

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

СОЮЗ ПЕДИАТРОВ РОССИИ

ООО «С-ИНФО»

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

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

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

2

март—апрель

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

Уважаемые читатели и авторы ЖМЭИ!

В течение апреля и мая (начало с 1 апреля) будет проходить подписка на 2-е полугодие 2018 г.

I. Каталог «Агентство Роспечать»: индекс 71436, текущая цена за номер 1899,92 руб. II. Объединенный каталог «Пресса России»: 1. Индекс 10277, текущая цена за номер 1899,92 руб. 2. Индекс 16729, только на полгода 5440,68 руб.

Надеемся на ваше понимание и поддержку.

Редколлегия, Редакция

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

<http://www.jmicrobiol.com>

Подписано в печать 15.03.18. Выход в свет 29.03.18.
Формат 70x108 1/16. Печать офсетная. Заказ № 1254.

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

© «С-инфо», 2018

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

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

МЕХАНИЗМЫ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ В РЕАЛИЗАЦИИ ОБЩИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ В КУЛЬТУРЕ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Оценка ингибирующего воздействия миллимолярных концентраций двухвалентных катионов металлов, различающихся первичными механизмами реализации токсичности, на культуру *S.pyogenes*. *Материалы и методы.* Суспензию бактерий *S.pyogenes*, содержащую 10^8 КОЕ/мл, заседали газоном на чашки Петри с питательным агаром. Спустя 30 мин на поверхность газона с помощью 36-канального штампа-репликатора каплями объемом по 5 мкл наносили водные растворы солей с концентрацией по катионам металлов от 5×10^{-3} М до 5×10^{-1} М. Затем чашки с культурой бактерий инкубировали в течение суток при 37°C, после чего определяли диаметр зоны задержки роста. Для оценки наличия (отсутствия) в зонах задержки роста жизнеспособных бактерий из центра зоны производили посевы материала в пробирки с питательным бульоном, которые термостатировали в течение срока до пяти суток при 37°C, после чего оценивали прозрачность питательного бульона. *Результаты.* По действию на газоне культуры *S.pyogenes* в диапазоне концентраций металлов от 50 до 500 мМ относительно невысокую активность демонстрируют катионы меди и железа, промежуточные эффекты реализуют кобальт, никель и марганец, наиболее высокий потенциал отличает катионы цинка. При этом высокую бактерицидную активность проявляют катионы железа и меди, умеренную — катионы цинка, отсутствие регистрируемой бактерицидной активности характеризует действие марганца, никеля и кобальта. *Заключение.* Ингибирующее действие двухвалентных катионов тяжелых металлов на газоне культуры *S.pyogenes* с большой вероятностью включает бактериостатический и бактерицидный компоненты, проявление активности которых определяется первичными механизмами реализации токсических свойств катионов.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 3—9

Ключевые слова: бактерицидное действие, катионы металлов, *S.pyogenes*

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

THE MECHANISMS OF BACTERICIDAL ACTION IMPACT IN COMMON ANTI-BACTERIAL EFFECTS OF METAL CATIONS IN CULTURE OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. The work was performed with the purpose to study an inhibitory action of millimolar concentrations of divalent metal ions, which differ by primary mechanisms of their toxicity, on the culture of *S.pyogenes*. *Materials and methods.* Suspensions of *S.pyogenes* bacteria which contained 10^8 CFU/ml were sown by the lawns into the standard Petri dishes coated with the supplemented Nutrient Agar. 30 min later the salt solutions of divalent metals were added by the 5 μ l drops on the surfaces of the lawns with use of 36-channel stamp replicator. The salt solutions contained the metals tested at the concentrations ranged between 5×10^{-3} M to 5×10^{-1} M. Then the dishes with bacterial cultures were incubated for 24 hrs at 37°C followed by measuring diameter

of the area of culture growth inhibition. The probes of material obtained from the centers of the stunting areas were passed into the centrifuge tubes with the supplemented Nutrient Broth, incubated for up to five days at 37°C and tested for the Broth clarity. *Results.* In presence of the metal concentrations ranged between 50 to 500 mM inhibitory action towards *S.pyogenes* bacteria was registered as relatively low due to the effects of copper or ferrous ions, as intermediate due to the presence of cobalt, nickel or manganese, and as high due to the effects of zinc ions. At the same time ferrous or copper ions demonstrated high bactericidal activity, zinc ions showed relatively low one, whereas manganese, nickel or cobalt were characterized by the lack of bactericidal action registered. *Conclusion.* Inhibitory action of heavy metal divalent ions on the lawns of *S.pyogenes* cultures probably includes bacteriostatic and bactericidal components which impact is determined by primary mechanisms of the ions toxicity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 3—9

Key words: bactericidal action, metal cations, *S.pyogenes*

ВВЕДЕНИЕ

Токсическое действие высоких концентраций тяжелых металлов на патогенные и условно патогенные бактерии принципиально связано с реализацией двух ключевых механизмов — генерации свободных радикалов кислорода, разрушающих определенные структуры бактериальной клетки, или конкуренции с другими металлами за сайты связывания в макромолекулах, вытеснения этих металлов и блокирования тем самым сигнальных путей, обеспечивающих жизнедеятельность клетки бактерии [6, 9, 11, 12, 19].

Генерация активных метаболитов кислорода в биологических системах в большинстве своем ассоциирована с эффектами катионов железа и меди [11, 15]; блокирование специализированных металлосвязывающих сайтов макромолекул относят к свойствам катионов цинка или марганца, не реализующих свободно-радикальной токсичности, но способных, вместе с тем, ингибировать критически значимые метаболические процессы [13, 16, 17].

Известно, что цинк патоген-специфически снижает экспрессию шигатоксинов и других факторов вирулентности энтеропатогенных эшерихий [7, 8], усиливая, в то же время, активность генов вирулентности патогенных стрептококков, по отношению к которым марганец выступает фактором ограничения персистенции, проявляя свойства антагониста цинка [14]. Медь и цинк специфически ингибируют гемолитическую активность спирохет [10] и функционирование ферментов дыхательной цепи иерсиний [1]. В культурах стафилококков и синегнойной палочки эффекты катионов меди преимущественно реализуются как бактерицидные, действие цинка проявляется статически [3]. Опыты на патогенных и условно патогенных стрептококках позволяют описать патоген-специфическое бактерицидное действие катионов цинка [4].

Понятно, что общие антибактериальные эффекты токсических концентраций катионов тяжелых металлов могут зависеть [3, 7, 8] или не зависеть [1, 4, 10] от первичных механизмов реализации токсичности и, следовательно, получение доказательно предсказуемого результата в отношении конкретной бактериальной популяции требует скрининговых исследований, которые могли бы позволить сопоставить действие катионов металлов в экспериментальной системе, не связанной напрямую с первичными механизмами реализации их токсических свойств [3, 4].

Целью работы явилась оценка ингибирующего воздействия миллимоляр-

ных концентраций катионов металлов, различающихся первичными механизмами реализации токсичности, на культуру *S. pyogenes*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры бактерий *S. pyogenes* предоставлены из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов заведующим лабораторией, к.м.н. В.Г.Жуховицким. В работе использовали три клинических изолята *S. pyogenes*.

Для постановки реакций стандартизованную суспензию бактерий, полученную из суточных культур *S. pyogenes* и содержащую 10^8 КОЕ/мл, засеивали газоном из объема 1.0 мл суспензии в физиологическом растворе на стандартные стерильные чашки Петри диаметром 90 мм с питательным агаром Blood Base Agar (HiMedia Lab.), дополненным 10% нормальной лошадиной сыворотки (Микроген) и 1% глюкозы. Спустя 30 мин на поверхность газона с использованием 36-канального штампа-репликатора с диаметром наконечников 2.0 мм каплями объемом по 5 мкл наносили водные растворы сульфатов: меди $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, цинка $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, кобальта $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, никеля $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, марганца $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и железа $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ в 0.15 М NaCl (pH 7.12 — 7.21) с концентрацией по катионам металлов от 5×10^{-3} М до 5×10^{-1} М.

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

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

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

Для проверки наличия (отсутствия) в зонах задержки роста культур жизнеспособных бактерий и установления вклада бактерицидного компонента в действие солей металлов из центра зоны задержки роста микробиологической петлей диаметром 1,0 мм производили посевы материала в пробирки, содержавшие по 5,0 мл питательного бульона Nutrient Broth (HiMedia Lab.), дополненного 10% нормальной лошадиной сыворотки (Микроген) и 1% глюкозы. Образцы термостатировали в течение срока до пяти суток при 37°C, после чего оценивали прозрачность питательного бульона в сравнении с контрольным — стерильным.

В ходе экспериментов кислотность 0,15 М раствора NaCl контролировали с помощью базового электронного pH-метра Sartorius PB-11, укомплектованного электродом Sartorius PY-P11.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как показано на рис., в присутствии 50 мМ исследованных катионов металлов на газоне *S. pyogenes* формируются зоны задержки роста, диаметр которых варьирует от 3.86 мм на марганце до 5.64 мм на цинке и составляет в

среднем 4.57 мм. При этом действие катионов цинка в 1.46 раза превосходит эффекты катионов марганца.

В условиях десятикратного (от 50 до 500 мМ) повышения концентрации катионов металлов диаметр зон задержки роста на газоне *S. pyogenes* возрастает в среднем в 1.77 раза. В присутствии 500 мМ исследованных катионов диаметр зон задержки роста бактерий варьирует от 6.2 мм на меди до 9.39 мм на цинке и составляет в среднем (без катионов железа) 8.07 мм. При этом действие катионов цинка в 1.51 раза превосходит эффекты катионов меди (рис.).

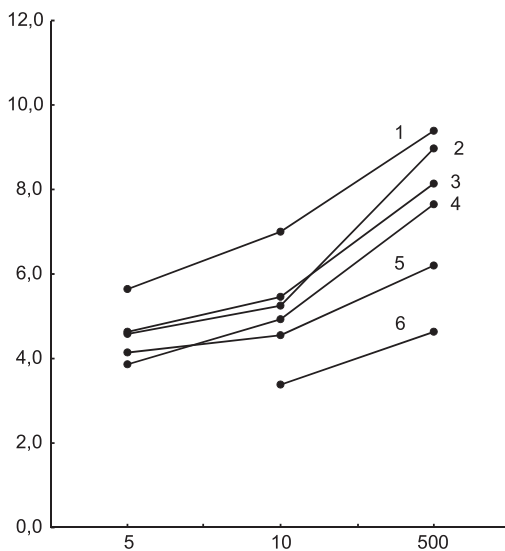
В присутствии 50 мМ катионов железа зона задержки роста *S. pyogenes* не формируется, 100 мМ железа образуют зону с диаметром 3.38 мм, который увеличивается до 4.63 мм, т.е. в 1.37 раза, при повышении содержания железа на газоне до 500 мМ. При этом действие катионов цинка превосходит эффекты 500 мМ катионов железа в 2.03 раза (рис.).

Посевы материала, полученного из зон задержки роста *S. pyogenes*, в питательный бульон обнаруживают, что в присутствии катионов кобальта, никеля и марганца на газоне сохраняются жизнеспособные бактерии, дающие активный рост и размножение в течение срока наблюдения до 5 суток и вызывающие помутнение питательного бульона. В присутствии катионов меди от 80 до 90% (в среднем 86.6%) проб остаются прозрачными, т.е. стерильными, в присутствии железа роста бактерий не обнаруживается в 50 — 100% (в среднем, в 77.7%) наблюдений, катионы цинка вызывают полную гибель бактерий в 10 — 45% (в среднем, в 28.3%) случаев.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных позволяет установить, что по эффектам на газоне культуры *S. pyogenes* исследованные катионы металлов распределяются в соответствии с определенной закономерностью. Относительно невысокую активность демонстрируют медь и железо, промежуточные эффекты реализуют кобальт, никель и марганец, наиболее высокий потенциал отличает катионы цинка. При этом высокую бактерицидную активность проявляют катионы железа и меди, умеренную — катионы цинка, отсутствие регистрируемой бактерицидной активности характеризует действие марганца, никеля и кобальта.

Очевидно, что общее антибактериальное действие исследованных катионов с необходимостью включает в себя бактерицидный и статический компоненты, причем металлы с выраженной бактерицидной активностью вызывают формирование на газоне культуры *S. pyogenes* меньших по диаметру зон задержки роста бактерий, чем катионы, воздействующие по совокупности ре-



Торможение роста бактерий *S. pyogenes* в присутствии миллимолярных концентраций двухвалентных катионов металлов.

По оси абсцисс: концентрация катионов металлов, мМ; по оси ординат: диаметр зоны задержки роста, мм. 1 — цинк, 2 — кобальт, 3 — никель, 4 — марганец, 5 — медь, 6 — железо. Представлены обобщенные результаты трех полных независимых постановок.

гистрируемых эффектов статически, но вызывающие образование на газоне заметно больших зон торможения роста культуры. Исключение составляют катионы цинка, формирующие наиболее крупные по размерам зоны задержки роста *S. pyogenes* и реализующие, вместе с тем, выраженное бактерицидное действие.

Исключительность действия цинка, реализующего в культуре *S. pyogenes* выраженные статические и бактерицидные эффекты, обоснованно связывать с его отмечаемыми многими исследователями патоген-специфическими свойствами, проявляющимися многофакторно — с позиций получаемого результата, и многоточечно — с позиций определения мишени локализации и топки реакции [4].

Снижая экспрессию гена *cnt*, кодирующего синтез транспортера кобальта и никеля, и вступая в прямую конкуренцию с кобальтом и никелем на этапе включения в клетку, катионы цинка практически отменяют инфлюкс никеля бактериями *Staphylococcus aureus* [17]. Подобными свойствами не обладают катионы меди, железа или марганца [17]. Специфичность действия цинка в отношении *Streptococcus pneumoniae* обеспечивается его избирательным импортом, реализуемым бактериями за счет работы специфических транспортеров *AdcA* и *AdcAII* [5]. Ингибирование гликолиза, переключение метаболизма на утилизацию галактозы и торможение роста *S. pyogenes* вызываются цинком, примененным в концентрациях, значительно меньших, чем при действии других катионов металлов [16]. В сравнении с катионами железа, меди, никеля, кобальта и марганца цинк выступает наиболее мощным ингибитором экспрессии факторов вирулентности энтеропатогенных и шигатоксигенных *Escherichia coli* [7, 8].

В отличие от цинка, не реализующего свободно-радикальной токсичности, медь и железо — переходные металлы, способные первично взаимодействовать с перекисью водорода, генерировать высокотоксичные гидроксил анион радикалы и атаковать металлосвязывающие сайты ферментов, которые обычно служат для присоединения нетоксичных катионов [19]. При этом двухвалентная и одновалентная медь эффективно конкурирует с другими металлами за белки цитозоля, а трехвалентное железо — за белки периплазмы [18]. Сравнение железа и меди между собой обнаруживает преимущество меди [18]. В ряду двухвалентных катионов аффинность белков к металлам также определяет предпочтительность связывания меди [18]. Не удивительно поэтому, что дополнение питательной среды железом или медью обуславливает повышение чувствительности спирохет *Borrelia burgdorferi* к токсическому действию пероксида [19], описано бактерицидное действие меди на микобактерии в фагосомах [6], а цинк, конкурируя с железом, ингибирует образование свободных радикалов и защищает от их деструктурирующего воздействия сульфгидрильные группы бактериальных белков [19].

Считают, что бактерицидность катионов металлов возрастает с ростом их окислительно-восстановительного потенциала [2]. В ряду исследованных катионов наибольший нормальный потенциал (0,34) демонстрирует медь, которая характеризуется и наиболее высокой электроотрицательностью, определяемой по Л.Полингу (1,9), с которой сопоставимы только катионы никеля (1,91), значительно, в то же время, уступающие меди по нормальному потенциалу (-0,23), но не реализующие в отношении *S. pyogenes* регистрируемого бактерицидного действия, а в культуре *B. burgdorferi* повышающие резистентность спирохет к токсическому воздействию пероксида [19]. Проявляющий третью по уровню в числе исследованных катионов электро-

отрицательность (1,88) при уровне нормального потенциала -0,27 кобальт обладает наиболее выраженным бактериостатическим действием в культурах *S.aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, не реализуя при этом, как и в нашем исследовании на газоне *S.pyogenes*, регистрируемых бактерицидных эффектов [2].

