще всего в качестве матриц используются твердотельные (в виде порошков) слабые органические кислоты. Растворитель также играет очень важную роль в процессе подготовки образца для анализа. Он должен одинаково хорошо растворять как матрицу, так и анализируемое вещество. Разная растворимость компонентов приводит к их дробной кристаллизации, что является абсолютно неприемлемым для проведения анализа [5, 6, 21, 25].

Наиболее широкое в качестве матриц применение нашли: синапиновая кислота (sinapic acid) — для исследования пептидов и больших протеинов с молекулярной массой 10 — 150 кДа, в качестве растворителя используются тетрагидрофуран, диметилформамид; альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) — для пептидов с массой менее 10 кДа, липидов и углеводов, растворители — ацетон, ацетонитрил, тетрагидрофуран, диметилформамид, этанол; 2,5-дигидроксibenзойная кислота (2,5-dihydroxybenzoic acid) — для пептидов, протеинов, углеводов, олигонуклеотидов, полимеров и других органических молекул, в качестве растворителя используются вода, этанол, метанол, ацетон, ацетонитрил, хлороформ, тетрагидрофуран.

Также в качестве матрицы могут использоваться: 2-(4-гидроксифенилазо)-бензойная кислота (2-(4-hydroxyphenyazo)-benzoic acid) — для исследования пептидов, белков, синтетических полимеров, растворители — диоксан, ацетон, тетрагидрофуран, диметилформамид; феруловая кислота (ferulic acid) — для пептидов, белков, растворители — тетрагидрофуран, диметилформамид.

Для успешного проведения анализа необходимо правильно выбрать не только матрицу, но и растворитель, а также соотношение между матрицей и анализируемым веществом — чем выше молекулярная масса анализируемого вещества, тем больше матрицы нужно использовать. Очень важно, чтобы кристаллизация матрицы и анализируемого вещества проходила одновременно, сопровождаясь встраиванием молекул анализируемого вещества в кристаллы матрицы, что является необходимым условием получения хорошо разрешимого спектра [5]. Обычно раствор матрицы в подходящем растворителе готовится ежедневно, поскольку он светочувствителен и подвержен фото-разложению, но может храниться короткое время в защищенном от света месте.

*Калибрант.* Для получения точных и достоверных результатов любое аналитическое оборудование требует настройки и калибровки. Для калибровки масс-спектрометров применяются определенные стандарты. Выбор стандарта зависит от диапазона работы прибора и знака анализируемых ионов. Для калибровки в области от 2 до 15 кДа удобно использовать стандарты полимеров с заранее известными концевыми группами. Основной задачей при калибровке является правильное соотношение сигналов на начальной стадии. Для этого могут помочь стандарты на основе протеинов. Так, для увеличения достоверности анализа системы Biotyper используется калибровочный бактериальный стандарт, представляющий собой смесь белков E.coli DH5 $\alpha$  с добав-

лением двух белков крупной массы. Калибровка происходит в диапазоне масс от 4 до 17 кДа.

*Пробоподготовка.* Существует несколько методик нанесения образца на мишень. Чаще всего аналит и матрицу тщательно перемешивают в отдельной емкости и затем совместно наносят на мишень. Кроме того, можно наносить на мишень последовательно сначала матрицу, а потом аналит, и наоборот — сначала аналит, затем матрицу. Разработаны методики и имеются готовые коммерчески доступные микроколоники (например, ZipTip фирмы «Millipore», Supel-Tips фирмы «Supelco») для одновременного обессоливания образца и нанесения его на мишень. Процедура включает в себя такие стадии, как нанесение образца на колонку, промывку водой и элюирование аналита прямо на мишень. Стоит отметить, что эта процедура также позволяет концентрировать анализируемые вещества [6].

Перед анализом важно очистить анализируемый белок от примесных компонентов, что достигается методами хроматографии. Необходимо отметить, что в настоящее время разработаны устройства, позволяющие совместить MALDI масс-спектрометр с жидкостным хроматографом, что позволяет проводить определение белков в их смесях в режиме рутинных анализов [5].

При масс-спектрометрическом анализе белков различают несколько подходов: «top-down» — получение информации на основе масс-спектрометрического анализа целых, неповрежденных белковых молекул. Недостатком метода является селективность, поскольку для каждой массы белка можно подобрать множество белков-кандидатов с такой массой [37]; «bottom-up» — восстановление информации о белках за счет анализа отдельных пептидов этих белков; «middle-down» — недавно возникший подход, основанный на неполном протеолизе исходного белка с последующим масс-спектрометрическим анализом данных длинных пептидов методом «top-down» [35].

Наиболее широко распространенным вариантом анализа белков стал подход «bottom-up». Он представляет собой предварительное биохимическое расщепление белка на более мелкие пептиды, очистку полученного образца от низкомолекулярных примесей и масс-спектрометрический анализ смеси. Чаще всего для пробоподготовки в масс-спектрометрии используется трипсин. В результате триптического гидролиза получается набор от 10 до 100 и более пептидов массой 500 — 4000 дальтон. В некоторых случаях используются и другие агенты избирательного гидролиза (пепсина, химоทริปсина, эластазы и др.). Таким образом, объектом масс-спектрометрического анализа становится смесь пептидов, являющихся фрагментами исходных белков [8, 23]. Для каждого из белков набор пептидов, полученных в результате ферментативного гидролиза, уникален, соответственно набор молекулярных масс пептидов гидролизата является характеризующим параметром для идентификации белка [2, 34].

*Регистрация масс-спектров.* Следующий этап — регистрация масс-спектра полученной смеси, в результате чего получается набор или список молекулярных масс. Он не дает никакой информации о структуре или других свойствах продуктов. В основе метода только предположение, что это молекулярные массы пептидов, и эти пептиды образовались в результате специфического гидролиза. Здесь и заключается главная идея подхода — если каждый белок имеет свой набор пептидов и соответствующий ему перечень молекулярных масс, то вполне возможно и решение обратной задачи — найти для полученного перечня молекулярных масс соответствующий ему белок [Курова В.С. и др., 2009].

*Белковые базы данных.* Для использования в различных средствах анализа масс-спектрометрических данных существуют белковые базы данных. Наиболее распространенными поисковыми системами являются Mascot, OMSSA и др. [1]. Во всех системах идентификация осуществляется по полученным исследователем масс-спектрометрическим данным, путем их сопоставления с известными структурами белков.

Например, поисковая программа Mascot проводит поиск и идентификацию белков по базам данных первичных последовательностей белков и соответствующих генов. Принцип работы Mascot основан на алгоритме MOWSE (MOlecular Weight SEarch), разработанном в 1993 году D.J.Pappin [31]. Первым этапом поиска с использованием алгоритма MOWSE является сравнение вычисленных масс пептидов для всех записей последовательностей в базе данных. Каждая вычисленная величина, которая совпадает с заданной погрешностью с экспериментальной величиной, считается как совпавшая. Молекулярная масса интактного белка может быть использована как пре-фильтр. Вместо простого счета числа совпавших пептидов MOWSE-алгоритм использует эмпирически определенные факторы, чтобы приписывать статистический вес каждому совпавшему пептиду [1].

Диалоговое окно программы Mascot позволяет указать базу данных для поиска, способ фрагментации белка (химический или ферментативный гидролиз) и возможные модификации аминокислотных остатков (заданные или теоретически возможные в данных условиях). Также можно оптимизировать поиск, выбрав биологический таксон, указав предположительную массу искомого белка и установив точность, с которой экспериментальные данные должны соответствовать теоретическим. Далее, загрузив список экспериментальных масс и зарядовых состояний ионов, можно начать поиск. Программа Mascot позволяет обращаться к различным базам данных, наиболее универсальными из которых являются MSDB, NCBI, SwissProt и dbEST [Курова В.С. и др., 2009].

*Идентификация бактериальных токсинов.* Основной проблемой в идентификации отдельных молекул, например, токсинов, является их низкая продукция в условиях *in vitro* и, как следствие, низкая интенсивность пиков относительно других белковых молекул — примесей. Также зачастую по значению молекулярной массы невозможно идентифицировать белок, т. к. большое количество белков обладает близкими по значению молекулярными массами; также встречаются фрагменты белков — пептиды — с одинаковыми последовательностями, которые могут принадлежать совершенно разным белкам. В последнее время появляется все больше работ, посвященных идентификации токсинов биологического происхождения, в которых авторы предлагают различные подходы к решению этих проблем [13, 17, 19, 22, 24, 27, 30, 32].

С.К.Fagerquist et al. разработан метод для определения  $\alpha$ -субъединицы Shiga-toxin 2 ( $\alpha$ -Stx2) энтерогеморрагических штаммов *E. coli* O157:H7 с использованием MALDI-TOF MS. На этапе пробоподготовки проводили лизис клеток бактериофагом, что позволило повысить степень обнаружения STX по сравнению с механическим лизисом [19].

S.Kull et al. была показана возможность использования MALDI для одновременного выявления рицина, стафилококкового энтеротоксина и ботулинического нейротоксина. Предлагаемый авторами метод позволяет определять указанные токсины в смешанных образцах в таких субстратах, как молоко или сок. Метод включает в себя этап аффинного обогащения с использованием

специфических моноклональных антител к каждому из токсинов с последующей идентификацией MALDI-TOF MS. Чувствительность метода составила 500 fmol для каждого из токсинов [27].

J.Gagnaire et al. (2012) метод MALDI-TOF MS был использован для детекции delta-toxin *Staphylococcus aureus*. Авторы оценивали наличие пика, соответствующего delta-toxin, используя очищенный токсин, природные штаммы, а также мутантные по гену, кодирующему токсин. Был определен пик, соответствующий значению  $m/z$   $3005 \pm 5$  и показана возможность анализа цельноклеточных препаратов (одной колонии микроорганизма, выращенной на плотной питательной среде) в MALDI-TOF MS для рутинной идентификации основного фактора патогенности *S. aureus*.

*Bacillus cereus* продуцируют такие токсины, как цитотоксин K1 (CytK1) и Non-энтеротоксин гемолитический (NHE), способные вызывать пищевые отравления у людей. Обнаружение данных токсинов затруднено, и бельгийские ученые применили метод MALDI-TOF MS и показали, что он может быть успешно использован для выявления указанных токсинов. На этапе пробоподготовки проводили предварительную трипсинизацию [36].

J.R.Barr et al. был разработан высокочувствительный и быстрый метод MALDI-TOF MS, позволяющий выявлять специфические продукты расщепления для каждого серотипа токсина (A, B, E и F). В работе использовался очищенный токсин, обработанный трипсином [14]. Возможность использования методов жидкостной хроматографии — масс-спектрометрии и tandemной масс-спектрометрии для детекции ботулинического токсина была также показана в [24, 38, 39].

Цианобактерии синтезируют в основном цианотоксины двух типов — нейротоксины и гепатотоксины. Надежность определения присутствия цианотоксинов достигается сочетанием метода жидкостной хроматографии и метода масс-спектрометрии, которое дает точные значения молекулярных масс, характеризующих определяемые соединения. Для экстракции внутриклеточных токсинов из образцов биомассы необходимо разрушение клеточной стенки бактерий, что достигается либо лиофилизацией, либо многократным замораживанием-размораживанием образца с последующей экстракцией. В данном случае лиофилизат биомассы известной навески экстрагировали двумя порциями комплексного элюента (ацетонитрил-вода-ТФУ) при помощи ультразвука. Полученный экстракт центрифугировали и анализировали. Таким образом, авторами разработан и апробирован высокоселективный чувствительный метод определения цианотоксинов в природной воде, основанный на жидкостной хроматографии — масс-спектрометрии высокого разрешения [Русских Я.В. и др.].

Сотрудниками РосНИПЧИ «Микроб» была проведена индикация холерного токсина с помощью MALDI масс-спектрометрии. Использовали очищенный холерный токсин, полученный из штамма *Vibrio cholerae* 569B. Супернатант, содержащий холерный токсин, наносили на планшет MALDI в количестве 0,5 мкл, в качестве матрицы использовали 10 мг/мл  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты. В результате проведенного исследования был определен масс-спектр холерного токсина и выявлены специфические пики. На основании полученных данных выделены маркеры (спектральные пики с определенным значением  $m/z$ ), соответствующие коммерческому препарату холерного токсина (значения  $m/z$   $2899 \pm 1$ ,  $3868 \pm 1$ ,  $5803 \pm 4$ ,  $7738 \pm 6$ ,  $11603 \pm 7$ ). Спектральный пик с  $m/z$ , равным  $11603 \pm 7$ , предположительно, соответствовал

мономеру В-субъединицы холерного токсина с молекулярной массой ~11,6 кДа. Использовать данный метод можно для индикации токсинов в объектах окружающей среды при наработке базы данных токсинов биологического происхождения [3, 4].