Известно, что определенную роль в поступлении металла в клетку бактерии может играть ионный радиус катиона. Так, *Bacillus subtilis* импортирует металл в комплексе с цитратом. При этом переносчик CitM работает по металлам меньшего ионного радиуса, чем 0.08 нм, а транспортер CitH — большего, чем 0.098 нм [14]. С учетом того, что ионный радиус меди составляет 0.096 нм, обоснованно полагать предпочтительность ее переноса белком CitH — в отличие от всех остальных исследованных катионов, наиболее близкий из которых по ионному радиусу к меди (марганец) имеет показатель 0.091 нм и, скорее всего, уже не будет транспортироваться белком CitH [14]. Но тогда все исследованные в работе (кроме меди) металлы, имеющие ионные радиусы, варьирующие в пределах от 0.078 нм (никель) до 0.091 нм (марганец), получают в качестве переносчика в комплексе с цитратом единственный общий специфический по цитрату транспортер CitM [14]. В условиях их высокой конкуренции между собой за сайты связывания в белках и ферментах [12], накопления в клетке количества катионов, создающего токсическую концентрацию, достаточную для реализации бактерицидного действия, с большой вероятностью, не происходит.

Понятно, что в предложенном контексте рассмотрены лишь отдельные параметры и функциональные показатели взаимодействия катионов металлов с бактериальной клеткой, которое по своей сути столь многопланово и разнообразно, что не подлежит дискретному анализу с точки зрения получения прогнозируемого результата на основе единичных алгоритмов сравнения. Само по себе существование фракции персистеров уже нивелирует возможность регистрации в использованной экспериментальной системе прямого бактерицидного действия даже при наличии такового, поскольку эта переживающая и в дальнейшем персистирующая фракция будет определять последующие рост и размножение бактерий в популяции, потерявшей в результате прямого токсического воздействия до более чем 90% жизнеспособных клеток.

Вместе с тем, если отсутствие регистрируемого бактерицидного действия катионов кобальта, никеля и марганца позволяет лишь допускать наличие в их эффектах бактерицидной компоненты, которую, в принципе, можно пытаться рассчитать аналитически, то достижение в ряде наблюдений полного бактерицидного эффекта катионов меди, железа и цинка свидетельствует о преодолении ими толерантности *S.pyogenes* к тяжелым металлам, неспособности систем детоксикации бактерий обеспечить форсированный эффлюкс катионов и накопления внутри бактериальных клеток эффективной токсической концентрации. Не исключено при этом, что определенные (по-видимому, начальные) стадии реализации эффекта находятся под контролем статического компонента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бузолева Л.С., Кривошеева А.М. Влияние тяжелых металлов на размножение патогенных бактерий. Успехи соврем. естествознания. 2013, 7: 30-33.
2. Савченко О.И., Кравчук Т.Н., Тапальский Д.В., Филиппова В.А. Антибактериальное действие катионов тяжелых металлов. Пробл. здоровья и экологии. 2014, 2 (40): 104-109.

3. Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Апресова М.А., Писковская Л.С., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии катионов меди и цинка. Журн. микробиол. 2015, 2: 9-17.
4. Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., 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. Журн. микробиол. 2017, 3: 26-35.
5. Bayle L., Chimalapati S., Schoehn G. et al. Zinc uptake by *Streptococcus pneumoniae* depends on both AdcA and AdcAII and is essential for normal bacterial morphology and virulence. Molec. Microbiol. 2011, 82 (4): 904-916.
6. Botella H., Stadthagen G., Lugo-Villarino G. et al. Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. Trends Microbiol. 2012, 20 (3): 106-112.
7. Crane J.K., Byrd I.W., Boedecker E.C. Virulence inhibition by zinc of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*. Infect. Immunity. 2011, 79 (4): 1696-1705.
8. Crane J.K., Naeher T.M., Shulgina I. et al. Effect of zinc on enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Infect. Immunity. 2007, 75 (12): 5974-5984.
9. Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of non-apoptotic cell death. Cell. 2012, 149: 1060-1072.
10. Dupont D.P., Duhamel G.E., Carlson M.P., Mathiesen M.R. Effect of divalent cations on hemolysin synthesis by *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae*: inhibition induced by zinc and copper. Vet. Microbiol. 1994, 41: 63-73.
11. Huynh C., Andrews N.W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. Cell. Microbiol. 2008, 10 (2): 293-300.
12. Kirsten A., Herzberg M., Voigt A. et al. Contributions of five secondary metal uptake systems to metal homeostasis of *Cupriavidus metallidurans* CH34. J. Bacteriol. 2011, 193 (18): 4652-4663.
13. Kloosterman T.G., Witwicki R.M., van der Kooi-Pol M.M. et al. Opposite effects of Mn^{2+} and Zn^{2+} on PsaR-mediated expression of the virulence genes *pcpA*, *prtA*, and *psaBCA* of *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 2008, 190 (15): 5382-5393.
14. Lensbouer J.J., Patel A., Sirianni J.P., Doyle R.P. Functional characterization and metal ion specificity of the metal-citrate complex transporter from *Streptomyces coelicolor*. J. Bacteriol. 2008, 190 (16): 5616-5623.
15. Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999, 51: 730-750.
16. Ong C.-I.Y., Walker M.J., McEwan A.G. Zinc disrupts central carbon metabolism and capsule biosynthesis in *Streptococcus pyogenes*. Scientific Reports. 2015, 5: 10 p.
17. Remy L., Carrière M., Derré-Bobillot M. et al. The *Staphylococcus aureus* Opp1 ABC transporter impairs nickel and cobalt in zinc-depleted conditions and contributes to virulence. Molec. Microbiol. 2013, 87 (4): 730-743.
18. Waldron K.J., Robinson N.J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? Nature Reviews Microbiol. 2009, 7 (1): 25-35.
19. Wang P., Lutton A., Olesik J. et al. A novel iron- and copper-binding protein in the Lyme disease spirochaete. Molec. Microbiol. 2012, 86 (6): 1441-1451.

Поступила 05.09.17

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

Е.О.Калиниченко, С.А.Сходова, Н.К.Ахматова, Н.А.Михайлова

ИММУНИЗАЦИЯ БЕЛКАМИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA OprF И aTox УСИЛИВАЕТ ФАГОЦИТАРНУЮ И БАКТЕРИЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ У МЫШЕЙ

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

Цель. Изучить влияние иммунизации вакцинным препаратом против синегнойной палочки на фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов периферической крови у мышей. *Материалы и методы.* Препарат: 25 мкг OprF, 50 мкг aTox, сорбированные на 75 мкг гидроксида алюминия (НПО Микроген). Для иммунизации препарат рекомбинантных белков смешивали в равных весовых долях с гелем гидроксида алюминия, разводили в фосфатно-солевом буфере и проводили сорбцию в течение 12 ч при 4°C. Вакцинный препарат вводили мышам-самкам линии BALB/c весом 14 — 16 г внутривентрально в объеме 0,5 мл. Фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови определяли по поглотительной способности убитых нагреванием FITC-меченных микробных клеток *Staphylococcus aureus* нейтрофилами и моноцитами периферической крови иммунизированных мышей методом проточной цитометрии. Бактерицидную активность лейкоцитов крови мышей оценивали в отношении живой культуры *S. aureus* на проточном цитофлюориметре Cytomix FC-500 (Beckman Coulter). *Результаты.* Введение мышам рекомбинантных белков *Pseudomonas aeruginosa* OprF и aTox, сорбированных на гидроксида алюминия, приводило к усилению фагоцитарной и бактерицидной активности *S. aureus* моноцитами и гранулоцитами периферической крови. Максимальное повышение численности фагоцитировавших моноцитов отмечено на 7, а гранулоцитов на 17 сутки после первой иммунизации. Бустерная иммунизация не приводила к дополнительной стимуляции фагоцитарной активности, но численность фагоцитировавших клеток была существенно ($p < 0,05$) выше контроля (интактные мыши). *Заключение.* Кандидатная вакцина против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox активирует клеточное звено иммунной системы с индукцией активности профессиональных макрофагов.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 10—15

Ключевые слова: рекомбинантные белки OprF и aTox *Pseudomonas aeruginosa*, фагоцитоз, бактерицидная активность

Е.О.Kalinichenko, S.A.Skhodova, N.K.Akhmatova, N.A.Mikhailova

IMMUNIZATION WITH PROTEINS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA OprF AND aTox ENHANCES THE PHAGOCYTTIC AND BACTERICIDAL ACTIVITY OF LEUKOCYTES IN MICE

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. To study the effect of vaccine preparation against *Pseudomonas aeruginosa* on the phagocytic and bactericidal activity of immunocompetent cells in mice. *Materials and methods.* Preparation: 25 µg of OprF, 50 µg of aTox sorbed by 75 µg of aluminum hydroxide. For immunization, the recombinant protein preparation was mixed in equal weight fractions with an aluminum hydroxide gel, diluted in phosphate buffered saline, and sorbed for 12 hours at 4°C. The vaccine preparation was administered intraperitoneally in 0.5 ml to BALB/c mice. The phagocytic activity of peripheral blood leukocytes was determined from the absorption capacity of heat-killed FITC-labeled *Staphylococcus aureus* by neutrophils and monocytes of immunized mice by flow cytometry. The bactericidal activity of mice blood leukocytes was assessed for the live culture of *S. aureus* using flow cytometry Cytomix FC-500 (Beckman Coulter). *Results.* Administration to mice of recombinant proteins *P. aeruginosa* OprF and aTox sorbed on aluminum hydroxide led to an increase in the phagocytic and bactericidal activity of monocytes and granulocytes of periph-

ral blood. The maximum increase in the number of phagocytized monocytes was observed on the 7th, and granulocytes on the 17th day after the first immunization. Booster immunization did not lead to additional stimulation of phagocytic activity, but the number of phagocytic cells was significantly ($p < 0.05$) higher than control (intact mice). *Conclusion.* Candidate vaccine against *P. aeruginosa* based on its recombinant proteins OprF and aTox activates the cellular unit of the immune system with the induction of the activity of professional macrophages.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 10—15

Key words: recombinant proteins OprF and aTox of *Pseudomonas aeruginosa*, phagocytosis, bactericidal activity

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, вызываемые *Pseudomonas aeruginosa*, представляют важную проблему медицинской практики. Факторами, определяющими трудности терапии этой патологии, являются значительная резистентность возбудителя к широкому спектру антибиотиков, хронический характер течения болезни, а также развитие ее на фоне снижения эффекторных функций врожденного иммунитета и соответственно резистентности организма к инфекции [9, 10].

Вторичные иммунодефицитные состояния могут приводить к затяжному течению, хронизации воспалительных процессов, частым рецидивам и осложнениям [1]. Этим определяется необходимость комплексной терапии синегнойной инфекции с использованием антибиотиков, ингибирующих развитие микроорганизма, и иммуотропных препаратов, воздействующих на ключевые эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета, активация которых должна способствовать полной элиминации возбудителя.

Исходя из современных представлений [4 — 8, 11, 12] о роли врожденного иммунитета, обеспечивающей не только первую линию защиты с немедленным сдерживанием распространения патогена, но участвующей также в процессинге, презентации антигена Т-лимфоцитам и осуществлении при этом инструктивной функции, определяющей направленность пути развития адаптивного иммунитета, становится необходимым проведение при синегнойной инфекции комплексных мероприятий профилактического характера с использованием препаратов, активирующих систему врожденного иммунитета, а также одновременно индуцирующих эффекторы адаптивного иммунитета к синегнойной палочке. В НИИВС им. И.И.Мечникова ведется разработка кандидатной вакцины против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox (делеционной атоксической формы экзотоксина А), сорбированных на гидроксиде алюминия.

Цель работы — изучить влияние иммунизации вакцинным препаратом против синегнойной палочки на фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов периферической крови у мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат: 25 мкг OprF, 50 мкг aTox, сорбированные на 75 мкг гидроксида алюминия (НПО Микроген). Для иммунизации препарат рекомбинантных белков смешивали в равных весовых долях с гелем гидроксида алюминия, разводили в фосфатно-солевом буфере и проводили сорбцию в течение 12 ч при 4°С. Вакцинный препарат вводили мышам-самкам линии BALB/с весом 14 — 16 г внутривентриально в объеме 0,5 мл.

Фагоцитарную активность определяли по поглотительной способности убитых нагреванием микробных клеток *S. aureus* нейтрофилами и моноцитами периферической крови иммунизированных мышей ($n=10$). Убитые нагреванием бактерии окрашивали FITC. К периферической крови мышей прибавляли FITC-меченные бактерии (10^9 микробных клеток/мкл).

Количество нейтрофилов и моноцитов, захвативших FITC-меченные бактерии, определяли с помощью проточной цитометрии (Cytomix FC-500, Beckman Coulter, США с СХР программным обеспечением). Гейт клеточной популяции определяли путем оценки фронтального и бокового светорассеивания и размера клеток; в каждом гейте оценивали 10 000 клеток. Результат представляли как процент нейтрофилов или моноцитов, фагоцитировавших убитые нагреванием FITC-меченные бактериальные клетки *S. aureus*.

Бактерицидную активность лейкоцитов крови мышей оценивали в отношении живой культуры *S. aureus* на проточном цитофлюориметре FC-500 (Beckman Coulter, США) в координатах FL1 и FL3. Лейкоцитарную суспензию, полученную на сроки 4 и 24 ч после иммунизации, инкубировали в течение 1 и 3 ч с суспензией живых микробных клеток *S. aureus*, меченных FITC. Непоглощенные лейкоцитами микробные клетки удаляли центрифугированием. Через 1 и 3 ч инкубации лейкоциты, захватившие живые бактерии, разрушали 10 мМ карбонатно-бикарбонатным буфером, содержащим 0,2% сапонина (Sigma, США). Погибшие внутриклеточно микробные клетки окрашивали йодидом пропидия. Этот флуорохром предназначен для окрашивания убитых микробных клеток. Среди общей популяции клеток *S. aureus*, окрашенных FITC, определяли процент убитых клеток стафилококка, окрашенных йодидом пропидия, и вычисляли процент убитых микробных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мышей иммунизировали дважды с интервалом в 14 дней. Исследовали фагоцитарную активность моноцитов и гранулоцитов по поглотительной способности *S. aureus* через 7 и 14 дней после каждой иммунизации (табл.). На 7 сутки после первой иммунизации отмечено повышение уровня фагоцитоза бактериальных клеток моноцитами в 1,82 раза, гранулоцитами в 1,46 раза по сравнению с интактными мышами. Высокий уровень активности фагоцитов сохранялся также на 14 сутки (76,64% моноцитов, повышение в 1,8 раза; 90,64% гранулоцитов, повышение в 1,7 раза по сравнению с контролем).

Повторное введение препарата не приводило к дополнительной стимуляции фагоцитов, так как уровень их активности на 7 и 14 сутки значимо снижался по сравнению с первой вакцинацией (с 63,08% до 67,38 — 63,08% — моноциты; с 90,64% до 75,02 — 73,58% — гранулоциты). Но активность профессиональных фагоцитов оставалась достаточно высокой по сравнению с контрольной группой, превышая значения в 1,5 раза (моноциты) и 1,4 раза (гранулоциты).

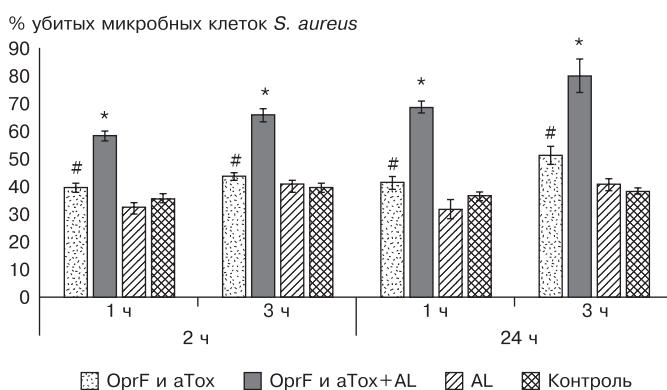
Оценка бактерицидной активности лейкоцитов под действием антигенных препаратов является одним из показателей активации врожденного иммунитета. Проведено сравнительное изучение бактерицидной активности лейкоцитов периферической крови мышей через 4 и 24 ч после однократной иммунизации рекомбинантными белками *P. aeruginosa* OprF и aTox, не сорбированными и сорбированными на гидроксиде алюминия, в отношении гетерологичного микроорганизма — убитых микробных клеток *S. aureus* (рис.).

Влияние иммунизации белками *P.aeruginosa* OprF и aTox на фагоцитарную активность клеток у мышей

Рек. белки OprF и aTox+AL	Моноциты, %	Достоверность различий между группами	Гранулоциты, %	Достоверность различий между группами
	M±SD Med(25%–75%)		M±SD Med(25%–75%)	
Контроль	42,76±1,33	P _{1и2} =0,0121	53,22±11,1	P _{1и2} =0,0081
	43(42,5–43)	P _{1и3} =0,012	51(43–62)	P _{1и3} =0,0122
		P _{1и4} =0,0119		P _{1и4} =0,0367
		P _{1и5} =0,0119		P _{1и5} =0,0122
	Первая иммунизация			
7 сут	77,82±5,29	P _{2и1} =0,0121	77,68±4,32	P _{2и1} =0,0081
	77,59(75,59–82,31)	P _{2и3} =0,676	79,9(72,2–80,7)	P _{2и3} =0,0122
		P _{2и4} =0,021		P _{2и4} =0,53
		P _{2и5} =0,012		P _{2и5} =0,21
	Вторая иммунизация			
14 сут	76,64±2,83	P _{3и1} =0,012	90,64±4,14	P _{3и1} =0,0122
	76,8(73,9–78,8)	P _{3и2} =0,676	91,8(88,4–92)	P _{3и2} =0,008
		P _{3и4} =0,0121		P _{3и4} =0,037
		P _{3и5} =0,0121		P _{3и5} =0,0122
	Вторая иммунизация			
7 сут	67,38±4,32	P _{4и1} =0,0119	75,02±13,47	P _{4и1} =0,0367
	68,3(63,7–69)	P _{4и2} =0,0215	79,3(71,9–79,5)	P _{4и2} =0,411
		P _{4и3} =0,1218		P _{4и3} =0,0367
		P _{4и5} =0,144		P _{4и5} =0,403
	14 сут	63,08±2,38	P _{5и1} =0,0119	73,58±3,65
62,8(61,9–64,5)		P _{5и2} =0,0122	73,4(70,2–75,5)	P _{5и2} =0,121
		P _{5и3} =0,0121		P _{5и3} =0,012
		P _{5и4} =0,143		P _{5и4} =0,403

Лейкоциты периферической крови мышей инкубировали с микробными клетками в течение 1 и 3 часов. Установлено, что бактерицидная активность лейкоцитов мышей, иммунизированных сорбированными белками, существенно отличалась от контроля. Усиление бактерицидной активности лейкоцитов происходило уже через 4 часа после введения препарата, что проявлялось в увеличении численности убитых микробных клеток с 57,9 до 65,36% при инкубации в течение 1 и 3 ч соответственно, по сравнению с контролем — 35,2 и 39,12% соответственно. Спустя 24 ч уровень бактерицидной активности лейкоцитов существенно увеличивался и доля убитых микробных клеток составила 68,3 и 79,54% при инкубации 1 и 3 ч соответственно. Несорбированные белки активировали бактерицидную активность позже (через 24 ч) и менее интенсивно, чем сорбированные белки. Гидроксид алюминия в отсутствие белков *P. aeruginosa* OprF и aTox не активировал бактерицидную активность лейкоцитов крови мышей.

Таким образом, введение мышам препарата приводило к усилению фагоцитарной и бактерицидной активности *S. aureus*



Бактерицидная активность лейкоцитов периферической крови мышей, иммунизированных рекомбинантными белками *P.aeruginosa* OprF и aTox, в отношении *S. aureus*.

Достоверность различий между опытом и контролем; * между сорбированными на гидроксиде алюминия и несорбированными белками, $p < 0,05$. Тест Манна-Уитни для независимых выборок.

лейкоцитами периферической крови на все сроки наблюдения. Максимальное повышение численности фагоцитировавших моноцитов отмечено на 7, а гранулоцитов на 17 сутки после первой иммунизации. Бустерная иммунизация не приводила к дополнительной стимуляции фагоцитарной активности, но численность фагоцитировавших клеток была существенно ($p < 0,05$) выше контроля (интактные мыши). Усиление бактерицидной активности лейкоцитов происходило уже через 4 часа после введения белков OprF и aTox, сорбированных на гидроксиде алюминия.

Фагоциты признаются важным компонентом врожденного звена иммунного ответа на патогены. Кроме того, в работах последних лет было показано, что фагоцитоз играет существенную роль в гомеостазе и ремоделировании тканей [2]. Оценка фагоцитарной активности характеризует функциональную активность иммунокомпетентных клеток, а вместе с тем, их способность распознавать и элиминировать из организма все чужеродное: микроорганизмы, а также трансформированные собственные клетки и ткани.

Кроме фагоцитарной функции профессиональные фагоциты играют ключевую роль в индукции адаптивного иммунного ответа, благодаря синтезу провоспалительных цитокинов, привлекающих в очаги инфекции соответствующие лимфоидные клетки, а также обеспечивают процессинг и представление антигена Т-лимфоцитам, определяющих поляризацию иммунного ответа [3].

Иммуносупрессивные состояния у современного человека стали главным вопросом медицины и источником проблем со здоровьем. Важную роль в ослаблении резистентности организма также играет появление новых штаммов, обладающих антибиотикорезистентностью.

Клиническое течение синегнойной инфекции обретает серьезный характер из-за устойчивости возбудителя к широкому спектру антибиотиков, поэтому актуальными становятся профилактика и лечение инфекции как у госпитализированных больных, так и у пациентов с муковисцидозом. Активация клеточного звена иммунной системы под воздействием препаратов на основе антигенов синегнойной палочки имеет важное значение в очищении организма от возбудителя. На основании проведенного фрагмента исследования показано, что рекомбинантные белки *P.aeruginosa* OprF и aTox, сорбированные на гидроксиде алюминия как при однократной, так и при двукратной иммунизации мышей, оказывали стимулирующее влияние на иммунокомпетентные клетки, которые обладали способностью распознавать бактериальные белки, о чем можно судить по стимуляции фагоцитоза инактивированных бактерий нейтрофилами и моноцитами периферической крови иммунизированных животных. Таким образом, кандидатная вакцина против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox активирует клеточное звено иммунной системы с индукцией активности профессиональных макрофагов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова Н.Б., Ефремова В.Н., Курбатова Е., Грубер И.М. Экспериментальная и клинико-иммунологическая оценка бесклеточной стафилококковой вакцины «Стафиловак». Журн. микробиол. 2008, 6:102-108.
2. Лямина С.В., Веденикин Т.Ю., Круглов С.В., Шимшелашвили Ш.Л., Буданова О.П., Малышев И.Ю., Малышев И.Ю. Особенности фагоцитарной и миграционной активности альвеолярных макрофагов M1 и M2 фенотипов. Фундаментальные исследования. 2011, 11 (3): 536-539.
3. Hazlett L.D. Role of innate and adaptive immunity in the pathogenesis of keratitis. Ocul. Immunol. Inflamm. 2005, 13 (2-3): 133-138.

4. Ip W.K.E., Hoshi N., Shouval D.S. et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*. 2017, 5; 356 (6337): 513-519. doi: 10.1126/science.aal3535.
5. Iwasaki A., Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* 2015 Apr; 16 (4): 343-53. doi: 10.1038/ni.3123.
6. Kaufmann S.H.E. *Novel vaccination strategies*. Wiley-VCH Verlag GmbH Co KGaA. Weinheim, 2004.
7. Kayama H., Takeda K. Functions of innate immune cells and commensal bacteria in gut homeostasis. *J. Biochem.* 2016 Feb; 159 (2): 141-9. doi: 10.1093/jb/mvv119.
8. Okabe Y., Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat. Immunol.* 2016, 17 (1): 9-17. doi: 10.1038/ni.3320.
9. Rodesney C.A., Roman B., Dhamani N. et al. Mechanosensing of shear by *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased levels of the cyclic-di-GMP signal initiating biofilm development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. pii: 201703255. doi: 10.1073/pnas.1703255114.
10. Shteinberg M., Schneer S., Lavon O., Adir Y. Long term treatment with macrolides in chronic lung diseases. *Harefuah*. 2016, 155 (9): 567-571.
11. Vivier E., Medzhitov R. Editorial overview: Innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2016;38:v-vii. doi: 10.1016/j.coi.2015.12.005.
12. Wang A., Huen S.C., Luan H.H. et al. Opposing effects of fasting metabolism on tissue tolerance in bacterial and viral inflammation. *Cell*. 2016, 8; 166 (6): 1512-1525.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.026.

Поступила 31.10.17

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Н.К.Ахматова¹, Е.О.Калиниченко¹, И.Д.Макаренкова², Э.А.Ахматова¹,
А.И.Тухватулин³, Д.Ю.Логунов³, Н.А.Михайлова¹*

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ БЕЛКОВ PSEUDOMONAS AERUGINOSA OprF И aTox

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, Владивосток; ³Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Изучение влияния белков OprF и aTox *Pseudomonas aeruginosa* на цитокиновый профиль дендритных клеток мышей. *Материалы и методы.* Дендритные клетки (ДК) получали из клеток костного мозга мышей при культивировании с 20 нг/мл рекомбинантных GM-CSF и IL-4 (Biosource, США). В качестве индуктора созревания использовали белки OprF и aTox *P. aeruginosa* (НИИВС им. И.И.Мечникова). Уровень цитокинов определяли в супернатантах ДК с использованием набора Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad, США). *Результаты.* Оценка профиля и уровня цитокинов, продуцируемых дендритными клетками мышей, демонстрирует высокую активность зрелых ДК. Под воздействием рекомбинантных белков OprF+aTox как несорбированных, так и сорбированных на гидроксиде алюминия, ДК синтезировали большое количество Th-1 цитокинов: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , Th-2 цитокинов: IL-4, IL-10, IL-13, регуляторных цитокинов: IL-12, IFN- γ , IL-17A и хемокинов: KC(CXCL1), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES(CCL5). В наших исследованиях продемонстрирована возможность получения культуры клеток, состоящей как из зрелых ДК, так и макрофагов из костномозговых предшественников мышей при цитокиновой стимуляции с использованием в качестве индуктора созревания ДК комплекса антигенов *P. aeruginosa*. *Заключение.* Кандидатная вакцина против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox индуцирует продукцию хемокинов и Th-1, Th-2, Th-17 цитокинов дендритными клетками у мышей.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 15—22

Ключевые слова: рекомбинантные белки OprF и aTox *Pseudomonas aeruginosa*, дендритные клетки, Th-1, Th-2, Th-17 цитокины

*N.K.Akhmatova*¹, *E.O.Kalinichenko*¹, *I.D.Makarenkova*², *E.A.Akhmatova*¹,
*A.I.Tukhvatulin*³, *D.Yu.Logunov*³, *N.A.Mikhailova*¹

THE CYTOKINE PROFILE OF MICE DENDRITIC CELLS UNDER THE INFLUENCE OF OprF AND aTox PROTEINS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok; ³Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. To study the effect of OprF and aTox proteins of *Pseudomonas aeruginosa* on the cytokine profile of mice dendritic cells. *Materials and methods.* Dendritic cells (DC) were obtained from bone marrow cells of BALB/c mice when cultured with 20 ng/ml of recombinant GM-CSF and IL-4 (Biosource, USA). OprF and aTox of *P. aeruginosa* were used as the inducer of maturation of DC. The level of cytokines was determined in supernatants of DC using the Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad, USA). *Results.* Evaluation of the profile and level of cytokines produced by dendritic cells of mice demonstrates the high activity of mature DC. Under the influence of recombinant proteins OprF+aTox, both large amounts of Th-1 cytokines were synthesized: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , Th-2 cytokines: IL-4, IL-10, IL-13, regulatory cytokines: IL-12, IFN- γ , IL-17A and chemokines: KC (CXCL1), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5). In our studies, we demonstrated the possibility of obtaining mature dendritic cells from the bone marrow of mice under the influence of a complex of *P. aeruginosa* antigens. *Conclusion.* The candidate *Pseudomonas aeruginosa* vaccine based on its recombinant proteins OprF and aTox induces the production of chemokines and Th-1, Th-2, Th-17 cytokines by mice dendritic cells.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 15–22

Key words: recombinant proteins OprF and aTox *Pseudomonas aeruginosa*, dendritic cells, Th-1, Th-2, Th-17 cytokines

ВВЕДЕНИЕ

Цитокины играют важную роль в развитии иммунного ответа. Они обеспечивают взаимодействие между иммунокомпетентными клетками и выполняют роль эффекторных молекул иммунных реакций. Функция цитокинов многогранна — они являются мессенджерами, обеспечивающими связь иммунной системы с гемопоэзом, с эндокринной и нервной системами [3]. Именно посредством цитокинов иммунная система регулирует многие процессы, связанные с метаболизмом, физиологической и репаративной регенерацией, оказывая поддерживающее влияние на гомеостаз. На цитокиновый баланс огромное влияние оказывает наше окружение, включая различные микробы.

Важной задачей медицинской практики является разработка препаратов, обладающих активирующим влиянием на эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета против *Pseudomonas aeruginosa*. В НИИВС им. И.И. Мечникова ведется разработка кандидатной вакцины против синегнойной палочки на основе ее рекомбинантных белков OprF и aTox (делеционной атоксической формы экзотоксина А), сорбированных на гидроксиде алюминия.

Цель работы — изучение влияния рекомбинантных белков OprF и aTox *P. aeruginosa* на цитокиновый профиль дендритных клеток мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат: 25 мкг OprF, 50 мкг aTox, сорбированные на 75 мкг гидроксида алюминия (НПО «Микроген»). Препарат рекомбинантных белков смешивали в равных весовых долях с гелем гидроксида алюминия, разводили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и проводили сорбцию в течение 12 часов при температуре 4°C.

ДК получали из клеток костного мозга мышей линии BALB/c. Костный мозг мышей гомогенизировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США), трижды осаждали центрифугированием (250 g x 5 мин) и переводили в обогащенную среду культивирования (10⁶ клеток в 1 мл среды RPMI-1640 с добавлением 100 мкг/мл гентамицина сульфата и 10% термоактивированной эмбриональной телячьей сыворотки — ЭТС), содержащую по 20 нг/мл рекомбинантные GM-CSF и IL-4 (Biosource, США). На шестые сутки производили смену среды и в культуру незрелых ДК (нДК) мышей вносили вакцинный препарат по 15 мкл на миллилитр культуральной жидкости. В качестве классического индуктора созревания (позитивный контроль) использовали коммерческий TNF- α (20 нг/мл, Biosours, США).

Уровень цитокинов определяли в супернатантах ДК на 9 сутки культивирования с исследуемыми препаратами на приборе Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader. Исследовали содержание 23 цитокинов и хемокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, Eotaxin (CCL11), G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC (CXCL1), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), TNF- α) с использованием набора Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay (BioRad, USA) согласно инструкции производителя.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10. Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли в рамках непараметрической базовой статистики с использованием U-критерия Mann-Whitney. Различия рассматривались как значимые при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. и на рис. представлены данные влияния рекомбинантных белков OprF и aTox *P. aeruginosa* на синтез цитокинов в культуре дендритных клеток мышей. TNF- α , используемый в качестве референс-препарата, в меньшей степени индуцировал продукцию цитокинов ДК, чем исследуемые белки синегнойной палочки. Индекс стимуляции Th-1 цитокинов относительно контроля (нДК) колебался от 1,9 до 2,9 уе. Комплекс белков OprF+aTox в 18,7 — 117,9 раза сильнее стимулировал синтез цитокинов по сравнению с нДК, а по сравнению с TNF- α -ДК — в 8,74 — 28,9 раза. Наиболее высокая активность наблюдалась в отношении сорбированных белков (OprF + aTox +AL). Их активность по сравнению с нДК была повышена в 66,5 — 320,5 раза, а TNF- α -ДК — в 18,2 — 110,2 раза.