Интенсивное развитие технологий анализа биологических объектов, в частности создание спектра методов обнаружения и расшифровки структуры природных биополимеров, таких как белки, молекулы ДНК, РНК, существенно расширили возможности в исследовании микроорганизмов. Технология MALDI-MS позволяет не только повысить точность видовой идентификации микроорганизмов, но и успешно проводить детекцию большинства природных токсинов. Аналитические и диагностические характеристики метода, простота и скорость исследования свидетельствуют о перспективе внедрения метода в практику лабораторной диагностики при определении токсинопродукции исследуемых микроорганизмов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Автономов Д. М., Агрон И. А., Кононихин А. С., Николаев Е. Н. Создание базы данных точных массово-временных меток для качественного и количественного подхода в исследовании протеома мочи человека с использованием изотопного мечения. Труды МФТИ. 2009, 1: 24-29.
2. Беризовская Е.И., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Митрофанов Д.А., Удинцев А.В., Аксенов А.В., Шевлякова О.А., Родин И.А., Шпигун О.А. Методы обработки масс-спектрометрических данных при идентификации пептидов и белков. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015, 5: 266-278.
3. Германчук В.Г., Уткин Д.В., Спицын А.Н., Киреев М.Н., Щербакова Н.Е. Индикация холерного токсина с помощью MALDI масс-спектрометрии. ЗНИСО. 2015, 3 (264): 28-31.
4. Германчук В.Г., Уткин Д.В., Спицын А.Н., Михеева Е.А., Осина Н.А. Применение методов спектроскопического анализа для выявления холерного токсина. ЗНИСО. 2016, 6 (279): 40-43.
5. Гришин И.Д. Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для анализа высокомолекулярных и металлоорганических соединений. Электронное учебно-методическое пособие. Нижний Новгород, 2014.
6. Дубровский Я. А., Подольская Е. П. Определение токсинов пептидной природы методом MALDI-MS (обзор). Научное приборостроение. 2010, 4: 21-35.
7. Ильина Е. Н. Молекулярные средства измерения в современной микробиологической лаборатории. Клин. лаб. диагностика. 2013, 9: 70.
8. Краснов Н. В., Лютвинский Я. И., Подольская Е. П. Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в протеомном анализе. Научное приборостроение, 2010, 4: 5-20.
9. Лебедев А. Т., Заикин В. Г. Задачи и достижения современной масс-спектрометрии. Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2007, 2: 21-29.
10. Полунина Т.А., Киреев М. Н., Храмченкова Т.А., Спицын А. Н., Григорьева Г. В. Масс-спектрометрия в медицине и биотехнологии. Журн. микробиол. 2013, 5: 112-118.
11. Супотницкий М. В. Бактериальные токсины. Их природа, механизмы действия, возможности конструирования гибридных и модифицированных токсинов. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2011, 1: 6-16.
12. Тарасова И. А. Жидкостная хроматография в критических условиях в сочетании с масс-спектрометрией для изучения первичной структуры биомолекул, Дисс. на соискание уч. степени кандидата физико-математических наук. 2007.
13. Юрин Ю. А., Хайруллин Р. З., Салафутдинов И. И. Масс-спектрометрическая идентификация стафилококковых пептидгидролаз. Вестник технологического университета. 2015, 16: 287-289.
14. Barr J. R., Mjura H., Boyer A. E. et al. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. Emerg. Infect. Dis. 2005, 10: 224-234.

15. Bilitewski U., Brenner-Weiss G., Hansen P.-D. et al. Bioresponse-linked instrumental analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2000, 7: 428-443.
16. Bhat V.R., Ramakrishna J., Sashidhar R.B. Outbreak of mycotoxicosis in Kashmir Valley. *Nutrition news India*. 1989, 1: 1-3.
17. Cheng K., Chui H., Domish L. D. et al. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics-Clinical Applications*. 2016, 4: 346-357.
18. Clark R.F., Williams S.R., Nordt S.P. et al. A review of selected seafood poisonings. *Undersea Hyperb Med*. 1999, 26: 175-184.
19. Clifton K. F., Zaragoz J. W. Bacteriophage cell lysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* for top-down proteomic identification of Shiga toxins 1 & 2 using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2016, 6: 671-680.
20. Finlay B., Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev*. 1997, 2: 210-230.
21. Hillenkamp F., Karas M. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem*. 1991, 24: 1193A-1202A.
22. Hiroshi Hinou, Masaki Kuroguchi, Hiroki Shimizu et al. Characterization of *Vibrio cholerae* neuraminidase by a novel mechanism-based fluorescent labeling reagent. *Biochemistry*. 2005, 35: 11669-11675.
23. Hjærnø K., Højrup P. Interpretation of tandem mass spectrometry (MSMS) spectra for peptide analysis. *Methods in Molecular Biology*. 2015, 1348: 83-102.
24. Kalb S. R., Boyer A. E., Barr J. R. Mass spectrometric detection of bacterial protein toxins and their enzymatic activity. *Toxins*. 2015, 7: 3497-3511.
25. Karas M., Bachmann D., Bahr D., Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc*. 1987, 78: 53-68.
26. Karas M., Glikmann M., Schefer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J. Mass Spectrom*. 2000, 35: 1-12.
27. Kull S., Pauly D., Stormann B. et al. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem*. 2010, 82 (7): 2910-2924.
28. Nedelkov D., Nelson R.W. Detection of Staphylococcal enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol*. 2003, 9: 5212.
29. Nedelkov D., Rasooly A., Nelson R.W. Multitoxin biosensor-mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food. *Int. J. Food Microbiol*. 2000, 1: 1-13.
30. Paauw A., Trip H., Niemcewicz M. et al. OmpU as a biomarker for rapid discrimination between toxigenic and epidemic *Vibrio cholerae* O1/O139 and non-epidemic *Vibrio cholerae* in a modified MALDI TOF MS assay. *BMC Microbiol*. 2014, 14 (1): 158.
31. Pappin D. J., Hojrup P. N., Bleasby A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol*. 1993, 6: 327-332.
32. Pupo E., Phillips N. J., Gibson B. W. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry of lipopolysaccharide species separated by slabpolyacrylamide gel electrophoresis: high-resolution separation and molecular weight determination of lipooligosaccharides from *Vibrio fischeri* strain HMK. *Electrophoresis*. 2004, 25 (14): 2156-2164.
33. Roy-Lachapelle A., Sollicec M., Bouchard MF. et al. Detection of cyanotoxins in algae dietary supplements. *Toxins (Basel)*. 2017, 9 (3): E76.
34. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem*. 1996, 5: 850-858
35. Switzer L., Giera M., Niessen W. Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *J. Proteome Res*. 2013, 12: 1067.
36. Tsilia V., Devreese B., de Baenst I. et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, 6: 1691-1702.
37. Thevis M., Loo R.R., Loo J.A. Mass spectrometric characterization of transferrins and their

fragments derived by reduction of disulfide bonds. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003, 6: 635-647.

38. Van Baar B.L.M., Hulst A.G., Wils E.R.J. Characterisation of cholera toxin by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Toxicon.* 1999, 1: 85-108.
39. Van Baar B.L.M., Hulst A.G., Roberts B. et al. Characterization of tetanus toxin, neat and in culture supernatant, by electrospray mass spectrometry. *Analytical Biochemistry.* 2002, 2: 278-289.

Поступила 05.07.17

Контактная информация: Чемисова Ольга Сергеевна, к.б.н.,  
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863) 240-35-94

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Е.В.Шубникова, Л.К.Мерينو́ва, Т.В.Сени́на, Е.В.Коро́ль, О.А.Мерино́ва*

## **БИОПЛЕНКИ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ И ИХ РОЛЬ В РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Обзор содержит данные литературы, касающиеся основных вопросов образования биопленок возбудителями мелиоидоза и сапа (*Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*). Рассмотрена роль известных структурных элементов клеток буркхольдерий (жгутиков, пилей IV типа, ЛПС), а также белков-автопереносчиков адгезинов в прикреплении бактерий к поверхностям, формировании микроколоний и образовании биопленки. Представлены материалы исследования генетических регуляторных механизмов (QS-систем, RpoE-сигма фактора, c-di-GMP, двухкомпонентной системы трансдукции сигналов TCS) и данные о дифференциально экспрессирующихся генах, имеющих отношение к формированию биопленки *B. pseudomallei*. Приведены результаты изучения роли биопленок в вирулентности и резистентности к антибиотикам патогенных буркхольдерий и их значения в развитии хронических форм и рецидивирующего течения мелиоидоза и сапа.

*Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 101–111*

Ключевые слова: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, биопленки, резистентность к антибиотикам

*Е.В.Шубникова, Л.К.Мерино́ва, Т.В.Сени́на, Е.В.Коро́ль, О.А.Мерино́ва*

## **BIOFILMS OF PATHOGENIC BURKHOLDERIA AND THEIR ROLE IN RESISTANCE TO ANTIBIOTICS**

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

The review contains the current knowledge on the main issues of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* biofilm formation. The role of known structural elements of *Burkholderia* cells (flagella, type IV pili, LPS), as well as autotransporter adhesin proteins in the attachment of bacteria to surfaces, the formation of microcolonies and biofilm is described. The review also includes information of genetic regulatory mechanisms (QS-systems, RpoE-sigma factor, c-di-GMP, two-component signal transduction system), differentially expressed genes related to the formation of *B. pseudomallei* biofilm, role of biofilms in the virulence and resistance to antibiotics of pathogenic *Burkholderia* and their significance for the chronic processes and recurrent course of melioidosis and glanders.

*Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 101–111*

Key words: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, biofilms, resistance to antibiotics

Патогенные буркхольдерии (*Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*), возбудители мелиоидоза и сапа, тяжелых инфекционных заболеваний человека и животных. Между этими видами буркхольдерий существует высокая степень генетического родства, тем не менее, они отличаются по ряду биологических свойств, определяющих, главным образом, их адаптационный потенциал и экологическую пластичность [23]. Известно, что *B. pseudomallei*, сапрофитный микроорганизм, патоген с широким кругом хозяев, естественной средой обитания которого являются почва и вода эндемичных регионов Юго-Восточной Азии, Северной Австралии, Западной и Центральной Африки [8]. Принципиальное отличие возбудителя сапа от *B. pseudomallei* заключается в его облигатной паразитической природе, сформировавшейся в процессе адаптации к организму млекопитающих [23, 30].

Лечение мелиоидоза и сапа, особенно в острой форме, сопряжено со значительными трудностями, связанными, с одной стороны, с высокой природной резистентностью возбудителей к антибактериальным препаратам, с другой — со способностью их к внутриклеточному персистированию в макроорганизме [18, 35].

В свете современных представлений о биологии микроорганизмов стало очевидным, что большинство бактерий в окружающей среде и организме человека существует преимущественно не в планктонном (свободном) состоянии, а образует сообщества (биопленки).

Биопленка представляет собой высокоорганизованное сообщество, образованное клетками одного или нескольких видов бактерий, адгезированных к поверхности (абиотической или биотической) и друг к другу, заключенных в экзополимерный матрикс и имеющих фенотип, отличный от планктонных клеток, позволяющий им адаптироваться и выживать как во внешней среде, так и в макроорганизме [3, 11]. В первую очередь, биопленочная форма существования обеспечивает бактериям защиту от неблагоприятных воздействий, таких как антибактериальные средства, дезинфицирующие вещества и факторы иммунной системы. Считается, что образование биопленок имеет отношение к патогенезу более чем 80% инфекционно-воспалительных заболеваний. Формирование бактериальных сообществ в очаге воспаления может приводить к хронизации инфекционного процесса, развитию осложнений и сопровождается неудовлетворительным результатом антибиотикотерапии [3, 10].

В ряде исследований *in vitro* и *in vivo* показана способность возбудителей мелиоидоза и сапа к образованию микроколоний и биопленок. Предполагают, что образование биопленок не играет существенной роли для вирулентности *B. pseudomallei*, но связано с развитием рецидивов и устойчивости к антибактериальным препаратам [40].

Известно, что процесс формирования биопленки состоит из нескольких последовательных стадий с общими особенностями, независимо от вида микроорганизма: стадия первичного прикрепления планктонных клеток к субстрату из окружающей среды и образование монослоя (обратимая адгезия); стадия необратимого связывания с поверхностью и начало формирования микроколоний (фиксация); стадия интенсивной пролиферации и синтеза экстрацеллюлярного полимерного матрикса (созревание); стадия дифференциации микроколоний в зрелые биопленки (рост); стадия распространения или дисперсии (открепление от поверхности зрелой биопленки отдельных клеток, их перенос и прикрепление в отдаленных тканях макроорганизма с образованием новых колоний) [14, 22].

Адгезия грамотрицательных бактерий к абиогенным и биогенным поверхностям — ключевой этап в биопленочном процессе, обусловленный неспецифическими физико-химическими взаимодействиями клеток с поверхностью (электростатическими, гидрофобными, силами Ван-дер-Ваальса) и специфическими контактами белков-адгезинов с рецепторами эукариотических клеток [14].

Важными элементами в процессе специфической адгезии и колонизации субстратов планктонными бактериями *V. pseudomallei* являются жгутики, фимбрии (пили IV типа), белки-автотранспортеры (BoaA, BoaB) и липополисахариды (ЛПС).

Жгутиковая подвижность способствует первичному прикреплению бактерий, образованию и распространению клеточного монослоя, облегчая перемещение буркхольдерий к поверхностям. Было показано, что мутант *V. pseudomallei* (MM35) по структурному гену флагеллина *fliC*, утративший жгутиковую подвижность, характеризуется более низким уровнем образования биопленки, чем штамм дикого типа [12, 41].

Фимбрии (пили) также могут принимать участие как в непосредственной адгезии *V. pseudomallei* к субстратам (например, к клеткам макроорганизма), так и в межклеточных контактах при формировании возбудителем мелиоидоза микроколоний и биопленок. Было продемонстрировано, что мутации в генах, кодирующих пили IV типа, влияют на способность *V. pseudomallei* прикрепляться к эукариотическим клеткам и проявлять вирулентность в отношении нематод и мышей. У мутанта *V. pseudomallei*, не формирующего пили, одновременно наблюдается снижение как адгезивных, так и вирулентных свойств [17].

При исследовании штаммов *V. pseudomallei* UM1 и UM6, отличающихся по способности к образованию биопленок, у штамма UM6 с высокой биопленкообразующей способностью была обнаружена гиперэкспрессия генов, ответственных за образование фимбрий, включая три шаперонных кластера генов (BPSL1799 — BPSL1801; BPSL2026 — BPSL2028; BPSS0091 — BPSS0093), формирующих шаперонный путь фимбриеобразования (CUP), что предполагает их участие в адгезии возбудителя к абиотическим поверхностям. При этом штамм UM1 со сниженной способностью к образованию биопленки формировал мукоидный морфотип колоний и характеризовался низким уровнем экспрессии пилей, фимбрий, липопротеинов, полисахаридов и EPS-связанных генов по сравнению с UM6, образующим колонии шероховатого типа [9].