Из всех исследованных Th-1 цитокинов отмечено максимальное повышение уровня IL-6 и IL-1 α под воздействием OprF + aTox (соответственно 6809,5 пг/мл и 3362,25 пг/мл) и OprF + aTox +AL (10929 пг/мл и 9888 пг/мл).

Показатели Th-2 цитокинов (IL-4, IL-10 и IL-13) повышались не столь активно, как Th-1 (табл.). TNF- α стимулировал в пределах 1,13 — 1,68 уе., OprF+aTox — 1,84 — 3,3 уе., а сорбированные белки — 2,93 — 22,27 уе. по сравнению с нДК. Соответственно эти показатели повышались в 1,62 — 2,19 раза и 2,58 — 7,6 раза под воздействием белков без адьюванта и с ним.

Уровень цитокинов в супернатантах ДК мышей, пг/мл

Th-1 цитокины				
Препарат	IL-1 α	IL-1 β	IL-6	TNF- α
OpGF + aTox	3362,25 \pm 220,25*#	1213,5 \pm 85,5*#	6809,5 \pm 1098,5*#	1600 \pm 66,22*#
OpGF + aTox +AL	9888 \pm 1019*#	4630,75 \pm 120,75*#	10929 \pm 968,75*#	5701 \pm 153,68*#
TNF- α	266,75 \pm 1,25*	42 \pm 5*	598,5 \pm 5,5*	183,13 \pm 4,1*
нДК	92 \pm 4#	22 \pm 1#	57,75 \pm 57,75#	85,7 \pm 0,2#
Th-2 цитокины				
Препарат	IL-4	IL-10	IL-13	
OpGF + aTox	42,22 \pm 0,69*#	716,9 \pm 77,95*#	906 \pm 11,87*#	
OpGF + aTox +AL	147,55 \pm 19,6*#	1293,255 \pm 25,47*#	1438,8 \pm 50,8*#	
TNF- α	19,26 \pm 1,09*	395,97 \pm 4,09*	557,23 \pm 0,2*	
нДК	13,09 \pm 0,1#	235,87 \pm 11,72#	490,89 \pm 7,57#	
Регуляторные цитокины				
Препарат	IL-12(p40)	IL-12(p70)	IFN- γ	IL-17A
OpGF + aTox	10628 \pm 1561*#	1936 \pm 124,7*#	7946,7 \pm 1202,7*#	456,5 \pm 35,5*#
OpGF + aTox +AL	15320 \pm 2635*#	8435 \pm 819*#	8392,5 \pm 176,5*#	785,5 \pm 210*#
TNF- α	3181 \pm 102,5*	265,5 \pm 30,6*	458,7 \pm 17,25*	117,1 \pm 32,3*
нДК	933,5 \pm 14,5#	183 \pm 0,2#	86 \pm 6#	82,7 \pm 4,1#
Хемокины				
Препарат	KC(CXCL1)	MIP-1 α (CCL3)	MIP-1 β (CCL4)	RANTES (CCL5)
OpGF + aTox	7046,7 \pm 1202*#	4738 \pm 137,75*#	5613,75 \pm 378,75*#	14121 \pm 1543*#
OpGF + aTox +AL	8392,5 \pm 176,5*#	1204,5 \pm 176*#	8629,25 \pm 627,75*#	19672 \pm 1332*#
TNF- α	458,75 \pm 17,25*	2777,25 \pm 18,75*	3911,25 \pm 377,75*	796 \pm 89*
нДК	86 \pm 6#	552,75 \pm 66,25#	745,75 \pm 16,75#	164 \pm 10#

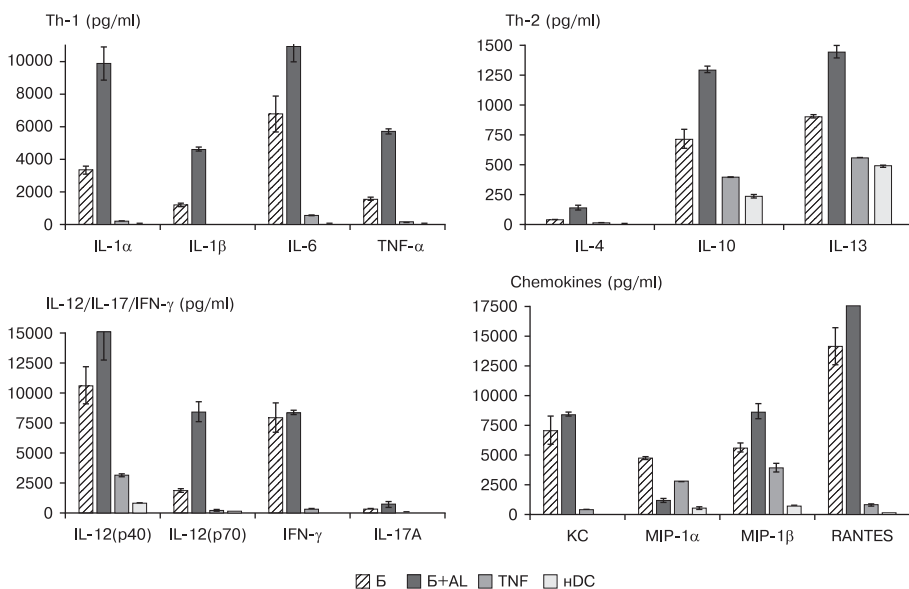
Примечание. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение; достоверность различий по сравнению: * с контролем (нДК), # TNF- α (классический индуктор), P<0,01 (тест Манна-Уитни).

Наиболее высокий уровень выявлен у IL-13, затем у IL-10 под действием OpGF + aTox +AL (соответственно 1438,8 пг/мл и 906 пг/мл) и OpGF + aTox (соответственно 716,9 пг/мл и 716,9 пг/мл).

В отношении регуляторных цитокинов максимально сработали сорбированные белки, затем сами белки, действующие классического индуктора TNF- α на ДК было умеренным. Важным цитокином, участвующим в презентации антигена и запуске адаптивного иммунного ответа является IL-12. Цитокин IL-12 состоит из двух разных субъединиц: IL-12p35 (MW 35 кДа) + IL-12p40 (MW 40 кДа). Считается, что субъединица IL-12p70 является биоактивной и IL-12p40 — регуляторной.

Регуляторный гетеродимер IL-12p40 повышался интенсивнее биоактивного гетеродимера IL-12(p70). Если при введении в культуру OpGF + aTox ДК синтезировали IL-12(p70) в пределах 1936 пг/мл, а OpGF + aTox +AL — 8435 пг/мл, то IL-12(p40) соответственно — 10628 пг/мл и 15320 пг/мл.

В целом, уровень IL-12 под влиянием белков синегнойной палочки повышался в 10,57 — 11,4 раза относительно контроля (нДК) и в 3,34 — 7,29 раза по сравнению с классическим индуктором созревания, а под воздействием сорбированных белков — соответственно в 16,4 — 46 раза и в 4,82 — 31,7 раза.



Цитокиновый профиль дендритных клеток мышей под воздействием белков *Pseudomonas aeruginosa* OprF и aTox.

Б — OprF + aTox; Б+AL — OprF + aTox + AL; TNF — TNF- α ; нДК — незрелые ДК.

Действие сорбированных и несорбированных белков на продукцию ДК IFN- γ практически было сопоставимым. Они обладали максимальной активностью по сравнению с классическим индуктором созревания (TNF- α), выявлено повышение с 86 пг/мл (нДК) до 458,7 пг/мл (TNF- α -ДК), 7946,7 пг/мл (OprF + aTox) и 8392,5 пг/мл (OprF + aTox + AL).

Отмечены высокий уровень IL-17A под воздействием сорбированных на гидроксиде алюминия белков (785,5 пг/мл) и несорбированных (456,5 пг/мл), активность классического индуктора была умеренной (117,1 пг/мл), всего лишь в 1,42 раза превышала уровень IL-17A в супернатантах нДК.

Изучение продукции ДК хемокинов показало высокую активность OprF + aTox + AL и OprF + aTox по сравнению с TNF- α и контролем. Белки синегнойной палочки повышали уровень продукции KC (CXCL1) в 81,8 и 15,36 раза по сравнению с нДК и TNF- α . Сорбированные белки соответственно — в 97,59 и 18,3 раза. Уровень группы CC хемокинов (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) также был существенно выше ($p < 0,05$) в супернатантах OprF+aTox+AL-ДК и OprF+aTox-ДК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка профиля и уровня цитокинов, продуцируемых дендритными клетками мышей, демонстрирует высокую активность зрелых ДК. Под воздействием рекомбинантных белков OprF+aTox как несорбированных, так и сорбированных на гидроксиде алюминия, ДК синтезировали большое количество Th-1 цитокинов: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , Th-2 цитокинов: IL-4, IL-10, IL-13, регуляторных цитокинов: IL-12, IFN- γ , IL-17A и хемокинов: KC (CXCL1), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5). При этом в культуральной жидкости не выявлено уровня других исследованных цитокинов: IL-2, IL-3, IL-5, IL-9, Eotaxin (CCL11), G-CSF, GM-CSF, что подтверждает присутствие в культуре дифференцированных антигенпрезентирующих клеток.

IL-1 и IL-6 являются мощным фактором дифференцировки В- и Т-лимфоцитов, главным индуктором конечного этапа созревания В-клеток и макрофагов, а также цитотоксических лимфоцитов [12]. Действуя синергически с IL-3, они вызывают дифференцировку стволовых клеток костного мозга. Повышение концентрации TNF- α ведет к усилению выработки IL-6 [13].

Повышенная концентрация IL-12 в культуральной среде генерированных клеток индуцирует образование IFN- γ в Т-лимфоцитах, который, в свою очередь, влияет на приобретение Т-лимфоцитами свойств Th-1 типа [1,2]. IL-12 представляет собой 70 кДа гетеродимерный цитокин, состоящий из двух р35 (35 кДа) и р40 (40 кДа) субъединиц, связанных дисульфидной цепочкой. IL-12 в основном продуцируется фагоцитами (моноцитами/макрофагами и нейтрофилами) в ответ на бактериальные продукты и внутриклеточные паразиты. IL-12 способствует иммунной защите, индуцируя Th-1 иммунный ответ, усиливая цитотоксичность естественных киллеров и продукцию IFN- γ [21]. Субъединица р40 секретируется в виде мономера или гомодимера, часто в 10 — 50-кратном избытке над биологически активным IL-12p70. Предполагается, что IL-12p40 является естественным антагонистом IL-12p70, действуя, по крайней мере частично, путем конкурентного связывания с рецептором IL-12 [16].

Несмотря на то, что уровень IL-12 и IFN- γ варьировал в зависимости от внесенных в культуру ДК препаратов, но в то же время был в десятки раз выше по сравнению с уровнем их в культуре незрелых ДК. Высокий уровень и спектр цитокиновой продукции свидетельствуют о приобретении ДК под воздействием белков синегнойной палочки свойств, необходимых для эффективной презентации антигена и примирования иммунного ответа.

В то же время, в культуре ДК было обнаружено повышенное содержание не только Th-1, но и Th-2 противовоспалительных цитокинов, в частности IL-10, IL-13 и в меньшей мере IL-4. Воспаление характеризуется сложным взаимодействием про- и противовоспалительных медиаторов. Оптимальный баланс их поддерживает гомеостаз, тогда как нарушение баланса, связанное с мощным высвобождением провоспалительных цитокинов, приводит к нежелательным последствиям. Провоспалительные цитокины обладают способностью снижать продукцию провоспалительных цитокинов моноцитами/макрофагами, а также влиять на некоторые из их действий [14].

IL-17A играет центральную роль в защите хозяина от различных патогенов. Он продуцируется не только активированными Т-клетками, но и определенными типами клеток врожденной иммунной системы [8]. В нашем исследовании ДК, созревшие под воздействием рекомбинантных белков OpgF и aTox P. aeruginosa, в 5,5-9,4 раза интенсивнее продуцировали IL-17A, по сравнению с незрелыми ДК.

Активный белок IL-17A функционирует как гомодимер с другими членами семейства IL-17, сигналы, передаваемые через рецептор IL-17, способны индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов. IL-17A регулирует активность NF- κ B и митоген-активированных протеинкиназ. Этот цитокин может стимулировать экспрессию IL-6 и циклооксигеназы-2 (PTGS2/COX-2), а также усилить образование оксида азота (NO) [20].

Было доказано, что IL-17A в основном играет роль в защите от инфекций, вызванных внеклеточными бактериями и грибами. Первичная функция Th-17 клеток, по-видимому, заключается в контроле микробиоты кишечника, предотвращающей заражение внеклеточными патогенами, такими как

Klebsiella pneumoniae, *Mycoplasma pneumoniae*, *Candida albicans*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* [5]. Также было выявлено, что IL-17A подавляет вирусную инфекцию, в частности грипп, путем стимулирования нейтрофильного воспаления [7].

Было также показано, что антигенспецифические клетки Th-17 распознают консервативные белковые антигены среди различных штаммов *K. pneumoniae* и обеспечивают защиту от серотипа с широким спектром [6]. Кроме того, также было выявлено, что иммунизация пневмококковым антигеном обеспечивала опосредованную IL-17, но не зависящую от антител защиту от *S. pneumoniae* [15]. Функцией этих Т-хелперов является защита от внеклеточных патогенов, которые не могут эффективно элиминироваться Т-хелперами 1 и 2 типов. Кроме того, Th-17 часто ассоциированы с различными аутоиммунными процессами, в том числе и с аллергическими реакциями. В настоящее время накопилось много свидетельств в участии Th-17 в регуляции противоопухолевого иммунного ответа [4, 18].

В наших исследованиях ДК экспрессировали большое количество хемокинов: KC(CXCL1), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5).

Хемокиновый (СХС мотив) лиганд 1 (CXCL1) представляет собой небольшой цитокин, принадлежащий к семейству хемокинов СХС [22, 23]. CXCL1 экспрессируется макрофагами, нейтрофилами и эпителиальными клетками и хемоаттрактантом для нейтрофилов [17]. CXCL1 играет роль в развитии спинного мозга за счет ингибирования миграции предшественников олигодендроцитов и участвует в процессах ангиогенеза, артериогенеза, воспаления, заживления ран и опухолевого генеза [10]. Этот хемокин вызывает его эффекты посредством передачи сигнала через хемокиновый рецептор CXCR2 [19]. Исследования на мышах показали, что CXCL1 уменьшает тяжесть рассеянного склероза и может оказывать нейрозащитную функцию [11].

Все три изоформы связанные с ростом белка, growth-related protein (GRO), представляют собой хемокины СХС, которые могут сигнализировать через хемокиновые рецепторы С-Х-С 1 или 2 (CXCR1/2). GRO-белки — хемоаттрактанты, активирующие нейтрофилы и базофилы. Их основная роль — защита хозяина от полимикробного сепсиса, повышение активности межклеточной адгезионной молекулы 1 (ICAM-1) и миграции нейтрофилов. Белок также активирует митоген-активированные протеинкиназы (МАРК), провоспалительные белки и NF- κ B [9].