На ранних стадиях образования буркхольдериями биопленок значительную роль играют также тримерные белки-автотранспортеры адгезинов (ТАА). Lazar Adler N.R. et al. сообщают, что геном *V. pseudomallei* K96243 содержит гены девяти ТАА, среди которых охарактеризованы только два белка — BoaA и BoaB, участвующих в адгезии возбудителя к эукариотическим клеткам. Показано, что мутации в генах *boaA* и *boaB* приводят к снижению адгезивных свойств *V. pseudomallei* к эукариотическим клеткам хозяина, в то время как экспрессия рекомбинантных белков BoaA и BoaB в *Escherichia coli* повышает адгезивные свойства микроорганизма [27].

Экспериментально установлено непосредственное влияние тримерных белков-автотранспортеров адгезинов на образование биопленок возбудителем мелиоидоза. Инсерционный мутант, дефектный по гену *bpss1439* (гипотетического ТАА), демонстрировал сниженную биопленкообразующую способ-

ность и вирулентность для мышей по сравнению с диким типом *B. pseudomallei* 10276. Кроме того, мутант *B. pseudomallei* обладал низкой способностью к адгезии и формированию микроколоний на абиотических поверхностях [4, 26].

Липополисахариды — основные компоненты наружной мембраны бактериальных клеток, придающие им гидрофильность, играют важную роль в первоначальном прикреплении клеток к субстратам и в развитии зрелой биопленки за счет взаимодействий клеток с другими клетками и с компонентами матрикса.

В исследованиях Yuen C.W. et al. показано, что мутантные штаммы *B. pseudomallei* с нарушенным биогенезом капсулы и липополисахарида характеризуются различной способностью к образованию биопленок. Интересно, что бескапсульный мутант *B. pseudomallei* wcbB (ген гликозилтрансферазы, участвующий в синтезе капсульного полисахарида) демонстрировал уровень формирования биопленки аналогичный дикому штамму. Наряду с этим, бескапсульный мутант *B. pseudomallei* wzm (ген белка ABC транспортера капсульного полисахарида) характеризовался сниженной биопленкообразующей способностью, повышенной чувствительностью к окислительному стрессу и высушиванию при выращивании на минимальной питательной среде, но не в LB бульоне. Сканирующая электронная микроскопия мутантных бактериальных клеток выявила дефекты в структуре мембран. Вероятно, транспортный мембранный белок участвует в процессе биопленкообразования при определенных условиях среды [47].

После адгезии клетки *B. pseudomallei* прекращают активно передвигаться и начинают интенсивно размножаться с образованием монослоя. Формируются многоклеточные скопления (микроколонии), которые синтезируют внеклеточный биополимерный матрикс.

В ряде исследований методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии установлено, что в процессе колонизации биотических и абиотических поверхностей *B. pseudomallei* продуцирует высокогидратированный гликокаликс [21, 46]. С помощью хромато-массспектрометрического анализа (ГХ-МС) экзополисахарида *B. pseudomallei* Mongkolroob R. et al. показали, что в его состав входят молекулы глюкозы, галактозы, маннозы, рамнозы в соотношении 1.00:1.31:0.82:0.30 [32].

Микроколонии дифференцируются в зрелые биопленки, приобретая характерную форму. На периферии биопленки находятся быстрорастущие клетки, внутри биопленки, где создаются анаэробные условия, клетки растут медленнее. Ввиду того, что плотность бактериальной популяции быстро увеличивается, к регуляции биопленочного процесса подключаются коммуникативные системы и формируется резистентный фенотип.

Установлено, что образование и развитие биопленок — динамический многостадийный процесс со сложной системой регуляции, основанной на межклеточной коммуникации. Наиболее изученными являются системы quorum sensing (QS), обнаруженные у большинства грамотрицательных патогенных и фитопатогенных бактерий, принадлежащих к родам *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodobacter*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia*. QS-системы регуляции экспрессии генов функционируют с участием молекул аутоиндукторов из семейства ацилгомосеринлактонов (AHL); синтез аутоиндукторов происходит в ответ на изменение плотности популяции [1].

В настоящее время показано, что у патогенных буркхольдерий генетически регулируемый процесс образования биопленок контролируется посредством коммуникативных систем [19].

Геном *V. pseudomallei* кодирует три регуляторные ацилгомосеринлактонные системы quorum sensing (AHL QS), гомологичные генетической системе *luxI-luxR* кворум — зависимой системы *BpsI1-BpsR1* (QS-1), *BpsI2-BpsR2* (QS-2) и *BpsI3-BpsR3* (QS-3) *Vibrio fischeri* [42, 43].

QS-1 или система *BpsI1-BpsR1*, где *BpsI1* (N-ацилгомосеринлактонсинтаза), продуктом которой является N-(октаноил)-лактон гомосерина ( $C_8$ HSL), а *BpsR1* — белок регулятор транскрипции;  $C_8$ HL, связываясь с *BpsR1*, активирует его, в результате чего изменяется экспрессия QS-зависимых генов-мишеней [19, 24].

Система QS-2 включает *BpsI2-BpsR2*, продуцирует N-(3)-гидроксидеканоил-лактон гомосерина (3ОН $C_{10}$ -HSL), и QS-3 состоит из *BpsI3-BpsR3* и N-(3)-гидроксиоктаноил-лактон гомосерина (3ОН $C_8$ -HSL). Возбудители сапа и мелиоидоза используют гомологичные системы AHL QS. Однако в процессе адаптивной эволюции *V. mallei* потерял большую геномную область, содержащую гены QS-2 и поэтому содержит только системы QS-1 и QS-3 (*BmaI1-BmaR1* и *BmaI3-BmaR3*) [15, 16, 31].

Экспериментально показано, что QS-1 *V. pseudomallei* KHW необходима для образования биопленок. Мутанты *V. pseudomallei* с выключенными *BpsI1-BpsR1* не могут синтезировать  $C_8$ HSL и характеризуются сниженной способностью к образованию биопленок, которая может быть восстановлена до уровня дикого типа внесением экзогенного лактона  $C_8$ HSL [19]. Наряду с этим установлено, что внеклеточная секреция AHLs у *V. pseudomallei* зависит от эффлюкс-системы *BpeAB-OrpB*, ответственной за множественную лекарственную устойчивость и ее обратного регулятора *BpeR* [7].

Отмечено, что индукция экспрессии генов *bpeAB-orpB* происходит в стационарной фазе роста культур, а также *in vitro* при добавлении в среду лактонов  $C_8$ HSL или  $C_{10}$ HSL. Изучение мутантов *V. pseudomallei* *bpeAB* или штаммов с гиперэкспрессией *bpeR* показало, что эффлюкс-система необходима для образования биопленок, синтеза сидерофоров и фосфолипазы C. Кроме того мутанты, лишённые этой системы, обладали пониженной инвазивностью и цитотоксичностью для эукариотических клеток легочного эпителия и макрофагов, а снижение инвазивности частично восполнялось добавлением AHL,  $C_8$ HSL [7].

У *V. pseudomallei* была выявлена еще одна QS-подобная система, имеющая отношение к продукции, высвобождению и распознаванию сигнальных молекул 4-гидрокси-3-метил-2-алкилхинолона (HMAQ). В геноме *V. pseudomallei* K96243 был идентифицирован оперон, названный *hmqABCDEFGHI* (BPSS0481—BPSS0487), гомологичный генам биосинтеза HMAQ у *Pseudomonas aeruginosa*, регулирующим экспрессию генов, ответственных за вирулентность, образование биопленок и, таким образом, играющих ключевую роль в развитии инфекции, вызываемой *P. aeruginosa*.

Мутант *V. pseudomallei* *hmqA* не синтезировал HMAQ и имел измененную морфологию колоний, повышенный уровень продукции эластазы, который снижался до уровня штамма дикого типа при добавлении экзогенного HMAQ. Роль хинолоновой кворум системы в формировании биопленок *V. pseudomallei* еще предстоит выяснить [13, 45].

Кроме того, установлено, что QS системы связаны с вирулентностью как

*V. pseudomallei*, так и *V. mallei*. Мутантные штаммы этих микроорганизмов с инактивированными генами *luxI* или *luxR* были аттенуированны по вирулентности на нескольких моделях инфекций и демонстрировали абберантную внутриклеточную репликацию [20, 31, 44]. Некоторые исследователи предполагают, что QS системы могут играть немаловажную роль в развитии сапа и мелиоидоза, а также в регуляции перехода инфекционного процесса от острого к хроническому течению. Не известно, какой QS-контролируемый фактор или группа факторов реализуются в макроорганизме, однако описание этих факторов позволяет прийти к более глубокому пониманию патогенеза сапа и мелиоидоза [31].

Другим регуляторным механизмом, который потенциально может играть роль в образовании буркхольдериальных биопленок, является альтернативный сигма-фактор *RpoE* (субъединица РНК-полимеразы). Сигма-фактор (*RpoE*) *in vivo* является глобальным регуляторным фактором экспрессии генов при переходе клеток к стационарной фазе роста, в том числе, в условиях стресса. Инактивация оперона *groE* приводит к снижению способности *V. pseudomallei* образовывать биопленки, а также к понижению вирулентности и устойчивости к окислительному стрессу. Было показано, что у мутантных по генам *groE* штаммов *V. pseudomallei* на 50% снижается биопленкообразующая способность по сравнению с диким типом [18, 19, 25].

Существенная роль в регуляции процессов образования и отторжения биопленки у возбудителя мелиоидоза отводится циклическому дигуанозинмонофосфату (*c-di-GMP*). Уровень *c-di-GMP* регулируется двумя классами ферментов — дигуанилатциклазами, которые синтезируют *c-di-GMP*, а также фосфодиэстеразами, которые гидролизуют *c-di-GMP*, превращая его в неактивную форму дигуанозинмонофосфата, который, в свою очередь, выступает в качестве вторичного мессенджера и влияет на синтез внеклеточного матрикса и адгезию бактерий.

Известно, что низкий уровень *c-di-GMP* повышает способность бактерий к планктонному образу жизни, усиливает жгутиковую подвижность, продукцию факторов патогенности, а высокий, наоборот, способствует снижению подвижности, повышению продукции экзополисахаридов и агрегации клеток (биопленкообразанию) [34].

Показано, что мутант *V. pseudomallei* КНW *cdpA*, дефектный по гену *c-di-GMP*-фосфодиэстеразы (фермента регулирующего уровень циклического дигуанозинмонофосфата в клетке) с высоким уровнем синтеза *c-di-GMP*, характеризовался снижением подвижности, цитотоксичности и вирулентности, а также повышенной агрегацией, продукцией внеклеточного экзополисахарида и высоким уровнем биопленкообразования [28].

К коммуникативным системам также относят системы, реагирующие не только на плотность бактериальной популяции, но и на условия, сигнализирующие о стрессовых ситуациях, с которыми сталкиваются бактерии. Chin C.Y. et al. [9] при проведении глобального транскрипционного анализа генов, ответственных за формирование биопленочного фенотипа у штаммов *V. pseudomallei*, обнаружили 563 дифференциально экспрессирующихся гена, имеющих отношение к образованию биопленок, что составляет около 9,5 % всего генома возбудителя мелиоидоза. Основываясь на транскрипционных профилях штаммов с высоким уровнем формирования биопленок, авторы высказали предположение, что у *V. pseudomallei* в ответ на изменение условий среды (рН, температуры, осмотического давления и концентрации кислорода)

активируются различные двухкомпонентные системы передачи (трансдукции) сигнала (TCS).

В условиях стрессового воздействия на клеточные мембраны *B. pseudomallei*, вероятно, активируется система RcsB/RcsC TCS, которая регулирует транскрипцию генов, кодирующих белки, участвующие в изменении поверхностных структур клеток, а именно, капсульных полисахаридов, липопротеинов, биогенезе клеточной оболочки и синтезе фосфолипидов и жирных кислот, тем самым обеспечивая выживание *B. pseudomallei* в организме хозяина. Кроме того, у штамма *B. pseudomallei* с высокой биопленкообразующей способностью наблюдалось значительное усиление продукции двух гипотетических белков (BPSL0616 и BPSL0617), относящихся к суперсемейству CRP/FNR. Один из них (BPSL0617) предположительно ортологичен белку регулятору транскрипции Bcam1349, который путем связывания с c-di-GMP регулирует образование биопленки, индуцируя экспрессию генов, кодирующих ферменты для синтеза целлюлозы и фимбрий у *Burkholderia cenocepacia* в ответ на изменение уровня c-di-GMP [9].

Из перечисленных свойств биопленок клиническое значение имеют высокая устойчивость к антибактериальным препаратам, внешним воздействиям и факторам иммунной системы макроорганизма. Важным является тот факт, что в составе биопленок патогенные буркхольдерии приобретают высокую устойчивость к антибактериальным препаратам, применяемым для лечения сапа и мелиоидоза.

В настоящее время многими исследователями показано значительное повышение антибиотикорезистентности к цефтазидиму, имипенему, доксициклину, ко-тримоксазолу и амоксиклаву штаммов *B. pseudomallei*, интегрированных в биопленки, по сравнению с планктонными культурами [5, 6, 36].

Предполагают, что повышенная резистентность бактерий в биопленке может определяться рядом факторов: барьерной функцией матрикса, затрудняющего или замедляющего диффузию препаратов во внутренние слои биопленки; присутствием в биопленках метаболически неактивных клеток-персистеров, нечувствительных к антибактериальным средствам; более эффективной индукцией систем транспорта и ферментативного расщепления антибактериальных препаратов; селекцией штаммов бактерий с множественной антибиотикорезистентностью [2, 33].