Таким образом, ДК, обработанные белками синегнойной палочки, синтезируют широкий набор цитокинов *in vitro*, которые могут индуцировать активацию сложных механизмов межклеточных взаимодействий. В наших исследованиях продемонстрирована возможность получения культуры клеток, состоящей как из зрелых ДК, так и макрофагов из костномозговых предшественников мышей при цитокиновой стимуляции с использованием в качестве индуктора созревания ДК комплекса антигенов *P. aeruginosa*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину. М., Медицина, 2004.
2. Семенов Б.Ф., Ахматова Н.К., Киселевский М.В. и др. Клеточные и молекулярные события при введении поликомпонентной бактериальной вакцины и заражении *S. typhimurium*. Молек. мед. 2005, 4: 48-54.
3. Aliyari S.Z., Ebrahimi K.A., Mehdipour A. et al. Regulation and roles of CD26/DPPIV in hematopoiesis and diseases. Biomed. Pharmacother. 2017 Apr 24; 91: 88-94. doi: 10.1016/j.biopha.
4. Chang S.H., Mirabolfathinejad S.G., Katta H. et al. T helper 17 cells play a critical patho-

- genic role in lung cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2014, 111 (15): 5664-5669. doi:10.1073/pnas.1319051111.
5. Chen K., Kolls J.K. T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Ann. Rev. Immunol.* 2013, 31: 605-633. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100019.
 6. Chen K., McAleer J.P., Lin Y. et al. Th17 cells mediate clade-specific, serotype-independent mucosal immunity. *Immunity*. 2011, 35 (6): 997–1009. doi:10.1016/j.immuni.2011.10.018.
 7. Crowe C.R., Chen K., Pociask D.A. et al. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J. Immunology*. 2009, 183 (8): 5301-5310. doi:10.4049/jimmunol.0900995.
 8. Cua D.J., Tato C.M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews. Immunology*. 2010, 10 (7): 479-489.
 9. Dorner B.G., Scheffold A., Rolph M.S. et al. MIP-1, RANTES, and ATAC lymphotactin function together with IFN- α type 1 cytokines. *PNAS*. 2002, 99 (9): 6181-6186.
 10. Jakovcevski I., Filipovic R., Mo Z. et al. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front. Neuroanat.* 2009, 3: 5. doi: 10.3389/neuro.
 11. Juszczak M., Głabiński A. Th17 cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*. 2009 Oct 23; 63: 492-501.
 12. Ketko A.K., Lin C., Moore B.B. et al. Surfactant protein A binds flagellin enhancing phagocytosis and IL-1 β production. *PLoS One*. 2013, 8 (12): e82680. doi: 10.1371/journal.pone.0082680.
 13. Khan R., Basha A., Goverdhanam R. et al. Attenuation of TNF- α secretion by L-proline-based cyclic dipeptides produced by culture broth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, 25 (24): 5756-5761. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.10.075.
 14. Kumagai J., Hirahara K., Nakayama T. Pathogenic Th cell subsets in chronic inflammatory diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2016, 39 (2):114-123. doi: 10.2177/jsci.39.114.
 15. Lu Y.J., Gross J., Bogaert D. et al. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathogens*. 2008, 4 (9): e1000159. doi:10.1371/journal.ppat.100015.
 16. Moutsopoulos N.M., Zerbe C.S., Wild T. et al. Interleukin-12 and Interleukin-23 blockade in leukocyte adhesion deficiency type 1. *New Engl. J. Med.* 2017 Mar 23; 376 (12):1141-1146. doi: 10.1056/NEJMoal612197.
 17. Planagumà A., Domènech T., Pont M. et al. Combined anti CXC receptors 1 and 2 therapy is a promising anti-inflammatory treatment for respiratory diseases by reducing neutrophil migration and activation. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2015, 34:37-45. doi: 10.1016/j.pupt.2015.08.002.
 18. Shekhar S., Peng Y., Wang S. et al. CD103+ lung dendritic cells (LDCs) induce stronger Th1/Th17 immunity to a bacterial lung infection than CD11b^{hi} LDCs. *Cell Mol. Immunol.* 2017 Feb 13. doi: 10.1038/cmi.2016.68.
 19. Silva R.L., Lopes A.H., Guimarães R.M. et al. CXCL1/CXCR2 signaling in pathological pain: Role in peripheral and central sensitization. *Neurobiol. Dis.* 2017 Jun 3; 105: 109-116. doi: 10.1016/j.nbd.2017.06.001.
 20. Varelias A., Ormerod K.L., Bunting M.D. et al. Acute graft-versus-host disease is regulated by an IL-17-sensitive microbiome. *Blood*. 2017, 129 (15): 2172-2185. doi: 10.1182/blood-2016-08-732628.
 21. Wang Y., Fan K.T., Li J.M. et al. The regulation and activity of interleukin-12. *Front. Biosci (Schol Ed)*. 2012 Jan 1, 4: 888-899.
 22. Zlotnik A., Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012 May 25; 36 (5): 705-716. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.008.
 23. Zlotnik A., Yoshie O., Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol.* 2006, 7: 243.

Поступила 21.11.17

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

А.Г.Киреева^{1,2}, О.В.Калинина^{3,4}, А.М.Киселев³,
Н.И.Брико⁵, Е.В.Глушкова⁵, А.В.Дмитриев^{1,2}

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЭЛЕМЕНТА ICE-emm12, СОДЕРЖАЩЕГО ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ tetM И ermB, СРЕДИ РОССИЙСКИХ И ВЬЕТНАМСКИХ ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ А

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский государственный университет; ³Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова, Санкт-Петербург; ⁴Санкт-Петербургский государственный технологический институт «Технический университет»; ⁵Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Цель. Характеристика и изучение распространенности генетического элемента ICE-emm12, ассоциированного со вспышками стрептококковых заболеваний в Юго-Восточной Азии, среди российских и вьетнамских штаммов СГА. *Материалы и методы.* Изучены 96 штаммов, выделенных в 2007 — 2014 гг. Молекулярно-генетические эксперименты проводили по опубликованным методикам. Полногеномное секвенирование осуществляли по технологии MiSeq. *Результаты.* На основе анализа данных высокопроцессивного секвенирования в геноме вьетнамского штамма V31 идентифицирован фрагмент (61028 п.н.), гомологичный интегративно-конъюгативному элементу ICE-emm12 и содержащий гены устойчивости к MLS-антибиотикам (ermB) и тетрациклину (tetM). Этот элемент обнаружен у 12 (26,1%, типы emm12.0, emm12.22) из 46 вьетнамских штаммов и у 2 (4,0%, типы emm12.0, emm88.2) из 50 российских штаммов. У 13 из 14 штаммов ICE-emm12 интегрирован в структурную область гена РНК-метилтрансферазы, являющегося «горячей точкой» рекомбинаций. Во всех штаммах ICE-emm12 обнаруживался в линейной интегрированной форме и в замкнутой циклической форме, что указывает на возможность его дальнейшего горизонтального переноса. *Заключение.* Обнаружение у российских штаммов ICE-emm12 элемента, способного к переносу генов устойчивости к антибиотикам с учетом активного развития туризма в страны Юго-Восточной Азии указывают на необходимость постоянного молекулярно-эпидемиологического надзора за циркуляцией клонов-возбудителей стрептококковых заболеваний в России.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 23—30

Ключевые слова: стрептококки группы А, мобильные генетические элементы, устойчивость к антибиотикам

A.G.Kireeva^{1,2}, O.V.Kalinina^{3,4}, A.M.Kiselev³,
N.I.Briko⁵, E.V.Glushkova⁵, A.V.Dmitriev^{1,2}

AN OCCURRENCE OF ICE-emm12 GENETIC ELEMENT CONTAINING tetM AND ermB RESISTANCE GENES AMONG RUSSIAN AND VIETNAMESE GROUP A STREPTOCOCCAL STRAINS

¹Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg; ²Saint-Petersburg State University; ³Almazov North-West Federal Medical Research Centre, Saint-Petersburg; ⁴Saint-Petersburg State Technological Institute (Technical University); ⁵Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. Goal of the study is characterization and analysis of an occurrence of ICE-emm12 genetic element associated with streptococcal outbreaks, among Vietnamese and Russian GAS strains. *Materials and methods.* A total of 96 strains isolated in 2007 — 2014 in Moscow, Saint-Petersburg and different provinces of Vietnam were studied. Molecular genetic experiments were done as previously described. Whole genome sequencing was done using MiSeq technology. *Results.* Complete genome sequencing of Vietnamese strain V31 revealed the presence of 61028 bp fragment homologous to integrative and conjugative element ICE-emm12 containing resistance genes

to MLS-antibiotics (*ermB*) and tetracycline (*tetM*). This element was discovered in 12 (26,1%, types *emm12.0*, *emm12.22*) out of 46 Vietnamese strains, and 2 (4,0%, types *emm12.0*, *emm88.2*) out of 50 Russian strains. In 13 out of 14 strains, ICE-*emm12* was integrated in RNA-methyltransferase gene, which is possibly the «hot spot» for recombination. In all the strains ICE-*emm12* was present in two forms: integrated linearized form and excised circular form with potential to be horizontally transferred. *Conclusion.* The presence of ICE-*emm12* containing antibiotic resistance genes and associated with streptococcal outbreaks in South East Asia, among Russian GAS strains together with the fact of intensive tourism industry indicate the need of molecular epidemiological surveillance for circulation of epidemiologically actual streptococcal clones in Russia.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 23—30

Key words: group A streptococci, mobile genetic elements, antibiotic resistance

ВВЕДЕНИЕ

Патогенные стрептококки серологической группы А (СГА, *Streptococcus pyogenes*) являются одними из наиболее распространенных возбудителей широкого спектра генерализованных, системных и местных заболеваний человека. СГА вызывают тонзилло-фарингит, скарлатину, рожистое воспаление, импетиго, флегмоны, инвазивные заболевания и др., а также приводят в инвалидизирующим осложнениям, таким как ревматизм и гломерулонефрит [4].

Широкое и бесконтрольное применение антибиотиков при лечении стрептококковых инфекций постепенно привело к формированию и росту лекарственной устойчивости СГА. В частности, важной проблемой в настоящее время является увеличивающийся рост уровня устойчивости СГА к MLS-антибиотикам (макролидам, линкозамидам и стрептограмину В) [6 — 9, 11, 15]. Изучение генетики СГА, устойчивых к макролидам, и анализ вызванных ими эпидемических вспышек выявили наличие в геномах штаммов СГА разнообразных мобильных генетических элементов (МГЭ), содержащих детерминанты устойчивости к антибиотикам [14]. Приобретение таких МГЭ обеспечивает клонам-реципиентам селективные преимущества, приводя к их быстрому распространению среди людей. Так, большинство штаммов СГА, выделенных во время вспышки скарлатины в Гонконге в 2011 г., относились к типу *emm12* и были устойчивы к макролидам [10]. Полногеномное секвенирование двух из этих штаммов выявило наличие в их геномах фрагментов ДНК размерами 64,9 т.п.н. и 46,4 т.п.н., представляющих собой соответственно интегративно-конъюгативный элемент ICE-*emm12*, кодирующий устойчивость к тетрациклину и макролидам за счет наличия генов *tetM* и *ermB*, и профага, кодирующий суперантиген *SpeC* и ДНКазу *Spd1* [13].

Поскольку вспышке скарлатины в Гонконге предшествовало увеличение частоты заболеваний скарлатиной на 40% во Вьетнаме в 2009 г. [12], целью исследования явился анализ штаммов СГА, выделенных во Вьетнаме в 2012 — 2014 гг., а также штаммов СГА, выделенных в России, на наличие генетических детерминант устойчивости к MLS-антибиотикам и тетрациклину.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе изучены следующие штаммы СГА: 46 штаммов различных типов, выделенных в 2012 — 2014 гг. от детей младшего школьного возраста (7 — 10 лет) во время экспедиций Совместного российско-вьетнамского тропическо-

го научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой) и Института экспериментальной медицины в различные регионы Вьетнама [1]; 18 штаммов типа emm12 из коллекции Института экспериментальной медицины, выделенных в 2007 г. в Санкт-Петербурге от детей школьного возраста, больных скарлатиной, гнойным синуситом, тонзиллитом, а также носителей [2]; 32 штамма различных типов из коллекции Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, выделенных в 2008 — 2011 гг. при инвазивных инфекциях мягких тканей в отделении гнойной хирургии 23 ГКБ им. «Медсантруд» (Москва).

Штаммы культивировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ на агаризованных средах или в среде Todd-Hewitt Broth (Becton Dickinson, США), содержащей 0,2% дрожжевого экстракта (Difco, США). Устойчивость штаммов к действию антибиотиков определяли диско-диффузионным методом.

Геномную ДНК выделяли методом фенол/хлороформенной экстракции. Качество ДНК анализировали на спектрофотометре Nanodrop 1000 (ThermoScientific, США). Концентрацию ДНК определяли на флуориметре Quantifluor-ST (Promega, США).

Для полногеномного секвенирования был выбран штамм V31, выделенный в 2012 г. в провинции Куанг Чи (Вьетнам). Библиотеку фрагментов ДНК готовили с использованием набора реагентов Illumina Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Качество полученной библиотеки оценивали с помощью анализатора Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) и ПЦР в режиме реального времени согласно инструкции Sequencing Library qPCR Quantification Guide (Illumina). Ампликоны метили с использованием Nextera XT Index Kit (Illumina) согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit, v3, 2x300.

Сборку контигов проводили при помощи программы SPAdes, версия 3.6.2, с параметрами по умолчанию. Предварительно первые 17 нуклеотидов в ридях с праймерами были удалены с помощью программы fastx_trimmer (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Геном штамма V31 был охарактеризован 58 контигами. В анализе использовали контиги размером не менее 5 т.п.н. Аннотирование полученных в результате полногеномного секвенирования контигов осуществляли с использованием алгоритма RAST (<http://rast.nmpdr.org>). Биоинформатический анализ контигов проводили с использованием базы данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) и программного обеспечения CLC Genomics Workbench (www.clcbio.com).

Все штаммы СГА анализировали методом ПЦР на наличие генов ermB, tetM, iap, int, xis, ORF39, входящих в состав ICE-emm12 элемента (табл. 1). ПЦР проводили в следующем режиме: первичная денатурация ДНК — 3 мин при 95°C; 30 циклов амплификации — 15 сек при 95°C, 1 мин при температуре отжига праймеров, 1 мин при 72°C; окончательная достройка — 10 мин при 72°C. Электрофорез ПЦР продуктов проводили в 1% агарозном геле, и ДНК визуализировали при помощи бромистого этидия в проходящем УФ-свете.

Электрофорез ДНК в пульсирующем электрическом поле проводили по ранее опубликованной методике [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для полногеномного секвенирования был выбран штамм V31, относящийся к наиболее распространенному во Вьетнаме типу emm12. В результате биоинформатического анализа результатов высокопроцессивного секвенирова-

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген	Кодируемый белок	Последовательности праймеров (5'→3')	Температура отжига, °C	Размер амплификата
iap	Предшественник эндопептидазы р60	For: cgccacctgaataactcttttga Rev: ccgccaccattaagaaagtc	52	536
int	Интеграза	For: ttttcttaaatgctcgtaaagcc Rev: aaagagaagcaacaggagcg	50	173
xis	Экстизионаза	For: aagcagactgagattccta Rev: gcgtccaatgtatctataa	50	193
tetM	Белок, препятствующий связыванию рибосомы с молекулой тетрациклина	For: agccctgttagtaccaccagcag Rev: ttcaattgagtgctcactgatgtccga	50	191
ermB	23S рРНК (аденин(2058)-N(6))-метилтрансфераза	For: attggaacaggtaaagggc Rev: gaacatctgttggtatggcg	55	441
ORF39	Поверхностный белок	For: ccagtagtaaatctattccat Rev: agatattacagaaaatgcagaa	50	258
3'- и 5'-концевые фрагменты ICE- <i>emm12</i>		circ: acttaacaccaagctaattgggaata cirr: accttagaggtaacacttaccga	50	593
Участки хромосомной ДНК в направлении 5'- и 3'- от места интеграции ICE- <i>emm12</i>		inf: ataacgacggctgatggattacta inr: accaagtgttattctgtagacc	50	500

ния был обнаружен контиг размером 83954 п.н., содержащий гены устойчивости к MLS-антибиотикам (*ermB*) и тетрациклину (*tetM*). В пределах этого контига была выявлена последовательность размером 61028 п.н. (GC-состав 39,5%), гомологичная интегративно-конъюгативному элементу ICE-*emm12*, обнаруженному ранее в геноме штамма НКУ16, который был выделен в Гонконге от больного скарлатиной [13].

Аннотирование ICE-*emm12* элемента штамма V31 было выполнено с помощью алгоритма RAST. Данный элемент включает 53 открытые рамки считывания (ORFs), из которых 49 транскрибируются в одном направлении с генами *ermB* и *tetM* (рис.).

Анализ функций генов, входящих в состав ICE-*emm12* элемента в штамме V31, выявил в нем несколько характерных частей, в том числе: А — конъюгативный модуль, Б — модуль, содержащий гены антибиотикоустойчивости, В — участок, отвечающий за рекомбинацию (рис.).