В работе Pibalpakdee P. et al. показано, что биопленки *B. pseudomallei* являются барьером для диффузии имипенема и цефтазида. При сравнении скорости диффузии антибактериальных препаратов через биопленки штаммов с низкой и высокой интенсивностью биопленкообразования установлено замедление проникновения имипенема и цефтазида в биопленку штамма, характеризующегося высоким уровнем биопленкообразования. При этом авторами отмечена низкая эффективность антибактериальных препаратов в отношении биопленочных буркхольдерий обоих штаммов [33]. В исследованиях Castelo-Branco D.S. et al. обнаружено усиление действия антибактериальных препаратов, применяемых при лечении мелиоидоза, на зрелые биопленки *B. pseudomallei* при их сочетании с фарнезолом (сесквитерпеновым спиртом). Предполагается, что под воздействием фарнезола происходит дезорганизация матрикса биопленок, что, в свою очередь, облегчает проникновение антибактериальных препаратов в толщу биопленок [6].

Экспериментально установлено, что в биопленках грамотрицательных бактерий происходит более эффективная индукция (гиперэкспрессия) эф-

флюксных систем выведения и ферментативных систем расщепления антибактериальных препаратов по сравнению с планктонными бактериями [37, 39].

В этой связи, интересной является работа Sidrim J.J. et al. по изучению влияния на планктонные бактерии и биопленки *B. pseudomallei* антибактериальных препаратов в сочетании с ингибитором эффлюкс-систем — прометазинном. Исследователи провели сравнительную оценку чувствительности планктонных и биопленочных буркхольдерий к гентамицину, эритромицину, ципрофлоксацину и ко-тримоксазолу, являющихся субстратами для эффлюкс-систем, в сочетании с прометазинном и без него. Было установлено, что ингибитор эффлюкс-систем повышает эффективность антибактериальных препаратов в отношении как биопленок *B. pseudomallei*, так и планктонных бактерий. Кроме того, с помощью электронной микроскопии были продемонстрированы деструктивные изменения 48-часовых биопленок *B. pseudomallei* под воздействием прометазина (деформация, фрагментация, уменьшение биомассы) [38].

По мнению авторов, ингибиторы эффлюксных систем могут рассматриваться как потенциальные средства для преодоления биопленочной устойчивости. Однако механизмы их антибиопленочной активности еще предстоит изучить. Вероятно, под действием ингибиторов происходит накопление метаболитов в клетке, а также снижение транспорта компонентов кворум-систем, что приводит к нарушению динамического процесса биопленкообразования и, как следствие, к снижению резистентности бактериальной популяции. Наряду с этим, изменения в структуре биопленки могут способствовать лучшему проникновению антибактериальных препаратов.

Неоднородность условий среды, возникающих в разных слоях биопленки (разница в доступе кислорода, питательных веществ, pH), создает предпосылки для одновременного существования активно растущих клеток (периферия биопленки), клеток со сниженным уровнем метаболизма — персистеров, а также метаболически неактивных клеток (покоящихся и неделящихся), расположенных во внутренних слоях. В глубоких слоях биопленки бактерии, испытывая дефицит питательных веществ и кислорода (анаэробные условия), переходят в покоящееся или некультивируемое состояние, а медленно растущие или нерастущие клетки оказываются малочувствительными к воздействию антибактериальных средств. Показано, что *B. pseudomallei* при формировании биопленок в анаэробных условиях может утилизировать нитраты в качестве альтернативного акцептора электронов, используя путь денитрификации. Предполагают, что *B. pseudomallei* может реагировать на условия недостатка кислорода с помощью двухкомпонентной системы  $\text{NarX/NarL TCS}$ , через активацию оперона генов, ответственных за синтез специфических для нитратного дыхания ферментов (нитратредуктаз). Анаэробные субпопуляции биопленок возбудителя мелиоидоза обладают более выраженной способностью к адаптации, приобретая устойчивость к факторам окружающей среды, а также резистентность к действию антибактериальных препаратов, что в организме хозяина приводит к персистенции возбудителя и хронизации процесса [9].

Связь между хроническим рецидивирующим течением мелиоидозной инфекции и способностью *B. pseudomallei* к формированию биопленок выявлена в работе Limmathurotsakul D. et al. Установлено, что клинические изоляты *B. pseudomallei*, вызывающие хроническую инфекцию, обладают более

высокой биопленкообразующей способностью по сравнению с изолятами, выделенными от больных с острой формой мелиоидоза [29].

Предположительно биопленки патогенных буркхольдерий могут представлять собой постоянный источник персистирующих клеток, время от времени высвобождающихся из матрикса и диссеминирующих в ткани макроорганизма, приводя к формированию очагов хронической инфекции и способствуя рецидивированию заболевания [9, 36].

Таким образом, из приведенных в обзоре данных следует, что способность образовывать биопленки играет важную роль в формировании у патогенных буркхольдерий резистентности к антибиотикам и одновременно оказывает существенное влияние на характер инфекционного процесса. Очевидно, что повышению эффективности антибиотикотерапии мелиоидоза и сапа будет способствовать разработка и внедрение новых подходов, намечающихся в связи с изучением у патогенных буркхольдерий биопленкообразования: создание средств, нарушающих межклеточный обмен информацией (ингибиторы коммуникативных систем); применение в составе комплексной терапии препаратов, блокирующих начальные стадии образования биопленок (ингибиторов адгезии бактерий к поверхности); применение веществ, блокирующих синтез или разрушающих внеклеточный матрикс биопленки и, тем самым, облегчающих доступ антибактериальных средств; использование препаратов, обеспечивающих эффективную комбинированную терапию мелиоидоза и сапа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гинцбург А.Л., Ильина Т.С., Романова Ю.М. «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий. Журн. микробиол. 2003, 5: 86-93.
2. Евдокимова Н.В., Черненкокая Т.В. Персистирующие клетки микроорганизмов — новый взгляд на старую проблему. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2013, 15 (3): 192-197.
3. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журн. микробиол. 2011, 3: 99-109.
4. Balder R., Lipski S., Lazarus J.J. et al. Identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* adhesins for human respiratory epithelial cells. BMC Microbiology. 2010, 10: 250.
5. Bandeira T., Moreira C.A., Brilhante R.S. et al. In vitro activities of amoxicillin-clavulanate, doxycycline, ceftazidime, imipenem, and trimethoprim-sulfamethoxazole against biofilm of Brazilian strains of *Burkholderia pseudomallei*. Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57 (11): 5771-5773.
6. Castelo-Branco D.S., Riello G.B., Vasconcelos D.C. et al. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. J. Applied Microbiology. 2016, 120 (3): 600-606.
7. Chan Y.Y., Chua K.L. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB—OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. J. Bacteriol. 2005, 187: 4707-4719.
8. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. Clin. Microbiol. 2005, 18 (2): 383-416.
9. Chin C.Y., Hara Y., Ghazali A.K. et al. Global transcriptional analysis of *Burkholderia pseudomallei* high and low biofilm producers reveals insights into biofilm production and virulence. BMC Genomics. 2015, 16 (1): 471.
10. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistence infections. Science. 1999, 284 (5418): 1318-1322.
11. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Molecul. Biol. 2000, 64 (4): 847-867.

12. DeShazer D., Brett P.J., Carlyon R. et al. Mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei* with Tn5-OT182: isolation of motility mutants and molecular characterization of the flagellin structural gene. *J. Bacteriol.* 1997, 179: 2116-2125.
13. Diggle S.P., Lumjiaktase P., Dipilato F. et al. Functional genetic analysis 486 reveals a 2-Alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia 487 pseudomallei* and related bacteria. *Chem Biol.* 2006, 13: 701-710.
14. Donlan R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, 8 (9): 881-890.
15. Duerkop B.A., Herman J.P., Ulrich R.L. et al. The *Burkholderia mallei* BmaR3-BmaI3 quorum-sensing system produces and responds to N-3-hydroxy-octanoyl homoserine lactone. *J. Bacteriol.* 2008, 190: 5137-5141.
16. Duerkop B.A., Ulrich R.L., Greenberg E.P. Octanoyl-homoserine lactone is the cognate signal for *Burkholderia mallei* BmaR1-BmaI1 quorum sensing. *J. Bacteriol.* 2007, 189: 5034-5040.
17. Essex-Lopresti A.E., Boddey J.A., Thomas R. et al. A type IV pilin, PilA, contributes to adherence of *Burkholderia pseudomallei* and virulence in vivo. *Infect. Immun.* 2005, 73 (2): 1260-1264.
18. Galyov E.E., Brett P.J., De Shazer D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010, 64: 495-517.
19. Gamage A.M., Shui G., Wenk M.R. et al. N-Octanoylhomoserine lactone signalling mediated by the BpsI-BpsR quorum sensing system plays a major role in biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology.* 2011, 157: 1176-1186.
20. Horton R.E., Grant G.D., Matthews B. et al. Quorum sensing negatively regulates multinucleate cell formation during intracellular growth of *Burkholderia pseudomallei* in macrophage-like cells. *PLoS One.* 2013, 8: e63394.
21. Kamjumphol W., Chareonsudjai S., Chareonsudjai P. et al. Environmental factors affecting *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2013, 44 (1): 72-81.
22. Karatan E., Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol.* 2009, 73 (2): 310-347.
23. Kim H.S., Schell M.A., Yan Yu et al. Bacterial genome adaptation to niches: Divergence of the potential virulence genes in three *Burkholderia* species of different survival strategies. *BMC Genomics.* 2005, 6: 174.
24. Kiratisin P., Sanmee S. Roles and interactions of *Burkholderia pseudomallei* BpsIR quorum-sensing system determinants. *J. Bacteriol.* 2008, 190: 7291-7297.
25. Korbsrisate S., Vanaporn M., Kerdsuk P. et al. The *Burkholderia pseudomallei* RpoE (AlgU) operon is involved in environmental stress tolerance and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters.* 2005, 252: 243-249.
26. Lazar Adler N.R., Dean R.E., Saint R.J. et al. Identification of a predicted trimeric autotransporter adhesin required for biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS One.* 2013, 8 (11): e79461.
27. Lazar Adler N.R., Stevens J.M., Stevens M.P. et al. Autotransporters and their role in the virulence of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Frontiers in Microbiology* 2011, 2: 15.
28. Lee H.S., Gu F., Ching S.M. et al. CdpA is a *Burkholderia pseudomallei* cyclic di-GMP phosphodiesterase involved in autoaggregation, flagellum synthesis, motility, biofilm formation, cell invasion, and cytotoxicity. *Infection and Immunity.* 2010, 78 (5): 1832-1840.
29. Limmathurotsakul D., Paeyao A., Wongratanacheewin S. et al. Role of *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation and lipopolysaccharide in relapse of melioidosis introduction. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014, 20 (11): O854-O856.
30. Losada L., Ronning C.M., DeShazer D. et al. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements. *Genome Biol. Evolution.* 2010, 2: 102-116.
31. Majerczyk C.D., Brittnacher M.J., Jacobs M.A. et al. Cross-species comparison of the *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia mallei* quorum-sensing regulons. *J. Bacteriol.* 2014, 196 (22): 3862-3871.
32. Mongkolrob R., Taweechaisupapong S., Tungpradabkul S. Correlation between biofilm pro-

- duction, antibiotic susceptibility and exopolysaccharide composition in *Burkholderia pseudomallei* bpsI, ppk, and rpoS mutant strains. *Microbiology and Immunology*. 2015, 59 (11): 653-663.
33. Pibalpakdee P., Wongratanacheewin S., Taweekaisupapong S. et al. Diffusion and activity of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei* biofilms. *J. Antimicrob. Agents*. 2012, 39 (4): 356-359.
  34. Plumley B.A., Martina K. H., Borleea G. I. et al. Thermoregulation of biofilm formation in *Burkholderia pseudomallei* is disrupted by mutation of a putative diguanylate cyclase. *J. Bacteriol*. 2017, 199 (5): e00780-16.
  35. Puthuceary S.D. Melioidosis in Malaysia. *Med. J. Malaysia*. 2009, 64: 266-274.
  36. Sawasdidoln C., Taweekaisupapong S., Serm Swan R.W. et al. Growing *Burkholderia pseudomallei* in biofilm stimulating conditions significantly induces antimicrobial resistance. *PLoS One*. 2010, 5(2): 1-10.
  37. Schweizer H.P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. *Future Microbiol*. 2012, 7: 1389-1399.
  38. Sidrim J. J., Vasconcelos D. C., Riello G. B. et al. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. *Biofouling*. 2017, 33 (1): 88-97.
  39. Soto S.M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*. 2013, 4: 223-229.
  40. Taweekaisupapong S., Kaewpa C., Arunyanart C. et al. Virulence of *Burkholderia pseudomallei* does not correlate with biofilm formation. *Microb. Pathog*. 2005, 39 (3): 77-85.
  41. Tunpiboonsak S., Mongkolrob R., Kitudomsab K. et al. Role of a *Burkholderia pseudomallei* polyphosphate kinase in an oxidative stress response, motilities, and biofilm formation. *J. Microbiol*. 2010, 48 (1): 63-70.
  42. Ulrich R.L., Deshazer D., Brueggemann E.E. et al. Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Med. Microbiol*. 2004, 53: 1053-1064.
  43. Ulrich R.L., Deshazer D., Hines H.B. et al. Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infect. Immun*. 2004, 72: 6589-6596.
  44. Valade E., Thibault F.M., Gauthier Y.P. et al. The PmlI-PmlR quorum-sensing system in *Burkholderia pseudomallei* plays a key role in virulence and modulates production of the MprA protease. *J. Bacteriol*. 2004, 186: 2288-2294.
  45. Vial L., Lepine F., Milot S. et al. *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *J. Bacteriol*. 2008, 190: 5339-5352.
  46. Vorachit M., Lam K., Jayanetra P. et al. Electron microscopy study of the mode of growth of *Pseudomonas pseudomallei* in vitro and in vivo. *J. Trop. Med. Hyg*. 1995, 98: 379-391.
  47. Yuen C.W., Ong E.B., Mohamad S. et al. Construction and characterization of a *Burkholderia pseudomallei* wzm deletion mutant. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2012, 22: 1336-1342.