Конъюгативный модуль включает в себя ORF42-44, ORF46 и ORF48-49, кодирующие семь консервативных белков, которые участвуют в процессе конъюгации. По-видимому, эти гены являются частью системы секреции IV С-типа, недавно обнаруженной у стрептококков, которая вместе с другими белками, например, хеликазой и ORF32, может осуществлять конъюгативный перенос ICE. Модуль, отвечающий за антибиотикоустойчивость, представлен полноразмерным транспозоном Tn6002 (20880 п.н.), насчитывающим 20 ORFs (ORF8 — ORF27), из которых ORF13 является геном устойчивости к тетрациклину (*tetM*), а ORF22 — геном устойчивости к эритромицину (*ermB*) [14]. Транспозон Tn6002 интегрирован в участок, содержащий гены ABC транспортеров, обеспечивающих защиту бактерий от действия многих антибиотиков (ORF5 — ORF7, ORF28, ORF29). Участок, отвечающий за рекомбинацию, содержит ген серин-зависимой рекомбиназы.

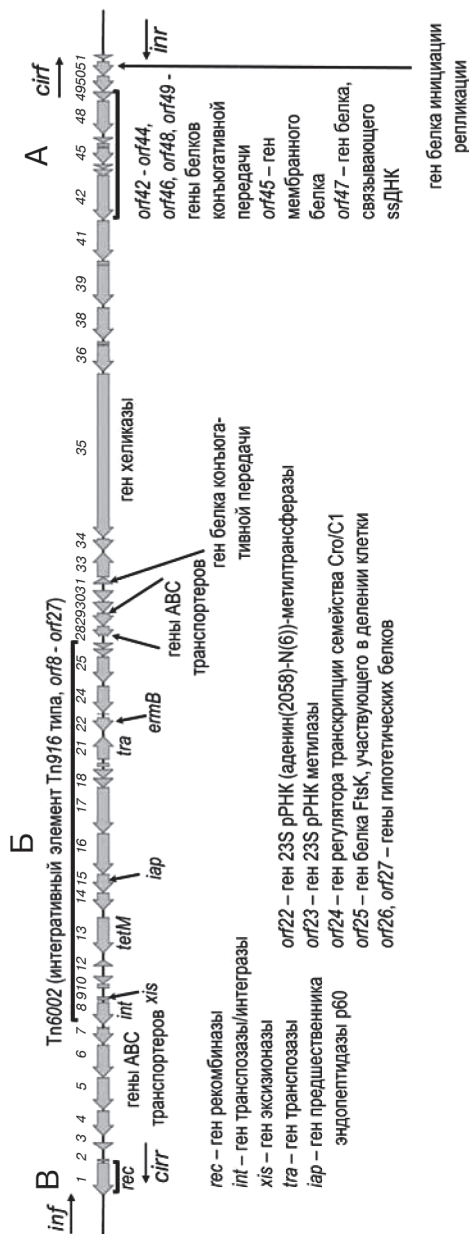
Сравнительный анализ ICE-*emm12* элемента во вьетнамском штамме V31 и гонконгском штамме НКУ16 обнаружил отсутствие в штамме V31 фрагмента размером 1100 п.н., кодирующего транспозазу, и фрагмента размером 2750 п.н., кодирующего два белка, один из которых участвует в конъюгации, а второй представляет собой ревертазу [13].

В то же время, в обоих штаммах ICE-*emm12* элемент интегрирован в ген РНК-метилтрансферазы (между нуклеотидами 1.114.028 и 1.114.029 референсного штамма СГА М1 SF370) [13]. Сравнительный анализ установил, что данная область является «горячей точкой» для рекомбинационных событий: в этом же месте генома в штамме MGAS2096 (тип *emm12*) располагается мобильный генетический элемент 2096-RD.2, содержащий ген устойчивости к тетрациклину *tetO*, а в штамме MGAS6180 (тип *emm28*) — интегративно-конъюгативный элемент 6180-RD.1. При этом все три элемента, ICE-*emm12*, 2096-RD.2 и 6180-RD.1, значительно отличаются друг от друга [3].

С целью изучения распространённости ICE-*emm12* элемента среди других штаммов, выделенных во Вьетнаме, был выбран маркерный ген ORF39, а также гены, расположенные в пределах транспозона Tn6002 (*ermB*, *tetM*, *iap*, *int*, *xis*) (рис.). Для их детекции методом ПЦР были сконструированы соответствующие пары праймеров (табл. 1), а ДНК штамма V31 была использована в качестве положительного контроля.

Наличие всех перечисленных генов было обнаружено у 12 штаммов типа *emm12* (*emm12.0*, *emm12.22*), что свидетельствует о наличии у них ICE-*emm12* элемента (табл. 2). Наличие 5 из 6 анализируемых генов, за исключением *ermB*, было обнаружено у шести штаммов типов *emm44.0* и *emm104.0*. Не исключено, что эти штаммы также имеют ICE-*emm12* элемент, но в нем вместо транспозона Tn6002 содержится транспозон Tn916, единственным отличием которого от Tn6002 является отсутствие гена *ermB* [14]. У одного штамма типа *emm89.24* был обнаружен ген *ermB*, но отсутствовали другие гены, ассоциированные с ICE-*emm12* (табл. 2). Вероятно, в этом штамме *ermB* входит в состав другого элемента, например, ICESp116 [14]. Присутствие генов *iap*, *int*, *xis*, *tetM* и отсутствие генов *ermB*, ORF39 у 23 штаммов свидетельствует о наличии у них транспозона Tn916, обеспечивающего устойчивость к тетрациклину и широко распространённого в популяции СГА (табл. 2). Следует отметить, что только у 4 вьетнамских штаммов не было обнаружено ни одного из анализируемых генов.

Согласно данным настоящего исследования и литературным данным,



Генетическая организация элемента ICE-*emm12* в штамме V31.

Таблица 2. Распространенность генов интегративно-конъюгативного элемента ICE-emm12 среди российских и вьетнамских штаммов СГА

emm тип (количество штаммов)	Наличие гена ermB	Наличие генов транспозона (tetM, iap, int, xis)	Наличие генов элемента ICE-emm12 (ORF39)	Элемент
Штаммы, выделенные во Вьетнаме				
emm12.0 (9), emm12.22 (3)	+	+	+	ICE-emm12
emm44.0 (2), emm104.0 (4)	—	+	+	ICE-emm12-Tn916
emm89.24 (1)	+	—	—	возможно, ICESp116
emm4.0 (4), emm8.0 (1), emm12.0 (1), emm44.0 (4), emm104.0 (3), emm109.0 (1), emm109.1 (6), emm170.0 (2), emm170.2 (1)	—	+	—	Tn916
emm22.0 (1), emm58.0 (1), emm75.1 (1), emm170.1 (1)	—	—	—	—
Штаммы, выделенные в Санкт-Петербурге				
emm12.0 (1)	+	+	+	ICE-emm12
emm12.0 (3)	—	+	—	Tn916
emm12.0 (14)	—	—	—	—
Штаммы, выделенные в Москве				
emm88.2 (1)	+	+	+	ICE-emm12
emm41.2 (1), emm49.8 (1), emm64.0 (1), st221.0 (1)	—	+	—	Tn916
emm28.0 (1), emm44.0 (1), emm53.0 (1), emm64.0 (1), emm66.0 (1), st2940.2 (1)	—	tetM ⁺ , iap ⁻ , int ⁻ , xis ⁻	—	—
emm1.0 (1), emm1.47 (1), emm28.0 (2), emm32.2 (1), emm60.1(1), emm66.0 (1), emm66.1 (1), emm73.0 (1), emm76.0 (1), emm77.0 (1), emm80.0 (1), emm84.0 (4), emm88.2 (5)	—	—	—	—

ICE-emm12 элемент широко распространен среди штаммов типа emm12, выделенных у детей в странах Юго-Восточной Азии [1, 13]. Для того, чтобы определить, насколько широко ICE-emm12 представлен в штаммах, выделенных в России, коллекция штаммов типа emm12, выделенных в 2007 г. в Санкт-Петербурге от детей школьного возраста, была проанализирована на наличие ICE-emm12. В результате, все искомые гены, ассоциированные с ICE-emm12, были обнаружены только у 1 штамма из 18 (табл. 2). Дополнительный анализ 32 штаммов различных emm типов, выделенных в Москве в 2008 — 2011 гг., показал, что все гены, ассоциированные с ICE-emm12, присутствуют лишь у 1 штамма. Этот штамм принадлежал к редко встречающемуся типу emm88.2 и при этом был единственным из 32 штаммов, который содержал ген ermB.

С учетом установленной локализации ICE-emm12 в геноме штамма V31 (ген РНК-метилтрансферазы) были сконструированы две пары праймеров, inf — cirr (размер ампликона 479 п.н.) и ing — cirf (размер ампликона 453 п.н.) (рис., табл. 1). В состав каждой из этих пар входил праймер, соответствующий 5'- или 3'-концевому фрагменту ICE-emm12 (cirr или cirf), и праймер, соответствующий участку хромосомной ДНК в направлении 5'- или 3'- от места интеграции ICE-emm12 (inf или ing).

В результате анализа амплификатов было установлено, что во всех штаммах, выделенных во Вьетнаме (типы emm12.0, emm12.22), и в 1 штамме, выделенном в Москве (тип emm88.2), сайт интеграции ICE-emm12 был такой же, как в штамме V31. В то же время, в штамме типа emm12.0, выделенного в

Санкт-Петербурге, элемент ICE-emm12 интегрирован в другой участок хромосомы.

Доказательством мобильности интегративно-конъюгативного элемента является его перенос в процессе конъюгации от одной бактерии к другой, при этом необходимым условием является образование циклической формы элемента. Существование у исследуемых штаммов циклических форм элемента ICE-emm12 и предполагаемого элемента ICE-emm12-Tn916, наряду с их интегрированными линейными формами, было доказано при помощи ПЦР с парами праймеров *cirf-cirr* (размер апмпликона 593 п.н.) и *inf-inr* (размер апмпликона 500 п.н.) (рис.). Положительные результаты ПЦР свидетельствовали, что часть бактериальных клеток каждого конкретного штамма содержит интегрированные линейные формы ICE, а у части клеток ICE выщепляется, переходя в циклическую форму с возможностью дальнейшего горизонтального переноса.

Увеличение уровня устойчивости штаммов СГА к эритромицину и клиндамицину за счет распространения штаммов emm12.0 типа, содержащих гены *int*, *xis*, *tetM* и *ermB*, было зарегистрировано в 2005 – 2013 гг. в странах Юго-Восточной Азии (Китай, Тайвань, Япония) [6, 13]. В ряде случаев эти штаммы были ассоциированы со вспышками стрептококковых инфекций [13]. В данной работе элемент ICE-emm12, содержащий перечисленные гены, был выявлен у 12 штаммов СГА типов emm12.0 и emm12.22, выделенных во Вьетнаме в 2012 – 2014 гг., а также у 1 штамма типа emm12.0, выделенного в 2007 г. в Санкт-Петербурге, и у 1 штамма типа emm88.2, выделенного в 2008 г. в Москве. Дополнительный анализ 12 штаммов СГА, выделенных во Вьетнаме, методом электрофореза в пульсирующем электрическом поле выявил их клональную идентичность (данные не приведены), подтверждая определенные эволюционные преимущества в результате приобретения ICE-emm12 элемента.

В то же время, остается открытым вопрос о клоне-реципиенте ICE-emm12 элемента, а также месте и времени его приобретения. С одной стороны, не исключено, что ICE-emm12 был приобретен одним из клонов СГА типа emm12 в Юго-Восточной Азии в конце 2000-х годов, с другой — присутствие ICE-emm12 в штамме редко встречающегося типа emm88.2, выделенного в 2008 г. в Москве, оставляет открытым вопрос об истинной роли этого элемента в эволюции и эпидемиологии стрептококков группы А.

Учитывая, что Юго-Восточная Азия является регионом биоразнообразия возбудителей многих инфекционных болезней и формирования новых эпидемически значимых клонов, существует риск заноса на территорию России высоковирулентных клонов микроорганизмов, включая и стрептококки. В связи с этим, обнаружение среди российских штаммов СГА генетического элемента ICE-emm12, ассоциированного со вспышками стрептококковых заболеваний в Юго-Восточной Азии, указывает на необходимость постоянного молекулярно-эпидемиологического надзора за циркуляцией эпидемически значимых клонов-возбудителей стрептококковых заболеваний в России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Носик А.Г., Ильясов Ю.Ю., Линь Ф.К., Дмитриев А.В. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика стрептококков, выделенных у детей младшего школьного возраста во Вьетнаме. Журн. инфектологии. 2015, 7 (3): 112-118.
2. Полякова Е.М., Мнацаканян Е.С., Бурова Л.А., Дмитриев А.В. Генетическая гетерогенность штаммов *Streptococcus pyogenes* генотипа emm12. Медицинский академический журнал. 2010, 10 (1): 39-44.

3. Beres S.B., Musser J.M. Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome. *PLoS One*. 2007, 2 (8): e800.
4. Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K. et al. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infectious Diseases*. 2005, 5 (11): 685-694.
5. Elliot J.A., Farmer K.D., Facklam R.R. Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field gel electrophoresis type. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 2115-2116.
6. Feng L.J., Lin H.R., Ma Y.L. et al. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* from Chinese pediatric patients in association with Tn916 transposons family over a 16-year period. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*. 2010, 67 (4): 369-375.
7. Guy R., Williams C., Irvine N. et al. Increase in scarlet fever notifications in the United Kingdom, 2013/14. *Eurosurveillance*. 2014, 19 (12): 20749.
8. Ip M., Lyon D.J., Leung T. et al. Macrolide resistance and distribution of *erm* and *mef* genes among beta-haemolytic streptococci in Hong Kong. *European J. Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 2002, 21 (3): 238-240.
9. Kataja J., Huovinen P., Seppala H. Macrolide resistance study G. Erythromycin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 2000, 46 (5): 789-792.
10. Luk E.Y., Lo J.Y., Li A.Z. et al. Scarlet fever epidemic, Hong Kong, 2011. *Emerging Infectious Diseases*. 2012, 18 (10): 1658-1661.
11. Olivieri R., Morandi M., Zanchi A. et al. Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* over 14 years in an area of central Italy. *J. Medical Microbiology*. 2015, 64: 1186-1195.
12. ProMED-Mail (2009, June 20). *Streptococcus, group A, scarlet fever — Vietnam*. Retrieved December 06, 2015.
13. Tse H., Bao J.Y.J., Davies M.R. et al. Molecular characterization of the 2011 Hong Kong Scarlet Fever Outbreak. *J. Infectious Diseases*. 2012, 206 (3): 341-351.
14. Varaldo P.E., Montanari M.P., Giovanetti E. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2009, 53: 343-353.
15. Yan J.J., Wu H.M., Huang A.H. et al. Prevalence of polyclonal *mefA*-containing isolates among erythromycin-resistant group A streptococci in southern Taiwan. *J. Clinical Microbiology*. 2000, 38 (7): 2475-2479.

Поступила 05.11.17.