*Поступила 05.09.17*

Контактная информация: Меринова Людмила Константиновна, д.м.н.,  
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442) 37-36-74

---

## **ВЛИЯНИЕ МИКРОФЛОРЫ ЖКТ НА ОЖИРЕНИЕ. ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИКОВ КАК ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

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

В настоящее время проблема излишнего веса и ожирения, согласно данным ВОЗ, получает распространение не только в странах с большим уровнем дохода, но и во всех остальных. Такая ситуация вызывает беспокойство и заставляет ученых рассматривать ожирение со всех сторон, вовлекая в изучение этой проблемы специалистов всех областей. Микробиом человека является его неотъемлемой частью. Однако его энергетической функции до недавнего времени придавалось небольшое значение. Его участие в обмене короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) играет ключевую роль в энергетическом обмене энтероцитов, обеспечивая 70% энергии, в общем же метаболизме около 10% энергии синтезируется из КЖК. Короткоцепочечные жирные кислоты также влияют на активность аденозинмонофосфат-зависимой протеинкиназы, стимулируют выработку лептина, участвуют в синтезе холестерина. Микробиом регулирует синтез глюкагон-подобного пептида, обладающего контринсулярным эффектом, правильный состав микробиома позволяет снизить уровень неспецифического воспаления; бифидо- и лактобациллы синтезируют изомеры линолевой кислоты, которые обладают противовоспалительным действием. В данной работе рассматривается целесообразность применения про-, пре- и эубиотических препаратов для лечения ожирения, а также состояний, которые могут осложнять его течение (атеросклероз, гипертония, депрессия).

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 112—119

Ключевые слова: микрофлора ЖКТ, ожирение, пробиотики

*A.M.Karamzin, N.M.Tereshin*

## **GASTROINTESTINAL MICROBIOTA AND OBESITY. APPROVING PROBIOTICS AS DRUGS FOR TREATMENT OF OBESITY**

Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Once considered as a problem only in high income countries, overweight and obesity now rise in low- and middle-income countries, particularly in urban settings. This situation accelerates the development of different approaches to investigation of obesity, makes the medical community look for new approaches to investigation of the obesity. Human's microbiome is an imprescriptible part of it. Nevertheless it's energetic function wasn't fully appraised. Microbiome takes part in shorty chain fatty acids metabolism. Bacterial cells provide over 70% of daily energy for enterocytes, it's part in general metabolism takes over 10%. ScFA can change activity of adenosine monophosphate-dependent protein kinase, stimulate leptin synthesis. Microbiome regulates synthesis of glucagon-like peptide, which has contrinsular effect. Right composition of microbiome reduces non-specific inflammation, produces isomers of linoleic acid, which can cause reduction of inflammation too. This article appraises probiotics as drugs for treatment to obesity and eradication of some conditions that can arise during obesity (atherosclerosis, hypertension, depression).

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 112—119

Key words: gastrointestinal microbiota, obesity, probiotics

В последнее время появляется все больше и больше научных работ, посвященных микрофлоре организма человека, что свидетельствует о возросшем интересе к ее исследованию. Ее связь с патогенезом множества заболеваний

доказана уже давно, а новый подход к изучению таких заболеваний, как сахарный диабет (СД) [12, 32], ожирение, синдром раздраженного кишечника [10], аутоиммунные заболевания [32], различные аллергии [18], воспалительные заболевания кишечника (болезнь Крона) [22], неспецифический язвенный колит [26], позволяет открывать новые звенья в развитии этих заболеваний и предлагать альтернативные варианты для их лечения и профилактики. Даже при некоторых нервных расстройствах обнаруживается «след» микрофлоры. При изучении этих болезней во внимание стали брать не только местные ее эффекты (такие как регуляция проницаемости стенки, создание колонизационной резистентности, иммуностимулирующая функция), но и системные, то есть регуляция метаболических путей.

Все чаще проводятся исследования, в которых изучается влияние микрофлоры на процессы, протекающие в организме. При этом уделяется внимание ее составу, что дает возможность разработки терапии и профилактики вышеперечисленных заболеваний.

В работе Ridaura V.K. et al. [28] был проведен эксперимент: от двух близнецов, дискордантных по ожирению, микрофлору пересадили двум стерильным мышам, которых содержали на диете с минимальным количеством жира и максимальным количеством полисахаридов по версии NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey). Несмотря на одинаковый рацион питания, мыши с микрофлорой, пересаженной от страдающего ожирением близнеца, прибавляли в весе по сравнению с контрольной группой и мышами с микрофлорой от здорового близнеца. Увеличение массы тела реализовывалось за счет увеличения количества жировой и мышечной тканей.

Авторы работы утверждают, что микрофлора человека с ожирением производит большее по сравнению со здоровой микрофлорой количество как незаменимых, так и заменимых аминокислот, а также значительное количество аминокислот с разветвленной цепью. Таким образом, можно предположить, что увеличение мышечной массы обуславливается усилением образования аминокислот, которые идут на построение мышечных волокон [25]. Кроме того, увеличение продукции микрофлорой аминокислот с разветвленной цепью ведет к возникновению инсулиновой резистентности, ассоциированной с ожирением [25].

У мышей, с пересаженными бактериальными сообществами от здоровых близнецов наблюдалось увеличение экспрессии генов ферментов, участвующих в превращении полисахаридов в короткоцепочечные жирные кислоты. Это приводит к увеличению в кишке количества пропионата и бутирата и снижению количества моно- и дисахаридов по сравнению с микрофлорой лиц, страдающих ожирением [25]. Согласно работам [19, 20, 27, 36] имеется 2 основных пути синтеза короткоцепочечных жирных кислот: с помощью ацетил Ко-А и через путь Вуда-Льюнгаля. Представители типа Firmicutes являются источником бутирата, пропионат главным образом образуется по двум путям: через сукцинатный путь (тип Bacteroidetes) и лактатный путь (тип Firmicutes). Следующие виды бактерий являются основными продуцентами бутирата: Faecalibacterium prausnitzii, Eubacterium rectale, Eubacterium hallii и Ruminococcus bromi, последняя обеспечивает расщепление крахмала в толстой кишке.

Короткоцепочечные жирные кислоты являются очень важным компонентом в регуляции работы не только кишки, но и всего организма. Они выполняют иммуностимулирующую [9], гипотензивную [24], энергетическую [14]

функции. Основываясь на таком разнообразии функций этих кислот, можно предположить, что они играют роль и в развитии ожирения.

Бутират, ацетат и пропионат являются основным источником энергии для энтероцитов. Метаболизируя их, энтероциты получают 60 — 70% от всей произведенной энергии [29], участие же КЖК в общем метаболизме оценивается в 5 — 10% [14]. Основной КЖК, которая используется как источник получения энергии, является бутират, затем идут пропионат и ацетат.

Главным органом — потребителем КЖК (помимо кишечника) является печень. В ней из 70% ацетата, производимого бактериальными клетками, синтезируется холестерол [5], происходит построение длинноцепочечных жирных кислот, а также идет синтез аминокислот [17].

Пропионат, поступающий по воротной вене в печень, используется в ЦТК как источник энергии, а также (после нескольких превращений) может становиться субстратом глюкогенеза [2].

Таким образом, можно сказать, что основной процент КЖК, попадающих в кровь, используется печенью как для получения энергии (через их включение в ЦТК (пропионат=>пропионил-КоА=>сукцинил-КоА), так и для синтеза холестерола, глюкозы, длинноцепочечных жирных кислот и аминокислот [5]. То есть продукты метаболизма микрофлоры, образующиеся в результате ее жизнедеятельности, секретируются в просвет кишки и потребляются организмом хозяина. Данные метаболиты оказывают влияние как на местном уровне, осуществляя иммуностимулирующую и энергетическую функции, так и на системном, участвуя в абсолютно всех метаболических путях обмена жизненно важных соединений. А обмен некоторых из них как раз и нарушается при ожирении. Таким образом, участие КЖК в обмене энергией между организмом и внешней средой не подлежит сомнению, при этом именно повышенный уровень энергосбережения является характерным для ожирения.

В частности, КЖК усиливают активность аденозинмонофосфат-зависимой протеинкиназы [34], которая является ферментом, регулирующим соотношение АТФ/АМФ, т.е. является регулятором количества энергии, которое образует клетка. При ее активации происходит снижение образования в клетке жирных кислот *de novo*, усиливается В-окисление жирных кислот в печени, мышцах, белой и бурой жировой тканях, при этом в бурой жировой ткани он также стимулирует выработку лептина посредством активации Ffar-2 [3, 35]. Лептин является гормоном, обладающим анорексигенным эффектом, т.е. снижающим аппетит.

Основываясь на вышеперечисленных данных и работе Ridaura V.K. et al. [28], можно сделать следующие выводы: несмотря на то, что производство короткоцепочечных жирных кислот предоставляет организму от 5 до 10% используемой им энергии за день, системное использование КЖК весьма ограничено, а основными их потребителями являются энтероциты; системное действие этих кислот весьма разнообразно — они участвуют в обмене аминокислот, углеводов и жиров, который играет в нашем случае одну из самых важных ролей; усиление КЖК активности аденозинмонофосфат-зависимой протеинкиназы ведет к возрастанию активности В-окисления жирных кислот, снижению липогенеза и утилизации жира.

Для лечения ожирения на основе пробиотиков необходимо подобрать такую композицию микрофлоры, которая будет соответствовать потребностям организма. Однако сделать это очень сложно, т.к. мы не знаем всех граней взаимодействия между организмом хозяина и его микробиомом.

Те же Ridaura V.K. et al. [28] пересадили микрофлору от мыши с нормальной

массой тела мыши с избыточной массой тела. Образовавшаяся гибридная микрофлора стала способствовать потере веса у последней, а ее доминантной флорой стала флора мыши с нормальной массой тела. При этом преобладали представители типа *Bacteroidetes*. Взяв за основу 39 видов, полученных из гибридного образца, авторы пересадили эту композицию худой мыши, предполагая, что эти бактерии способствуют похудению. Однако эксперимент провалился: мышь стала набирать вес быстрее, чем контрольная группа. Таким образом, подтвердилась теория о том, что в основе снижения массы тела лежат сложные микробные взаимодействия.

Следующим механизмом, посредством которого осуществляется влияние микрофлоры на пищеварение, является регуляция синтеза глюкагон-подобного гормона (ГПГ) и проглюкагона [11]. Глюкагон-подобный пептид стимулирует синтез инсулина, а также снижает моторику ЖКТ. Увеличение ГПГ в плазме связано с увеличением синтеза в толстой кишке проглюкагона. При богатой видами кишечной флоре, продуцирующей необходимое количество КЖК, снижается уровень проглюкагона и, следовательно, уровень ГПГ (КЖК снижают секрецию проглюкагона). В опыте, проведенном A. Wichmann et al. [33], было показано, что у стерильных мышей и мышей, подвергшихся антибиотикотерапии, наблюдался низкий уровень КЖК, а следовательно, высокий уровень ГПГ и проглюкагона. Увеличение концентрации у стерильной мыши ГПГ не привело к контринсулярному эффекту гормона, но снизило моторику кишечника, что, в свою очередь, приводило к более медленному прохождению пищи через ЖКТ, а следовательно, лучшему всасыванию питательных веществ. Если предположить, что нарушение перистальтики кишечника приводит к тому, что всасывается большее количество метаболитов, чем нужно организму, то можно сказать, что это приведет к большому количеству ненужной энергии, которая будет способствовать отложению ее в виде жира. Поэтому при нарушении регуляцией микрофлорой гормонального фона может нарушиться и всасывание полезных веществ, т.е. произойдет усиление всасывания энергии, которая организму не требуется. Энергия эта будет запасаться в виде жирных кислот в адипоцитах.

Довольно важной частью развития ожирения является неспецифическое воспаление. В нормофлоре имеются как Грам-положительные, так и Грам-отрицательные бактерии. В стенке Грам-отрицательных бактерий имеется липополисахарид (ЛПС). ЛПС может запускать иммунный ответ через CD-14 толл-подобные рецепторы-4 (TLR-4) на поверхности иммунных клеток. Стимуляция TLR-4 активирует индукцию синтеза цитокинов и развитие воспаления. А воспалительный компонент, как известно, играет важную роль в развитии инсулиновой резистентности, ассоциированной с ожирением [13]. Кроме того, авторы работы показали, что воспаление это обусловлено тем, что жирные кислоты, циркулирующие в крови при ожирении, вызывают активацию TLR-4, что и вызывает воспалительную реакцию. Мыши, у которых был удален ген TLR-4, не были подвержены возникновению инсулиновой резистентности. Связано это, по мнению авторов, как раз с активацией TLR-4. Исходя из полученных данных можно предположить, что активация толл-подобных рецепторов-4 как жирными кислотами, так и циркулирующим ЛПС ведет к развитию инсулинорезистентности, связанной с ожирением.

В просвете кишки постоянно умирает большое количество Грам-отрицательных бактерий, что ведет к высвобождению определенного количества ЛПС. В норме микрофлора регулирует степень проницаемости кишечной стенки [1, 23]. Если в ее составе не будет достаточного числа полезных бакте-

рий, то проницаемость будет нарушена [8]. ЛПС, образующийся в просвете кишки, будет попадать в системный кровоток между энтероцитами, что будет приводить к эндотоксинемии [6] и системному неспецифическому воспалению, из-за которого будет развиваться повреждение  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. При этом будет повышаться уровень ИЛ-1 и ИЛ-8, что приведет к повышению уровня воспалительного повреждения  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и недостатку инсулина. Кроме того, это воспаление ведет к увеличению инсулинорезистентности рецепторов [7, 31]. Стоит отметить, что выделяемый микрофлорой бутират обладает противовоспалительным эффектом, что объясняет отсутствие местного действия ЛПС [1].

Еще один эффект, при помощи которого микрофлора препятствует развитию ожирения, является синтез бифидо- и лактобациллами изомеров линолевой кислоты, которая обладает противовоспалительным и противодиабетическим действием [30].

Все эти эффекты микрофлоры играют одну из решающих ролей в развитии ожирения. Поиск идеального состава микрофлоры на сегодняшний день является очень важным. Во-первых, это обусловлено недостаточной эффективностью препаратов первого ряда в нынешнем курсе лечения ожирения. Во-вторых, не все пациенты способны изменять свой жизненный образ, чтобы похудеть, а коррекция образа жизни как раз и является на текущий момент самым действенным средством. В-третьих, врачи наконец-то получают возможность не эмпирического назначения препаратов, а точечного, персонализированного, подхода к лечению ожирения. Коррекция микробиома у каждого пациента позволит достичь очень хороших результатов у высокого процента людей.

Кроме того, на данный момент побочные эффекты пробиотиков почти не встречаются у населения. Основным побочным эффектом являются аллергические реакции на компоненты препарата, а не на сами бактерии. Их применение может быть ограничено только у тяжелобольных с нарушенной функцией иммунитета, т.к. при этом может возникнуть бактериемия или сепсис.

Здесь уместно рассказать о других препаратах, способных корректировать поврежденный микробиом — пребиотиках. Пребиотики — препараты, которые стимулируют рост и размножение флоры. Они являются неперевариваемыми углеводами, которые ферментируются микробиомом, т.е. по сути пребиотики — БАД для микрофлоры. При правильном питании бактерии получают с пищей субстраты для жизнедеятельности, а при неправильном питании количество этих субстратов снижается и возникают нарушения в метаболизме. Основным пребиотиком на данный момент является инулин — органическое вещество из группы полисахаридов. В последнее время стали появляться работы, в которых исследуется целесообразность применения пребиотиков при лейкемии, т.к. применять их при тяжелых заболеваниях несколько безопаснее, чем пробиотики [4]. В работе также предполагалось наличие пользы пектиновых олигосахаридов (ПОС). По результатам работы были сделаны хорошие выводы: применение инулина снижало инвазию лейкоцитарных клеток в печень, повышало уровень КЖК в портальной вене, применение же ПОС снижало риск развития кахексии, корректировало метаболические нарушения лучше (по сравнению с инулином) [4].

Таким образом, можно сказать, что при ожирении целесообразно применять не только пробиотики, но и пребиотики. Вместе такие препараты называются симбиотиками.

Как сказано выше, пробиотики — довольно безопасные препараты. А из этого следует, что их свободная реализация не вызывает большого риска возникновения побочных эффектов и передозировок у населения.

Препараты про- и пребиотического ряда могут стать обязательным дополнением к терапии ряда других заболеваний. Например, об этом свидетельствует работа F.H. Karlsson et al. [16].

В современных исследованиях связи между метаболическим синдромом и составом микрофлоры важную роль играет анализ метаболома, т.е. изучается совокупность всех метаболитов, являющихся конечным продуктом обмена веществ в клетке, ткани, органе или организме [15].

Данные F.H. Karlsson et al. показывают роль нарушения состава микрофлоры в развитии системного атеросклероза [16]. Атеросклероз является воспалительным заболеванием, которое очень часто ассоциировано с ожирением. Так, у лиц, предрасположенных к ожирению, можно будет снизить риск развития атеросклероза, если подобрать им такой микробный состав, который способен предотвратить неспецифическое воспаление. Такими бактериями, по мнению авторов работы, являются *Roseburia* и *Eubacterium*, которые были высеяны от здоровых людей. Напротив, наличие у пациентов бактерий *Collinsella* совпадало с выраженным атеросклерозом. Дальнейшее описание метаболома показало, что у здоровых пациентов в сыворотке наблюдался больший уровень бета-каротина, а у флоры больных пациентов наблюдалась повышенная экспрессия генов, кодирующих строение пептидогликана, и сниженное содержание фитиновой дегидрогеназы (участвует в переваривании бактериями бобовых, хлебных злаков). Так как они являются углеводами, бактерии из них образуют КЖК, о функциях которых сказано выше. Несмотря на то, что авторы рассматривают противовоспалительный эффект флоры только в связи с атеросклерозом, эти данные, несомненно, можно применить и к развитию ожирения.

Таким образом, постоянное применение синбиотиков позволит улучшить прогноз у пациентов, страдающих системным атеросклерозом, снизить вероятность развития инфаркта миокарда, увеличить их уровень жизни.

Кроме того, нарушение состава микрофлоры [6, 25] играет роль в возникновении инсулинорезистентности рецепторов, т.е. развитию диабета 2 типа — заболевания, которое часто сопровождается ожирением. Применение пробиотиков позволит снизить риск его возникновения, а следовательно, улучшить прогноз.

Ожирение, как правило, является довольно тяжелой психологической проблемой. Особенно сильно это сказывается на детях. Из-за постоянного стресса у пациентов могут возникнуть различные психические заболевания, например, депрессия. В работе [21] авторы утверждают, что кишечно-мозговая ось и кишечная микрофлора оказывают сильное влияние на раннее прогрессирование психических заболеваний. В данном исследовании проводился обзор влияния микрофлоры ЖКТ на нейротрофический фактор мозга (BDNF) и его отношения с рецепторами к N-метил-D-аспартату (NMDA), так как считается, что они вовлечены в синаптическую гибкость и когнитивные функции. При нарушении состава кишечной микрофлоры уровень BDNF значительно снижается. Это, в свою очередь, снижает количество NMDA-рецепторов. Снижение количества этих рецепторов приводит к нарушению функционирования ГАМК-ергической системы, что приводит к нарушению когнитивных функций. При патологии количество нейротрофического фактора мозга снижается, а микрофлора способна нейтрализовать его недостаток,

предотвратив развитие нервных патологий (например, депрессии). В основном это происходит либо через кинуриновый путь (в головном мозге из него синтезируется серотонин), либо через уже хорошо известные КЖК. Основываясь на этой информации, можно сказать, что при применении пробиотиков для лечения ожирения снижается риск развития депрессии, которая может возникнуть в результате тяжелой субъективной переносимости этого заболевания [21].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ерофеев Н.П., Радченко В.Г., Селиверстов П.В. Клиническая физиология толстой кишки. Механизмы действия коротко-цепочечных жирных кислот в норме и при патологии. Монография. СПб, Форте Принт, 2012.
2. Bergman E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*. 2009, 70: 567-590.
3. den Besten G., Bleeker A., Gerding A. et al. Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPAR $\gamma$ -dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *American Diabetes Association. Diabetes*. 2015, 64 (7): 2398-2408.
4. Bindels L.B., Neyrinck A.M., Salazar N. et al. Non digestible oligosaccharides modulate the gut microbiota to control the development of leukemia and associated cachexia in mice. *PLoS One*. 2015, 10 (6): 1-16.
5. Bloemen J.G., Venema K., van de Poll M.C. et al. Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clinical Nutrition*. 2009, 28 (6): 657-661.
6. Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007, 56 (7): 1761-1772.
7. Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008, 57 (6): 1470-1481.
8. Cani P.D., Possemiers S. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009, 58: 1091-1103.
9. Chang P.V., Hao L., Offermanns S. et al. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *PNAS*. 2014, 6: 2247-2252.
10. Dahlqvist G., Piessevaux H. Irritable bowel syndrome: the role of the intestinal microbiota, pathogenesis and therapeutic targets. *Acta Gastroenterologica Belgica*. 2011, 74 (3): 75-80.
11. Federico A., Dallio M., Tolone S. et al. Gastrointestinal hormones, intestinal microbiota and metabolic homeostasis in obese patients: Effect of bariatric surgery. *In Vivo*. 2016, 30(3):321-330.
12. Gomes A.C., Bueno A.A., de Souza R.G. et al. Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutrition Journal*. 2014, 13: 60: 1-14.
13. Hang S., Kokoeva M.V., Inouye K. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *Journal Clinical Investigation*. 2006, 116 (11): 3015-3025.
14. Hooper L.V., Midtvedt T., Gordon J.I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review Nutrition*. 2002, 22: 283-307.
15. Jordan K.W., Nordenstam J., Lauwers G.Y. et al. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Diseases Colon Rectum*. 2009, 52 (3): 520-525.
16. Karlsson F.H., Fåk F., Nookaew I. et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nature Communications*. 2012, 1245: 1-8.
17. Knowles S.E., Jarrett I.G., Filsell O.H. et al. Production and utilization of acetate in mammals. *Biochemical Journal*. 1974, 142 (2): 401-411.
18. Kuvaeva I.B., Orlova N.G., Veselova O.L. et al. Microecology of the gastrointestinal tract and the immunological status under food allergy. *Die Nahrung*. 1984, 28 (6-7): 689-693.
19. Louis P., Young P., Holtrop G. et al. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:Acetate CoA-transferase gene. *Environmental Microbiology*. 2010, 12 (2): 304-314.

20. Louis P., Hold G.L., Flint H.J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*. 2014, 12: 661-672.
21. Maqsood R., Stone T.W. The gut-brain axis, BDNF, NMDA and CNS disorders. *Neurochemical Research*. 2016, 41: 2819-2835.
22. Mondot S., Kang S., Furet J.P. et al. Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2011, 17: 185-192.
23. Morris G., Berk M., Carvalho A.F. et al. The role of microbiota and intestinal permeability in the pathophysiology of autoimmune and neuroimmune processes with an emphasis on inflammatory bowel disease type 1 diabetes and chronic fatigue syndrome. *Current Pharmaceutical Design*. 2016, 22 (22): 3303-3304.
24. Natarajan N., Hori D., Flavahan S. et al. Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial G-protein coupled receptor 41. *Physiological Genomics* Published. 2016, 11: 826-834.
25. Newgard C.B., An J., Bain J.R. et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metabolism*. 2009, 9 (4): 311-326.
26. Nishikawa J., Kudo T., Sakata S. et al. Diversity of mucosa-associated microbiota in active and inactive ulcerative colitis. *Scandinavian Journal Gastroenterology*. 2009, 44 (2): 180-186.
27. Reichardt N., Duncan S.H., Young P. et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME Journal*. 2014, 8: 1323-1335.
28. Ridaura V.K., Faith J.J., Rey F.E. et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013, 341 (6150).
29. Roediger W.E. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology*. 1982, 83 (2): 424-429.
30. Terpstra A.H.M. Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: an overview of the literature. *American Society for Clinical Nutrition*. 2004, 3: 352-361.
31. Tian P., Li B., He C. et al. Antidiabetic (type 2) effects of *Lactobacillus* G15 and Q14 in rats through regulation of intestinal permeability and microbiota. *Food Function*. 2016, 7:3789-3797.
32. Wen L., Ley R.E., Volchkov P.Y. et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of type 1 diabetes. *Nature*. 2008, 455 (7216): 1109-1113.
33. Wichmann A., Allahyar A., Greiner T.U. et al. Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. *Cell Host Microbe*. 2013, 14: 582-590.
34. Yamashita H., Fujisawa K., Ito E. et al. Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in type 2 diabetic otsuka long-evans tokushima fatty (OLETF) rats. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 2007, 71 (5): 1236-1243.
35. Zaibi M.S., Stocker C.J., O'Dowd J. et al. Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. *FEBS Letters*. 2010, 584 (11): 2381-2386.
36. Ze X., Duncan S.H., Louis P. et al. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME Journal*. 2012, 6: 1535-1543.

*Поступила 15.04.17*

Контактная информация: Карамзин Андрей Михайлович, к.б.н.,  
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

---

## УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ ЗА 2017 ГОД

- Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Жукина М.В., Амиантова И.И., Милованова А.В., Воробьев Д.С., Аммуру 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. VI, 63—72.
- 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., Аммуру 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. VI, 72—80.
- Александрян Г.Б., Ахматова Э.А., Ахматова Н.К., Курбатова Е.А., Панченков Д.Н., Зверев В.В. Баланс Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 цитокинов в послеоперационном периоде у пациентов со злокачественными опухолями печени. II, 66—74.
- Алешкин А.В., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Бочкарева С.С., Чернова В.А., Требунских И.П., Ефимов Б.А., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Афанасьев М.С., Борисова А.Б., Караулов А.В. Микробиоценоз кожи у больных бромгидрозом. V, 53—58.
- Алсалих Н.Д., Сычев Д.А., Потемкин И.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распространенность маркеров энтеральных вирусных гепатитов среди трудовых мигрантов, прибывающих в Российскую Федерацию. III, 59—64.
- Анганова Е.В., Ветохина А.В., Распопина Л.А., Кичигина Е.Л., Савилов Е.Д. Состояние антибиотикорезистентности *Klebsiella pneumoniae*. V, 70—77.
- Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Эволюция понятия сапронозы и трансформация экологической концепции паразитизма в инфектологии. V, 119—126.
- 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. VI, 25—31.
- Балахонов С.В., Куликалова Е.С., Мазепа А.В., Сынгеева А.К., Остяк А.С., Михайлов Е.П., Ешелкин И.И., Шестаков В.А. Ретроспективный анализ биологических свойств коллекционных штаммов *Francisella tularensis*, выделенных на юге Сибири (1950 — 2015 гг.). IV, 3—9.
- Башмакова Н.В., Литвинова А.М., Кузнецова О.А. Характеристика состояния доношенных новорожденных из групп высокого перинатального риска в период вакцинации в роддоме. I, 80—85.
- Бойченко М.Н., Зверев В.В., Волчкова Е.В. Взаимодействие сальмонелл с организмом хозяина. IV, 91—100.
- Бондаренко А.П., Зайцева Т.А., Троценко О.Е., Гарбуз Ю.А., Каравянская Т.Н., Корита Т.В., Присяжнюк Е.Н., Подколзин А.Т., Шмыленко В.А., Тригорлова Т.Н., Бондарь О.Б. Заболеваемость дизентерией Зонне в Хабаровске и Хабаровском крае, обусловленной атипичным маннитнегативным возбудителем. I, 20—28.
- Борисова О.В., Файзулов Е.Б., Марова А.А., Кукушкин В.И., Зверев В.В. Перспек-