Контактная информация: Киреева Александра Геннадьевна,
197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12, р.т. (812)234-05-42

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*А.Е.Платонов¹, J.Koetsveld², Н.М.Колясникова^{1,3}, О.А.Стуколова¹,
А.С.Долгова¹, М.Г.Топоркова⁴, Д.С.Сарксян⁵*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА С *VORRELIA MIYAMOTOI*, ВОЗБУДИТЕЛЕМ ИКСОДОВОГО КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА

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

Цель. Исследованы последствия инкубации *Vorrelia miyamotoi* с нейтрофилами. *Материалы и методы.* Спирахеты *V. miyamotoi* штамма НТ31 инкубировали 3 часа при 37°C с нейтрофилами здоровых доноров (5*10⁶ клеток/мл) в пропорции 1:1. Среда инкубации содержала также неиммунную сыворотку крови здоровых доноров (СЗД) и в ряде экспериментов высокоиммунную сыворотку крови переболевших ИКБ-БМ (С-ИКБ-БМ). Методом темнопольной микроскопии оценивали долю нейтрофилов, связавших боррелии, а также количество и жизнеспособность (подвижность) свободных боррелий. *Результаты.*

В СЗД или С-ИКБ-БМ, инактивированной нагреванием, свободно плавающие боррелии остаются жизнеспособными, но около 10% боррелий оказывается связанными с нейтрофилами. В С-ИКБ-БМ с нейтрофилами доля свободных жизнеспособных боррелий снижается приблизительно на 10% по сравнению с С-ИКБ-БМ без нейтрофилов, еще около 15% связывается нейтрофилами. При добавлении хемоаттрактанта fMLP доля нейтрофилов, связавших боррелии, возрастает до 25%, а доля иммобилизованных не связанных боррелий достигает 40%. *Заключение.* Хотя нейтрофилы способны уничтожать боррелии при контакте или без контакта с ними, в модельных условиях совместное действие высокоиммунной сыворотки крови и нейтрофилов человека не обеспечивает 100% элиминации *B. miyamotoi*.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 30—38

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, *Borrelia miyamotoi*, нейтрофилы, *in vitro*, антитела, система комплемента

A.E. Platonov¹, J. Koetsveld², N.M. Kolyasnikova^{1,3}, O.A. Stukolova¹, A.S. Dolgova¹, M.G. Toporkova⁴, D.S. Sarksyanyan⁵

BACTERICIDAL EFFECT OF HUMAN SERUM ON *BORRELIA MIYAMOTOI*, CAUSATIVE AGENT OF IXODES TICK-BORNE BORRELIOSIS

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

Aim. In this paper we investigate the impacts of co-incubation of *Borrelia miyamotoi* with neutrophils. *Materials and methods.* Spirochetes *B. miyamotoi*, strain HT31, were incubated 3 hours at 37°C with neutrophils of healthy donors (5×10^6 cells/ml) in a 1:1 ratio. The incubation medium contained also non-immune serum of healthy blood donors (SHD) and, in some experiments, high-immune serum of patients recovered from ITBB-BM (S-ITBB-BM). The proportion of neutrophils that bound borrelia, as well as the number and viability (mobility) of free borrelia, was estimated by dark-field microscopy. *Results.* Free-swimming borrelia remain viable in SHD or heat-inactivated S-ITBB-BM, but about 10% of borrelia are associated with neutrophils. In S-ITBB-BM with neutrophils, the proportion of viable borrelia among free ones decreases by approximately 10% compared to S-ITBB-BM without neutrophils; in addition about 15% of borrelia become bound by neutrophils. If chemoattractant fMLP was added, the proportion of neutrophils binding borrelia increases to 25%, and the proportion of immobilized non-bound borrelia reaches 40%. *Conclusion.* Although neutrophils are able to destroy borrelia with or without direct contact, under model conditions the combined effect of blood neutrophils and high-immune human serum does not provide 100% elimination of *B. miyamotoi*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.2, P. 30—38

Key words: Ixodes tick-borne borreliosis, *Borrelia miyamotoi*, neutrophils, *in vitro*, antibodies, complement system

ВВЕДЕНИЕ

Классический иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) — это болезнь Лайма (БЛ), вызываемая спирохетами *Borrelia burgdorferi sensu lato*, переносимыми «твердыми» клещами рода *Ixodes*. «Мягкие» клещи рода *Ornithodoros*, встречающиеся преимущественно в зонах теплого и жаркого климата, переносят иные виды боррелий (*B. hermsii*, *B. duttonii* и др.), вызывающих клещевые возвратные лихорадки (КВЛ) [4]. Несмотря на широкое распространение БЛ

и КВЛ, поражающих миллионы людей ежегодно, взаимодействие нейтрофилов, моноцитов/макрофагов и других клеток иммунной системы с патогенными боррелиями изучено недостаточно. Известно, что боррелии могут быть фагоцитированы, в той или иной степени они вызывают дегрануляцию нейтрофилов, выделение активных форм кислорода, продукцию цитокинов и иных биологически активных соединений [14, 20]. Истощение фагоцитирующих макрофагов, дендритных клеток, нейтрофилов приводит к развитию высокой спирохетемии после подкожной инъекции *B. hermsii* или *B. duttonii* мышам, возможна гибель животных [4, 22]. С другой стороны, утверждается, что Т-независимая продукция специфических IgM необходима и достаточна для защиты мышей от КВЛ [11]. Роль фагоцитов в защите от локализованной и генерализованной форм БЛ также неясна. Возможно, нейтрофилы и макрофаги не способны в полной мере реализовать свои протективные функции, поскольку многие патогенные боррелии экспрессируют белки, угнетающие фагоцитоз, например OspB и OspC [10, 12].

Иксодовый клещевой боррелиоз, вызванный *Borrelia miyamotoi* (ИКБ-БМ) — новое инфекционное заболевание, открытое в 2003 — 2009 гг. и клинически более близкое к КВЛ, чем к БЛ [1, 8, 15]. На стадии реконвалесценции ИКБ-БМ (7 — 21 день заболевания) наблюдается продукция специфических IgM к переменным основным липопротеинам наружной мембраны *B. miyamotoi* — variable major lipoproteins (VMPs), разделяемым на два семейства: variable small lipoproteins (Vsp) и variable large lipoproteins (Vlp); Vlp, в свою очередь, разделяются на подсемейства Alpha, Gamma и Delta [9, 21]. Антитела к VMPs, как было показано в работе [7], обладают комплемент-зависимым бактерицидным действием на *B. miyamotoi*, но не обеспечивают, по крайней мере *in vitro*, гибели 100% спирохет. Об участии фагоцитов в борьбе с инфекцией *B. miyamotoi* на ранней стадии заболевания и во время реконвалесценции ничего не известно. В данной работе рассматриваются последствия взаимодействия *B. miyamotoi* с нейтрофилами при инкубации в сыворотке крови здоровых неиммунных доноров или сыворотке переболевших ИКБ-БМ, богатой специфическими антителами к VMPs.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источник сывороток крови лиц, переболевших ИКБ-БМ, методы выявления специфических антител к *B. miyamotoi* и подготовки штамма боррелий к исследованию описаны ранее [7]. Вкратце, сыворотки собраны в ходе систематического исследования клиники ИКБ-БМ [8, 15]; уровень антител к четырем антигенным вариантам VMPs, называемым Vlp15/16, Vlp18, Vsp1 и Vlp5, измеряли с помощью разработанного в ЦНИИ эпидемиологии планарного белкового биочипа; штамм *B. miyamotoi* HT31 подращивали в специализированной жидкой среде МКР-FS [6, 13] до концентрации около 10^7 боррелий/мл. Подсчет числа боррелий, а также контроль их жизнеспособности проводили методом темнопольной микроскопии.

Экспериментальная среда состояла из трех-пяти компонентов (табл.). В лунки с U-образным дном полипропиленового 96-луночного планшета добавляли компонент 1, сыворотку крови здорового донора (СЗД) без IgM и IgG к боррелиям. В отсутствие второго компонента объем компонента 1 составлял 50% от общего объема экспериментальной среды, то есть 50 мкл. В некоторых опытах вместо СЗД использовали инактивированную нагреванием СЗД (ИН-СЗД), в которой литическая активность системы комплемента (СК) равнялась

нулю. В качестве 2 компонента как источник специфических антител использовали смесь, в равных долях, сывороток крови 6 переболевших ИКБ-БМ (МІХ6) 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 10^7 /мл боррелий в среде МКР-FS. Таким образом, во всех экспериментальных условиях в начале эксперимента в лунке находилось $5 \cdot 10^6$ /мл спирохет, 90 — 95% из которых были подвижными.

Нейтрофилы здорового донора выделяли из цельной крови с EDTA с помощью центрифугирования на среде Mono-Poly Resolving Medium согласно инструкции производителя (MP Biomedicals, США). После двукратной отмывки фосфатным буфером нейтрофилы пересуспензировали в компоненте 1 или смеси 1 и 2 компонентов до концентрации 10^7 клеток/мл. Соответственно, в начале эксперимента с нейтрофилами в лунке находилось $5 \cdot 10^6$ /мл нейтрофилов (компонент 4). Таким образом, концентрация фагоцитов и отношение числа фагоцитов к числу боррелий (1 к 1) имитировали нормальный состав крови в условиях высокой для ИКБ-БМ спирохетемии. В ряде экспериментов для активации нейтрофилов добавляли компонент 5: пептидный хемоаттрактант fMLP до финальной концентрации 1 мкМ/л.

После окончательного заполнения лунок планшет немедленно заклеивали и помещали в термостат для инкубации в условиях постоянного активного встряхивания-перемешивания. Через 1 час и через 3 часа инкубации из каждой лунки отбирали по 5 мкл и наносили на предметное стекло под покровное стекло. Оценка доли подвижных и неподвижных боррелий, а также доли нейтрофилов, связавших боррелии, 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 и 100 нейтрофилов, как правило, в 5 — 6 полях зрения (подробнее см. в [7]).

Все статистические расчеты и оценки проведены с помощью лицензионной программы IBM SPSS Statistics 19. Для оценки значимости различий распределений количественных переменных использовали стандартные непараметрические методы [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования жизнеспособности (подвижности) *V. miyamotoi* при инкубации в различных условиях представлены в табл., на основании которой возможны многочисленные сравнения проявлений эффекта иммобилизации. Для краткости величины уровня значимости всех подобных сравнений не приводятся. При рассмотрении таблицы читатель может воспользоваться правилом двух сигм: если диапазоны $M_1 - 2 \cdot SD_1$ и $M_2 + 2 \cdot SD_2$ не пересекаются, то величины M_1 и M_2 заведомо различны ($p < 0.05$), где M — среднее арифметическое, а SD — выборочное стандартное отклонение. Строки 1 — 3 демонстрируют базовые, без добавления нейтрофилов, эффекты сыворотки: боррелии полностью сохраняют подвижность при инкубации в среде, содержащей 50% неиммунной СЗД (строка 1); их жизнеспособность статистически значимо уменьшается после часа или 3 часов инкубации в высокоиммунной С-ИКБ-БМ, содержащей IgM к каждому из VMPs (строка 2);

Подвижность и иммобилизация *B. 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 здорового донора)	Компонент 2 (сыворотка переболевших ИКБ-БМ)	Компонент 4 (нейтрофилы)	Компонент 5 (хемо-аттрактант)	В начале инкубации	Через 1 час инкубации	Через 3 часа инкубации
1*	СЗД50	нет	нет	нет	93.9±2.9	94.3±2.0	92.5±3.3
2	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код МІХ6	нет	нет	92.0±1.3	82.2±3.6	80.0±1.5
3	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код МІХ6	нет	нет	92.9±2.7	91.3±1.5	89.6±1.6
4	СЗД50	нет	НФ, 5*10 ⁶ /мл	нет	93.1±1.3	89.9±2.2	91.1±1.8
5	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код МІХ6	НФ, 5*10 ⁶ /мл	нет	92.1±1.7	69.7±7.6	68.4±6.5
6	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код МІХ6	НФ, 5*10 ⁶ /мл	нет	94.6±0.9	88.9±3.3	88.1±3.8
7	СЗД50	нет	НФ, 5*10 ⁶ /мл	fMLP, 1 мкМ/л	92.0±2.2	79.6±4.8	87.9±3.6
8	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код МІХ6	НФ, 5*10 ⁶ /мл	fMLP, 1 мкМ/л	89.7±3.1	60.5±3.5	65.2±2.2
9	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код МІХ6	НФ, 5*10 ⁶ /мл	fMLP, 1 мкМ/л	92.7±2.8	92.2±3.3	94.6±3.9

Примечание. * Во всех экспериментальных средах инкубации (строки 1—9) присутствует 3 компонента: боррелии штамма НТ31 в среде МКР-FS, 5*10⁶ на мл. СЗД50 — сыворотка крови здорового донора, 50%; СЗД25 — СЗД, 25%. С-ИКБ-БМ, код МІХ6 — смесь взятых на стадии реконвалесценции сывороток крови 6 переболевших ИКБ-БМ, 25%. ИН-С-ИКБ-БМ — инактивированная нагреванием С-ИКБ-БМ, 25%. НФ — нейтрофилы. Указаны финальные концентрации сыворотки, боррелий, нейтрофилов и fMLP после их смешивания в составе экспериментальной среды инкубации.

инактивация СК нагреванием практически отменяет бактерицидное действие С-ИКБ-БМ (строка 3).

Добавление нейтрофилов к СЗД лишь незначительно, на 1 — 4%, снижает долю свободно плавающих боррелий (строка 4), при активации нейтрофилов хемоаттрактантом fMLP через час инкубации доля подвижных боррелий падает с 90 — 95% до 80% (строка 7). Визуально активация нейтрофилов в суспензии подтверждалась известным эффектом: большинство из них переходили из приблизительно сферической формы в поляризованную, ближе к овалу с отношением осей 1 к 2. При инкубации в С-ИКБ-БМ с нейтрофилами доля свободных подвижных боррелий дополнительно снижается приблизительно на 10% (строка 5), но это изменение не достигает уровня статистической значимости. При добавлении fMLP только 60 — 65% свободных боррелий остаются подвижными (строка 8), степень иммобилизации значимо отлична от иммобилизации только за счет бактерицидного действия С-ИКБ-БМ (строка 2), $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни. При инактивации нагреванием С-ИКБ-БМ не отмечается не только бактерицидного действия собственно ИН-С-ИКБ-БМ, но и иммобилизирующего эффекта добавления нейтрофилов, не активированных или активированных (между данными в строках 1, 3, 6 и 9 нет значимых различий).

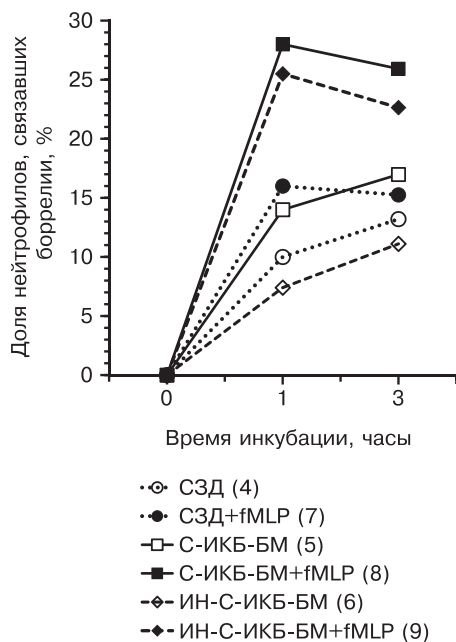
Уже через 10 — 30 мин совместной инкубации часть нейтрофилов оказывается связанными с *B. miyamotoi*. Первичный контакт является точечным, через один из концов спиралевидной боррелии. Это заставляет предположить, что плавающие спирохеты сами «натываются» на нейтрофил, а не «вылавливаются» филоподиями фагоцита, проплывая мимо. Такие столкновения действительно наблюдались при микроскопии. Первичный контакт не является абсолютно прочным: приблизительно в 10 — 20% случаев через несколько

минут контакта, в течение которых боррелии продолжают двигаться, им удается вырваться и уплыть. В ином варианте нейтрофил захватывает и противоположный конец спирали, после чего боррелия сгибается петлей, полностью иммобилизуется и, вероятно, впоследствии фагоцитируется (время наблюдения каждого стекла было ограничено 5 минутами, за это время завершенного фагоцитоза наблюдать не удалось). В использованных экспериментальных условиях (свободно плавающие боррелии и нейтрофилы в невысоких, но физиологических концентрациях, имитирующих ситуацию внутри кровеносных сосудов) большинству нейтрофилов удается связать только одну боррелию. Однако при наблюдении одной-двух сотен нейтрофилов среди них обнаруживались несколько клеток, являющихся центром клубка десятков адгезированных боррелий. Видимых причин для такого различия моделей связывания не выявлено. Отсутствовало и явление розеткообразования, определяемое как агрегация нескольких нейтрофилов вокруг одной или нескольких боррелий. Практически не наблюдалась адгезия нейтрофилов друг к другу.