- тивы и проблемы использования эффекта гигантского комбинационного рассеяния света в диагностике вирусных инфекций. III, 106—114.
- Борисова О.Ю., Пименова А.С., Чаплин А.В., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Алешкин А.В., Афанасьев М.С., Караулов А.В.* Ускоренный способ генодиагностики дифтерии на основе изотермальной амплификации для выявления ДНК возбудителя. V, 24—32.
- Бочкарева С.С., Алешкин А.В., Ершова О.Н., Новикова Л.И., Афанасьев С.С., Киселева И.А., Зулъкарнеев Э.Р., Рубальский Е.О., Борисова О.Ю., Караулов А.В.* Иммунологические аспекты фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в отделении нейрореанимации. IV, 42—48.
- Брико Н.И., Миндлина А.Я., Полибин Р.В., Галина Н.П., Горохова А.С., Ушанова А.В.* Оценка отношения к иммунопрофилактике различных групп населения Российской Федерации. II, 98—103.
- Брико Н.И., Глушкова Е.В., Клейменов Д.А., Дмитриева Н.Ф., Липатов К.В., Девяткин А.В., Маликов В.Е.* Чувствительность к антибиотикам и молекулярно-генетические свойства штаммов *Streptococcus pyogenes*, выделенных от больных с инфекцией мягких тканей и ангинами. III, 19—26.
- Бриль Г.Е., Егорова А.В., Бугаева И.О., Пономарев Г.В.* Влияние низкоинтенсивного красного лазера на рост штаммов *Staphylococcus aureus* и сенсибилизирующий эффект фотодитазина. II, 34—37.
- Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Андрющенко С.В.* Метаболический профиль бифидофлоры при различных микроэкологических состояниях биотопа толстого кишечника человека. I, 3—11.
- Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б.* Регуляция иммунного гомеостаза кишечника человека метаболитами бифидобактерий в условиях микробного распознавания. III, 12—18.
- Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Шапошникова Л.И., Волюнкина А.С., Лисицкая Я.В., Котенев Е.С., Куличенко А.Н.* Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых инфекций на юге России в 2015 г. I, 29—35.
- Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Волюнкина А.С., Лисицкая Я.В., Шапошникова Л.И., Таран Т.В., Куличенко А.Н.* Причины обострения эпидемиологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2016 году. V, 17—23.
- Воеводин Д.А., Розанова Г.Н., Поддубиков А.В., Михайлова Н.А.* Микробиоценоз, иммунная система и наследственность. II, 116—126.
- Гладышева И.В., Черкасов С.В.* Физиологические особенности коринебактерий репродуктивного тракта женщин. I, 96—107.
- Горелова Л.А., Царева В.В., Витович М.В.* Цефтаролин против стафилококка и других «супербактерий». V, 113—119.
- Городничев Р.Б., Ракитина Д.В., Манолов А.И., Байкова Ю.П., Щербаков П.Л., Смирнов Г.Б., Ильина Е.Н.* Характеристика клинических изолятов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с болезнью Крона. VI, 42—49.
- Гуляев С.А., Ляшенко А.А., Чумаков А.М., Сорокин А.А., Гордейчук И.В., Потемкин И.А., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.* Изучение иммуногенности прототипного вакцинного препарата против гепатита E. III, 35—43.
- Гуляев С.А., Потемкин И.А., Кичатова В.С., Карлсен А.А., Исаева О.В., Гуляева Т.В., Ваннус М.А., Гордейчук И.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.* Моделирование вирусного гепатита E на карликовых домашних свиньях. IV, 48—54.

- Демидова Г.В., Соколова Е.П., Зюзина В.П., Рыкова В.А., Морозова И.В., Подладичкова О.Н., Тьяянова В.И. Влияние внехромосомных элементов наследственности на токсические свойства *Yersinia pestis*. II, 28—33.
- Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Остапович В.В. Определение оптимальных режимов эксплуатации приборной базы для контроля атмосферного воздуха на наличие патогенных биологических агентов в модельных опытах. II, 81—86.
- Ефременко Д.В., Малецкая О.В., Оробей В.Г., Ефременко В.И. Биологическая безопасность массовых мероприятий: актуальные вопросы и принципы. V, 10—17.
- 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. VI, 88—94.
- Загоскина Т.Ю., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Попова Ю.О., Марков Е.Ю., Старикова О.А. Конструирование тест-системы с наночастицами коллоидного серебра для обнаружения возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в ДОТ-иммуноанализе. I, 55—61.
- Загоскина Т.Ю., Чапоргина Е.А., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Долгова Т.М., Гаврилова О.В., Тайкова Т.С., Балахонов С.В. Дот-иммуноанализ с использованием антител, меченных наночастицами коллоидного золота, для детекции ботулинического токсина в клиническом материале и пищевых продуктах. IV, 31—35.
- Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Чапоргина Е.А., Попова Ю.О., Долгова Т.М., Гаврилова О.В., Тайкова Т.С., Никитина А.В., Помелова В.Г., Осин Н.С., Балахонов С.В. Сравнительный анализ эффективности твердофазных методов иммунодетекции ботулинического токсина в сыворотке крови больного с диагнозом «ботулизм». V, 64—70.
- Зуева Е.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Тотолян Арег А. Идентификация сероваров *Leptospira* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. I, 42—49.
- Иванова А.В., Попов Н.В., Куклев Е.В., Адамов А.К., Щербакова С.А. Обзор эпидемиологической обстановки по геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС) на территории Российской Федерации за 1990 — 2015 гг. II, 16—21.
- Иванова И.А., Мишанькин Б.Н., Беспалова И.А., Омельченко Н.Д., Шипко Е.С., Филиппенко А.В. Использование поверхностных структур холерного вибриона для специфической профилактики и диагностики холеры. II, 110—115.
- Калошин А.А., Солдатенкова А.В., Зимица Е.М., Михайлова Н.А. Получение слитых рекомбинантных белков OprF- $\Delta$ OprI,  $\Delta$ OprF- $\Delta$ OprI и OprF-aTox- $\Delta$ OprI *Pseudomonas aeruginosa*. V, 32—38.
- Каминский Д.И., Лобанов В.В., Рожков К.К., Мазрухо А.Б. Совершенствование питательных сред для выращивания некоторых возбудителей опасных инфекционных болезней. II, 104—110.
- 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., Voiro A., Voumbali S., Voiro M.Y., Кутырев В.В. Эпидемиологический анализ ситуации по холере на территории Африки и проблемы профилактики. VI, 105—113.
- Ковалев В.А., Филатов Н.Н., Локтионова М.Н., Фроловская Т.Г., Линок А.В., Жукова Г.А., Голюсов А.А. Современные особенности норовирусной инфекции в городе Москва. VI, 32—37.
- Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Лазарева А.М. Особенности микробиоценоза

- слизистой оболочки носа при atopическом и полипозном риносинуситах. I, 67—73.
- Копицына М.Н., Морозов А.С., Бессонов И.В., Писарев В.М., Лобакова Е.С., Бухарин О.В.* Лиганды для селективного удаления бактериальных эндотоксинов грамотрицательных бактерий. III, 115—126.
- Коровкина Е.С., Костинов М.П., Кажарова С.В.* Возможности использования иммуномодуляторов в комплексной терапии внебольничных пневмоний. IV, 101—111.
- Костинов М.П., Лукачев И.В., Мещерякова А.К., Дмитриева Е.В., Ахматова Н.К., Хромова Е.А., Магаршак О.О., Сависько А.А.* Индукция эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета в процессе лечения топической формой рекомбинантного интерферона- $\alpha 2b$  при респираторных инфекциях у беременных. II, 38—45.
- Краснопрошина Л.И., Серова Т.А., Фошина Е.П., Бишева И.В., Сходова С.А.* Особенности иммунного ответа при различных схемах применения бактериальной терапевтической вакцины Иммунак ВП-4. IV, 23—30.
- 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 экспериментальный животных. VI, 49—55.
- Леденева М.Л., Водопьянов А.С., Ткаченко Г.А., Водопьянов С.О., Савченко С.С., Шпак И.М.* Выявление INDEL-маркеров в геномах штаммов *Burkholderia pseudomallei* для внутривидового генотипирования. IV, 35—41.
- Мавзютов А.Р., Князева О.А., Гарафутдинов Р.Р., Габдрахманова А.Р.* Влияние липополисахарида *Escherichia coli* на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови мышей с индуцированным иммунодефицитом. III, 84—90.
- Макарова М.А., Сужаева Л.В., Кафтырева Л.А.* Дети раннего возраста с дисбиозом кишечника как носители энтероаггративных *Escherichia coli*. IV, 54—58.
- Малецкая О.В., Дубянский В.М., Беляева А.И., Шапошникова Л.И., Агапитов Д.С., Ермолова Н.В., Цапко 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*. VI, 10—15.
- Маркин В.А., Чифанов Д.Е.* Заносы особо опасных вирусных инфекций на неэндемичные территории. V, 91—100.
- Микшис Н.И., Попова П.Ю., Семакова А.П., Кутырев В.В.* Лицензированные сибирезвенные вакцины и экспериментальные препараты на стадии клинических исследований. IV, 112—126.
- Михайлова Н.А., Калиниченко Е.О., Солдатенкова А.В., Ахматова Н.К.* Рекомбинантные антигены *Pseudomonas aeruginosa*: влияние на иммунный ответ у мышей. III, 52—58.
- Начарова Е.П., Харит С.М., Лобзин Ю.В., Брико Н.И.* Принципы мониторинга неблагоприятных событий после вакцинации в России и в мире. I, 86—96.
- Неустроев М.П., Мурашев А.Н., Бондаренко Д.А., Степанова А.М., Тарабукина Н.П.* Исследование токсичности препарата Сахабактисубтил на крысах. V, 59—64.
- Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Германчук В.Г.,*

- Девдариани З.Л., Кутырев В.В.* Подвидовая дифференциация штаммов *Yersinia pestis* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. II, 22—27.
- Новикова Л.И., Петрова М.С., Алешкин В.А., Скирда Т.А., Волков А.В., Матвеевская Н.С., Бочкарева С.С., Синчугова Т.В., Панурина Р.Л., Зуева М.М., Наумова М.А., Воронова И.С., Бунин С.В., Борисова О.Ю., Пименова А.С.* Комплексный иммуноглобулиновый препарат в терапии коклюша у детей раннего возраста. I, 73—80.
- Новикова Н.А., Сашина Т.А., Солнцев Л.А., Епифанова Н.В., Кашиников А.Ю., Погодина Л.В., Окунь И.Н., Княгина О.Н.* Проявления эпидемического процесса ротавирусной инфекции в Нижнем Новгороде в предвакцинальный период. V, 46—52.
- Ноздрачева А.В., Семенов Т.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В.* Оценка напряженности гуморального иммунитета к кори и краснухе у беременных женщин в Москве. III, 91—98.
- Овечко Н.Н., Ястребова Н.Е.* Антигены поверхностных структур *Haemophilus influenzae* как перспективные кандидат-вакцины. IV, 82—90.
- 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. VI, 56—63.
- Отрашевская Е.В., Кулак М.В., Букин Е.К., Горбунов М.А., Игнатьев Г.М.* Горизонтальная трансмиссия вакцинного штамма вируса паротита от вакцинированных их близким контактам. III, 65—71.
- Ртищев А.А., Минтаев Р.Р., Кост В.Ю., Коптяева И.Б., Аكوпова И.И., Лисовская К.В., Маркушин С.Г.* Включение сайт-специфических мутаций в консервативные участки РА-гена приводит к аттенуации вирулентного штамма вируса гриппа А/WSN/33. II, 45—53.
- Рыбальченко О.В., Эрман М.В., Орлова О.Г., Первунина Т.М., Капустина В.В., Парийская Е.Н.* Подавление биопленок условно патогенных бактерий на мочевых катетерах. III, 3—11.
- Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Захарова Л.Б., Вишневская О.Н., Марков А.Г.* Влияние пробиотических бактерий и липополисахаридов на плотные контакты эпителиоцитов тощей кишки крыс. VI, 80—87.
- Савельева И.В., Тихонов С.Н., Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Котенев Е.С., Бабенышев Б.В., Зинич Л.С., Пидченко Н.Н., Куличенко А.Н.* Ретроспективный анализ биологических и молекулярно-генетических свойств штаммов возбудителя холеры, выделенных в Украине в 1994 — 2011 гг. I, 49—55.
- Савинков П.А., Рыбалкина Т.Н., Каражас Н.В., Бошьян Р.Е., Калугина М.Ю., Корниенко М.Н., Русакова Е.В., Бурмистров Е.М., Солдатова И.А.* Выявление маркеров герпесвирусных инфекций и пневмоцистоза у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями. IV, 67—74.
- Сазанова Е.В., Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Малюкова Т.А., Попов Ю.А.* Проточно-цитофлуориметрический анализ цитотоксичности штаммов *Yersinia pestis*. VI, 3—9.
- Селянская Н.А., Титова С.В., Головин С.Н., Егуазарян Л.А., Веркина Л.М., Тришина А.В.* Действие антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов Эль Тор. II, 8—15.
- Семенов С.И., Федоров А.И., Осаковский В.Л., Максимова С.С., Платонов Ф.А.*

- Частота встречаемости полиморфных вариантов гена IL28В и генотипов вируса гепатита С у населения Якутии: клинические исходы. II, 86—92.
- Семенов С.И., Федоров А.И., Максимова С.С., Степанов К.М., Платонов Ф.А. Сравнительная характеристика иммунного статуса больных хроническими формами вирусных гепатитов В, С, D и здоровых лиц. II, 92—97.
- Семенов А.В., Останкова Ю.В., Чурина М.А., Никитина Н.А., Росоловский А.П., Гребенкина Е.В., Ткаченко Т.Н., Жандармова Т.А., Тололян Арег А. Молекулярно-биологические методы диагностики при расследовании случая передачи ВИЧ-инфекции. IV, 59—66.
- Сердюк Н.С., Евченко Ю.М., Кузнецова И.В., Жилченко Е.Б., Жаринова Н.В., Коняева О.А., Мезенцев В.М., Волюнкина А.С., Котенев Е.С., Платонов М.Е., Анисимов А.П., Куличенко А.Н. Определение филогенетического родства штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов чумы Кавказа методом мультилокусного VNTR-анализа. I, 35—41.
- Симонова Е.Г., Раичич С.Р., Картавая С.А., Филатов Н.Н. Надзор за бешенством в современных условиях. III, 77—83.
- Соболева Н.В., Карлсен А.А., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Троценко О.Е., Михайлов М.И. Особенности циркуляции вируса гепатита С в Хабаровском крае. III, 43—51.
- Соболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В., Кичатова В.С., Клушкина В.В., Исаева О.В., Игнатьева М.Е., Романенко В.В., Ооржак Н.Д., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Частота выявления антител к вирусу гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации. III, 99—106.
- Солнцев Л.А., Дубянский В.М. Опыт использования метода максимальной энтропии (Maxent) для зонирования территории по риску заражения ГЛПС на примере Нижегородской области. V, 39—45.
- Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Дробот Е.И., Ляпун И.Н. Псевдотуберкулез: патогенетическое значение клеток врожденного иммунитета. V, 78—90.
- Сычева М.В., Пешкова Ю.И., Карташова О.Л., Андреева А.В. Регуляция анти-микробными пептидами чувствительности микроорганизмов к антагонистически активным представителям мутуалистической микрофлоры. VI, 21—25.
- Тапальский Д.В., Петренев Д.Р., Храмченкова О.М., Дорошкевич А.С. Антимикробная и противогрибковая активность экстрактов лишайников, распространенных на территории Беларуси. II, 60—65.
- Терентьева Н.А., Псарева Е.К., Тимченко Н.Ф., Голотин В.А., Рассказов В.А. Влияние токсинов *Yersinia pseudotuberculosis* на формирование биопленки. VI, 37—42.
- Титова С.В., Алексеева Л.П. Роль кворум-сенсинг в регуляции образования биопленок холерными вибрионами. I, 115—119.
- Тришина А.В., Березняк Е.А., Симонова И.Р., Веркина Л.М., Березняк А.Ю., Полеева М.В. Биоразнообразие и антибиотикорезистентность условно патогенных энтеробактерий, выделенных из поверхностных водоемов Ростова-на-Дону. IV, 17—23.
- Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Швецова Н.М., Таран Т.В., Кузнецова И.В., Жиров А.М., Хачатурова А.А., Борздова И.Ю., Куличенко А.Н. Применение времяпролетной масс-спектрометрии для выявления возбудителя бруцеллеза в образцах крови в эксперименте. IV, 9—17.
- Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л. Когнитивная ось старости: воспаление — микробиота тонкого кишечника. V, 3—9.

- Флуер Ф.С., Кудрявцева А.В., Титарев С.И., Быкова И.Б. Средство для ингибирования продукции стафилококковых энтеротоксинов и удаления их из биологических субстратов. III, 71—77.
- Харсеева Г.Г., Воронина Н.А. Коринебактерии: особенности структуры бактериальной клетки. I, 107—114.
- Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Гасретова Т.Д., Сылка О.И. Тюкавкина С.Ю. Антибиотикорезистентные штаммы недифтерийных коринебактерий. II, 3—8.
- 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. VI, 15—20.
- Царев В.Н., Ипполитов Е.В., Николаева Е.Н. Распространение генетических маркеров резистентности к антибиотикам у биопленкоформирующих штаммов облигатных и факультативных анаэробов. II, 74—80.
- Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии — основной фактор возникновения и развития пародонтита. V, 101—112.
- Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Кисиль С.В., Анисимов В.В., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus agalactiae* в присутствии катионов меди и цинка. III, 26—35.
- Чернявская О.П., Брико Н.И. Проблемы заключительного этапа программы ликвидации полиомиелита. IV, 75—81.
- Шиповалов А.В., Дурыманов А.Г., Петрова О.В., Иванова Е.В., Епанчинцева А.В., Святченко С.В., Мальцев С.В., Марченко В.Ю., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б., Ильичева Т.Н. Анализ популяционного иммунитета к гриппу накануне эпидемических сезонов в 2014 г. и 2015 г. II, 53—60.
- Шкарин В.В., Ковалишена О.В., Саперкин Н.В., Шпрыкова О.Н. Общая характеристика и проблемные вопросы полиэтиологических инфекций, вызываемых условно патогенными микроорганизмами. VI, 114—126.
- Шубин Ф.Н., Раков А.В., Кузнецова Н.А., Якубич Т.В., Снеткова И.П. Формирование заболеваемости населения сальмонеллезом, вызванным *Salmonella enteritidis*, в районах с неполным обеспечением населения местной продукцией птицеводства. I, 61—67.
- Яковлева Т.В., Брико Н.И., Герасимов А.Н., Салтыкова Т.С., Поздняков А.А. Сравнительная характеристика эпидемических сезонов гриппа 2015 — 2016 и 2009 — 2010 гг. I, 11—19.
- Яцышина С.Б. Пневмовирусы в инфекционной патологии человека. VI, 95—105.
-

## СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Никифоров И.А.* Функциональные группы бифидофлоры кишечной микробиоты в ассоциативном симбиозе человека ..... 3  
*Bukharin, O.V., Ivanova, E.V., Perunova, N.B., Nikiforov, I.A.* The functional groups of bifidoflora of intestinal microbiota in associative symbiosis of human
- Брико Н.И., Глушкова Е.В.* Состояние и тенденции эпидемической ситуации по стрептококковой (группы А) инфекции в России в последние годы ..... 10  
*Briko, N.I., Glushkova, E.V.* Status and trends of the epidemic situation of group A streptococcal (GAS) infections in Russia in recent years
- Брико Н.И., Батыршина Л.Р., Брико А.Н.* Оценка прогностической эпидемиологической и экономической эффективности вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции у мужчин трудоспособного возраста с различными хроническими заболеваниями ..... 17  
*Briko, N.I., Batyrshina, L.R., Briko, A.N.* Evaluation of the prognostic epidemiological and economic efficacy of vaccination against pneumococcal infection in men of working age with various chronic diseases
- Орлова О.Г., Рыбальченко О.В., Эрман М.В., Первунина Т.М., Фонтуренко А.Ю.* Риск развития инфекционного процесса у детей с сочетанными врожденными пороками развития сердца и почек ..... 23  
*Orlova, O.G., Rybalchenko, O.V., Erman, M.V., Pervunina, T.M., Fonturenko, A.Yu.* Catheter-associated urinary tract infection in children with congenital heart and kidney disease
- Святченко С.В., Дурьманов А.Г., Суслопаров И.М., Колосова Н.П., Гончарова Н.И., Петрова О.В., Епанчинцева А.В., Максютлова А.В., Кондик К.С., Слабода О.К., Иванова Е.В., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б., Ильичева Т.Н.* Тяжелые случаи заболевания гриппом на территории Российской Федерации в течение эпидемических сезонов 2015—2016 и 2016—2017 ..... 32  
*Svyatchenko, S.V., Durymanov, A.G., Susloparov, I.M., Kolosova, N.P., Goncharova, N.I., Petrova, O.V., Epanchintseva, A.V., Maksyutova, A.V., Kondik, K.S., Slaboda, O.K., Ivanova, E.V., Mikheev, V.N., Ryzhikov, A.B., Illicheva, T.N.* Severe cases of seasonal influenza in Russia in 2015—2016 and 2016—2017
- Гусева О.Е., Лебедько О.А., Наговицына Е.Б., Лазуткин М.Н., Савицкая Е.А., Ключева С.В., Путилина О.В.* Особенности вспышки внебольничной пневмонии, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*, у детей в Хабаровском крае ..... 39  
*Guseva, O.E., Lebedko, O.A., Nagovitsyna, E.B., Lazutkin, M.N., Savitskaya, E.A., Klyueva, S.V., Putilina, O.V.* Features of the outbreak of the community-acquired pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae* at children in Khabarovsk region
- Ефременко Д.В.* Биологическая безопасность массовых мероприятий: особенности лабораторной диагностики ..... 45  
*Efremenko, D.V.* Biological safety of public events: features of laboratory diagnostics
- Червакова М.П., Шаров Т.Н., Баркова И.А., Барков А.М., Викторов Д.В., Топорков А.В.* Идентификация иммуногенных белков штаммов *Bacillus anthracis* в MALDI TOF MS ..... 52  
*Chervakova, M.P., Sharov, T.N., Barkova, I.A., Barkov, A.M., Viktorov, D.V., Toporkov, A.V.* Identification of immunogenic proteins of strains of *Bacillus anthracis* in MALDI TOF MS
- Платонов А.Е., Koetsveld J., Стуколова О.А., Долгова А.С., Колясникова Н.М., Топоркова М.Г., Сарксян Д.С.* Бактерицидное действие сыворотки крови человека на *Yersinia miamotoi*, возбудителя иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ-БМ) ..... 58

- Platonov, A.E., Koetsveld, J., Stukolova, O.A., Dolgova, A.S., Kolyasnikova, N.M., Toporkova, M.G., Sarksyian, D.S.* Bactericidal effect of human serum on *Borrelia miyamotoi*, causative agent of ixodes tick-borne borreliosis (ITBB-BM)
- Урядова Г.Т., Горельникова Е.А., Фокина Н.А., Долмашкина А.С., Карпунина Л.В.* Влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий на синтез провоспалительных цитокинов макрофагами мышей при фагоцитозе *Staphylococcus aureus* ..... 67
- Uryadova, G.T., Gorelnikova, E.A., Fokina, N.A., Dolmashkina, A.S., Karpunina, L.V.* Effect of exopolisaccharides of lactic acid bacteria on the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophagic mice in phagocytosis of *Staphylococcus aureus*
- Васильева О.В., Волюнкина А.С., Кузнецова И.В., Писаренко С.В., Куличенко А.Н.* Молекулярно-генетическая характеристика штамма *Shigella sonnei*-2013, выделенного при вспышке дизентерии в Республике Абхазия в 2013 году..... 72
- Vasileva, O.V., Volynkina, A.S., Kuznetsova, I.V., Pisarenko, S.V., Kulichenko, A.N.* Molecular-genetic characteristics of *Shigella sonnei*-2013 strain isolated during the outbreak in dysentery in the Republic Abkhazia in 2013
- Пузырева Л.В., Родькина Л.А., Мордык А.В., Конченко В.Д., Далабаева Л.М.* Анализ инфекций нижних дыхательных путей с исследованием микробного пейзажа материала у ВИЧ-инфицированных пациентов..... 76
- Puzyreva, L.V., Rodkina, L.A., Mordyk, A.V., Konchenko, V.D., Dalabaeva, L.M.* Analysis of lower respiratory tract infections with a research of a microbial landscape of material at HIV-positive patients

#### ОБЗОРЫ (REVIEWS)

- Храпова Н.П., Меринова Л.К., Замарина Т.В., Фролов Д.М., Сенина Т.В., Корсакова И.И.* Применение реакции латекс-агглютинации на основе моноклональных антител для обнаружения и идентификации возбудителя мелиоидоза в пробах с объектов внешней среды и биологического материала ..... 85
- Khrapova, N.P., Merinova, L.K., Zamarina, T.V., Frolov, D.M., Senina, T.V., Korsakova, I.I.* Application of monoclonal antibody-based latex agglutination test for detection and identification of the agent of melioidosis in clinical and environmental objects
- Полеева М.В., Чемисова О.С.* Использование масс-спектрометрического анализа для детекции бактериальных токсинов ..... 93
- Poleeva, M.V., Chemisova, O.S.* The use of mass spectrometric analysis for the detection of bacterial toxins
- Шубникова Е.В., Меринова Л.К., Сенина Т.В., Король Е.В., Меринова О.А.* Биопленки патогенных буркхольдерий и их роль в резистентности к антибиотикам ..... 101
- Shubnikova, E.V., Merinova, L.K., Senina, T.V., Korol, E.V., Merinova, O.A.* Biofilms of pathogenic *Burkholderia* and their role in resistance to antibiotics
- Карамзин А.М., Терешин Н.М.* Влияние микрофлоры ЖКТ на ожирение. Применение пробиотиков как лекарственных средств..... 113
- Karamzin, A.M., Tereshin, N.M.* Gastrointestinal microbiota and obesity. Approving probiotics as drugs for treatment of obesity

#### УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ ЗА 2017 ГОД (AUTHOR'S INDEX FOR 2017)

**БЛАГОДАРИМ ВСЕХ ПОДПИСАВШИХСЯ НА ЖМЭИ.  
НАДЕЕМСЯ НА ДАЛЬНЕЙШЕЕ СОТРУДНИЧЕСТВО.**

**РЕДАКЦИЯ, РЕДКОЛЛЕГИЯ**

## 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, 6х9 или 5х8, 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 (TIF 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 обзоров не более 50, кратких сообщениях не более 10) печатается на отдельном листе колонкой в алфавитном порядке (русские авторы, потом иностранные). В тексте дается ссылка на порядковый номер списка. В списке приводятся все отечественные авторы, иностранные — 3 автора et al., название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для книг, патентов и авторефератов диссертаций давать точное название. Ссылки на тезисы конференций, симпозиумов, пленумов, съездов и на неопубликованные работы не допускаются. Фамилии иностранных авторов в тексте статьи даются в иностранной транскрипции.

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

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

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

11. Плата с аспирантов за публикацию статей не взимается.

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

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