Зависимость доли нейтрофилов, связавшихся с боррелиями, от условий инкубации, отражена на рис. В СЗД она невысока (10 — 13%); в С-ИКБ-БМ приблизительно на 4% выше; в ИН-С-ИКБ-БМ незначительно ниже, чем в СЗД, и значительно ниже, чем в С-ИКБ-БМ. При добавлении fMLP доля нейтрофилов, связавшихся с боррелиями, значительно возрастает ($p < 0.05$, критерий Манна-Уитни), достигая 25 — 27% в С-ИКБ-БМ и, что было несколько неожиданно, в ИН-С-ИКБ-БМ. Через 24 часа совместной инкубации доля нейтрофилов, связавшихся с боррелиями, в среднем на 10% ниже, чем через 3 часа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно приведенным наблюдениям нейтрофилы способны частично ограничивать жизнеспособность *B. miyatotoi*. Один из механизмов, отраженный в табл., подразумевает дистанционное действие бактерицидных субстанций — активных форм кислорода и/или содержимого секреторных гранул [12, 20]. В наиболее благоприятных условиях (строка 9) это действие оказалось по мощности сопоставимо с бактерицидным действием собственно сыворотки/плазмы крови и привело к дополнительной иммобилизации приблизительно 20% боррелий. Другой механизм основан на непосредственном изъятии боррелий из кровотока (при генерализованной инфекции ИКБ-БМ) путем фагоцитоза. Исходя из данных, представленных на рис., он может обеспечивать сокращение популяции боррелий на 20 — 30%. Однако те же результаты ука-



Связывание *B. miyatotoi* нейтрофилами при инкубации в различных условиях.

СЗД50 — сыворотка крови здорового донора; С-ИКБ-БМ — смесь взятых на стадии реконвалесценции сывороток крови 6 переболевших ИКБ-БМ; ИН-С-ИКБ-БМ — инактивированная нагреванием С-ИКБ-БМ; fMLP — пептидный хемоаттрактант. Номер в скобках соответствует номеру строки в табл., в которой дано более подробное описание соответствующих условий инкубации.

зывают, что нейтрофилы не являются ключевым элементом в защите от инфекции *V. miyamotoi*. Максимальный бактерицидный и опсонофагоцитарный эффект в отношении *V. miyamotoi* требует наличия интактной системы комплемента и специфических антител. Это не удивительно и характерно для иных боррелиозов [20, 22] и многих других генерализованных инфекций, например, менингококковой инфекции [16, 17], поскольку успешный опсонофагоцитоз предполагает синергичное действие рецепторов C3 компонента комплемента и Fc-рецепторов на поверхности нейтрофила и соответствующих мишеней на поверхности бактерии. Также и активация «дыхательного взрыва» и дегрануляции нейтрофилов невозможна без стимулирующего контакта с мишенью или внешнего активатора, подобного fMLP, интерлейкину-8 или анафилатоксину C5a. Важно для понимания механизма взаимодействия, но не критично в патофизиологическом смысле требование интактности СК, поскольку врожденные или приобретенные дефициты СК встречаются весьма редко [3]. Но требование наличия специфических антител отменяет значение нейтрофилов именно как эффекторов врожденного иммунитета против инфекции *V. miyamotoi*, то есть первой и наиболее быстро включающейся, даже по сравнению с макрофагами, линии защиты [20]. Возможно, с недостаточной эффективностью врожденного иммунитета связана относительно высокая, по сравнению с БЛ, контагиозность данной инфекции [19].

Наконец, обращает на себя внимание, что ни в работе [7], ни в данном исследовании не наблюдалось 100% уничтожение боррелий. Поскольку даже без антибиотикотерапии ИКБ-БМ рано или поздно заканчивается выздоровлением, то есть полной элиминацией боррелий, можно высказать несколько предположений, намечающих направление дальнейших исследований. Возможно, более плотное взаимодействие нейтрофилов с *V. miyamotoi* происходит не в свободном плавании, как в нашей модели, а в наиболее узких местах, таких как микрокапилляры, где может достигаться более высокая концентрация бактерицидных веществ. Поскольку и активированные нейтрофилы, и продукты их активации способны кроме бактерий поражать и сосудистый эндотелий, клиническим коррелятом событий в капиллярах может являться наблюдаемые при ИКБ-БМ микроциркуляторные нарушения [5]. Дополнительные затруднения в движении крови по капиллярам могут вызывать и выявляющиеся *in vitro* агрегаты нейтрофилов и десятков боррелий. Также *in vivo* боррелии могут преимущественно элиминироваться не нейтрофилами, а резидентными фагоцитами печени и селезенки. В опытах на крысах было показано, что Купфферовские клетки успешно связывают и убивают как различные штаммы группы *V. burgdorferi sensu lato*, так и боррелий-возбудителей КВЛ — *V. hermsii*, *V. parkeri* и *V. turicatae* [18]. Клиническим коррелятом взаимодействия клеток печени с *V. miyamotoi* могут быть проявления гепатита (повышение концентрации печеночных трансаминаз), наблюдающиеся приблизительно у половины больных ИКБ-БМ [8, 15]. В этой связи исследование патогенеза инфекции *V. miyamotoi* должно быть продолжено не только на клеточных моделях, но и в опытах на лабораторных животных.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М., РАМН, 2000.
3. Платонов А.Е., Вершинина И.В. Менингококковая инфекция у лиц с дефицитами терминальных компонентов комплемента. Эпидемиология и инфекционные болезни. 1999, 5: 38-43.
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., 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.
6. 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.
7. 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 *Borrelia miyamotoi*, возбудителя иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ-БМ). Журн. микробиол. 2018, 1: 58—67.
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. 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.
10. Carrasco S.E., Troxell B., Yang Y. et al. Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages. Infect. Immun. 2015, 83(12): 4848-4860.
11. 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.
12. Hartiala P., Nytonen J., Suhonen J. et al. *Borrelia burgdorferi* inhibits human neutrophil functions. Microbes Infect. 2008, 10 (1): 60-68.
13. 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.
14. Oosting M., Buffen K., van der Meer J.W. et al. Innate immunity networks during infection with *Borrelia burgdorferi*. Crit. Rev. Microbiol. 2016, 42 (2): 233-244.
15. 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.
16. Platonov A.E., Shipulin G.A., Verшинina I.V. et al. Association of human FcγRIIa (CD32) polymorphism with susceptibility and severity of meningococcal disease. Clin. Infect. Diseases. 1998, 27: 746-750.
17. Platonov A.E., Verшинina I.V., Kayhty H. et al. Antibody-dependent killing of meningococci by human neutrophils in serum of late complement component deficient patients. Int. Archive Immunology Allergy. 2003, 130: 314-321.

18. Sambri V., Aldini R., Massaria F. et al. Uptake and killing of Lyme disease and relapsing fever borreliae in the perfused rat liver and by isolated Kupffer cells. *Infect. Immun.* 1996, 64 (5): 1858-1861.
19. Sarkisyan D.S., Platonov A.E., Karan L.S. et al. Probability of spirochete *Borrelia miyamotoi* transmission from ticks to humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2015, 21 (12): 2273-2274.
20. Suhonen J., Hartiala K., Tuominen-Gustafsson H., Viljanen M.K. *Borrelia burgdorferi*-induced oxidative burst, calcium mobilization, and phagocytosis of human neutrophils are complement dependent. *J. Infect. Dis.* 2000, 181 (1): 195-202.
21. 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.
22. Woodman M.E., Cooley A.E., Avdiushko R. et al. Roles for phagocytic cells and complement in controlling relapsing fever infection. *J. Leukoc. Biol.* 2009, 86 (3): 727-736.

Поступила 31.08.17

Контактная информация: Платонов Александр Евгеньевич, д.б.н., проф.,
111123, Москва, ул. Новогириевская, 3а, р.т. (495) 974-96-46

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.А.Прокопьева^{1,2}, *К.А.Шаршов*¹, *А.А.Романовская*³,
*И.А.Соболев*¹, *О.Г.Курская*¹, *Е.И.Соловьева*^{1,2}, *Л.В.Шестопалова*²,
*А.В.Зайковская*⁴, *А.Ю.Алексеев*¹, *А.М.Шестопалов*¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПАТОГЕННОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н5N1) И А(Н1N1)pdm09 У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

¹НИИ экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск; ²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет; ³Университет Хельсинки, Финляндия; ⁴ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирск

Цель. Проведено экспериментальное инфицирование лабораторных мышей линии BALB/c высокопатогенным вирусом гриппа птиц А(Н5N1) и пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09, адаптированного к мышам, с целью сравнения степени патогенности вновь возникших штаммов вируса гриппа с пандемическим потенциалом. *Материалы и методы.* Первую группу мышей линии BALB/c (n=24) инфицировали высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N1) в дозе 5 ЛД₅₀, а вторую группу (n=24) инфицировали адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в дозе 5 ЛД₅₀. Определение ЛД₅₀ и ТСID₅₀ выполняли с помощью вирусологических методов. Морфологические изменения во внутренних органах (легкое, головной мозг, печень, почка, селезенка) исследовали методами световой и трансмиссионной электронной микроскопии. *Результаты.* Вирусологический анализ показал, что оба штамма являются высоколетальными для мышей. Микроскопическое исследование выявило развитие интерстициальной пневмонии в легких и генерализацию инфекции по внутренним органам. *Заключение.* Обнаружено развитие высоко летального заболевания в виде респираторной пневмонии у обеих групп экспериментально инфицированных мышей линии BALB/c как под воздействием высокопатогенного вируса гриппа птиц А(Н5N1), так и адаптированного пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09. При этом отмечается различный механизм развития патологического процесса: под воздействием адаптированного варианта вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 сперва развивается бронхит, который быстро усугубляется развитием альвеолита, в то время как под воздействием высокопатогенного вируса гриппа птиц А(Н5N1) сразу же развивается альвеолит. На 6 сутки после инфицирования регистрируется развитие генерализованной инфекции у мышей обеих экспериментальных групп.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 38—44

Ключевые слова: адаптированный вирус гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н5N1), генерализованная инфекция

E.A.Prokopeva^{1,2}, *K.A.Sharshov*¹, *A.A.Romanovskaya*³,
*I.A.Sobolev*¹, *O.G.Kurskaya*¹, *E.I.Soloveva*^{1,2}, *L.V.Shestopalova*²,
*A.V.Zaykovskaya*⁴, *A.Yu.Alekseev*¹, *A.M.Shestopalov*¹

COMPARATIVE ANALYSIS OF PATHOGENICITY OF INFLUENZA A(H5N1) AND A(H1N1)pdm09 VIRUSES IN MICE

¹Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk; ²National Research State University, Novosibirsk; ³ University of Helsinki, Finland; ⁴State Scientific Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk, Russia

Aim. Compare the degree of pathogenicity of newly emerging influenza virus strains with pandemic potential by experimental infection of BALB/c mice with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus and mouse adapted pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus. *Materials and methods.* The first group of BALB/c mice (n=24) were infected with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus in a dose of 5 LD₅₀, and the second group (n=24) were infected with mouse adapted pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus at a dose of 5 LD₅₀. Determination of LD₅₀ and TCID₅₀ were performed by virological methods. Morphological changes in internal organs (lung, brain, liver, kidney, spleen) were examined by light and transmission electron microscopy. *Results.* Virologic analysis showed that both strains are highly lethal for mice. Microscopic examination revealed the development of interstitial pneumonia in the lungs and generalization of infection in the internal organs. *Conclusion.* In both groups of BALB/c mice experimentally infected with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) and mouse adapted pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus were revealed the development of a highly lethal disease in the form of respiratory pneumonia. It is noted, different mechanisms of pathological process: in case of infection with mouse adapted pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus firstly developed bronchitis, which quickly exacerbated by the development of alveolitis, while in case of infection with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) immediately developed alveolitis. On the 6th day after infection recorded the development of generalized infection in mice of both experimental groups.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 38—44

Key words: mouse-adapted influenza virus A(H1N1)pdm09, A(H5N1), generalized infection

ВВЕДЕНИЕ

Вновь возникшие вирусы гриппа — высокопатогенный А(Н5N1) и пандемический А(Н1N1)pdm09 — относительно недавно продемонстрировали значительную угрозу здоровью населения во многих странах мира. Благодаря появлению вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в 2009 году мир стал свидетелем пандемической инфекции XXI века, которая быстро распространилась по всему Земному шару и поразила сотни тысяч людей [10]. Вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 обладал высокой степенью трансмиссии, но относительно низкими вирулентными и летальными свойствами по сравнению с вирусом гриппа А(Н5N1). Уровень смертности от высокопатогенного вируса гриппа А(Н5N1) составляет более 60%. Он способен вызывать тяжелые повреждения респираторной системы человека, однако не способен эффективно передаваться от человека к человеку [Kortevag S., Gu J., 2010]. В настоящее время существует опасение, что если высокопатогенный вирус гриппа птиц А(Н5N1) приобретет способность эффективно передаваться от человека к человеку подобно пандемическому вирусу гриппа А(Н1N1)pdm09 и при этом сохранит свои высоковирулентные свойства, то, возможно, новый реассортант будет оказывать весьма значительный эффект на здоровье населения планеты. Между данными субтипами вируса гриппа А при тяжелых случаях заболевания реги-

стрируют сходные симптомы в клинической картине [Korteveg S., Gu J., 2010]. Известно также, что при тяжелой гипертоксической форме гриппа, вызванной субтипом А(Н5N1), наблюдается высокая виремия, обусловленная распространением вирионов по кровеносному руслу с последующим инфицированием различных органов (головной мозг, селезенка, тимус, кишечник, миокард, печень, почки, надпочечники и др.) [3]. По литературным данным, виремия вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в такие органы, как головной мозг, селезенка, а также в кровь возможна только под воздействием адаптированных вариантов патогена [9].

Возникновение новых штаммов вируса гриппа А будет по-прежнему создавать проблемы для общественного здравоохранения. Детальное понимание механизмов, определяющих патогенность и межвидовую трансмиссию, имеет важное значение как для прогноза появления новых вирусов, так и для создания эффективных средств и способов профилактики и лечебных мероприятий, что необходимо для контроля над высокопатогенными и пандемичными инфекциями.

Цель работы — сравнительное исследование степени патогенности вируса гриппа птиц А(Н5N1) (А/goose/Krasnozerskoye/627/05) и пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 (штамм А/Russia/01/2009-МА, адаптированный к мышам) по характеру патологических изменений во внутренних органах и летальности в острый период при экспериментальном инфицировании мышей линии BALB/с.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на мышах линий BALB/с 6 — 7-недельного возраста массой тела 20 — 25 г. Животные были разделены на 3 группы. Первую группу животных (n=24) инфицировали вирусом гриппа А(Н5N1) штаммом А/goose/Krasnozerskoye /627/05 (GenBank EF205206.1, EF205199.1, EF205192.1, EF205157.1, EF205178.1, EF205171.1, EF205164.1, и EF205185.1) в дозе 5 ЛД₅₀ в объеме 50 мкл инфицирующей жидкости. Вторую группу животных (n=24) инфицировали вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 штаммом А/Russia/01/2009-МА, адаптированным к мышам (GenBank HQ661364 — HQ661371) [2]) в дозе 5 ЛД₅₀ в объеме 50 мкл инфицирующей жидкости. Третья группа служила контролем и была представлена 3 интактными мышами, которые интраназально получали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (рН 7.2) в объеме 50 мкл. Животных содержали в стандартных условиях. Ежедневно определяли вес животных.

На 1, 3, 6 и 10 сутки после заражения животных выводили из эксперимента путём дислокации шейных позвонков. Быстро извлеченные внутренние органы (лёгкое, головной мозг, печень, почка, селезенка) фиксировали в 4 % растворе формалина, затем обезвоживали по стандартной методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4 — 5 мкм получали с помощью ротационного микротомы НМ 340Е (Carl Zeiss, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и микрофотосъемку проводили на микроскопе Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия).

Для проведения исследования с помощью трансмиссионной электронной микроскопии были взяты образцы лёгких на 1, 3 сутки после заражения животных, которые фиксировались в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 4 ч при температуре 4°С, дофиксировали в 1% растворе четырёхоксида осмия, обезвоживали в спирте возрастающей концентрации (50°, 70°, 96°, абсолютный), смеси спирта и ацетона и заверша-

ли проводку в ацетоне. Образцы лёгких заливали в смесь аральдита-эпона (1:6) с добавлением катализатора DMP-30 и полимеризовали их при 60°С. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме UC-6 (Leica, Германия), контрастировали насыщенным раствором уранилацетата и раствором Рейнгольда. Образцы исследовали под электронным микроскопом Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВт.

Определение наличия вируса гриппа А субтипа А(Н5N1) и субтипа А(Н1N1) pdm09 в лёгких проводили путём инфицирования культуры клеток MDCK. Значение 50% тканевой цитопатической инфекционной дозы (TCID₅₀) рассчитывали по методу Рида-Менча и выражали как среднее $\lg\text{TCID}_{50} \pm \text{SE}$ [9].

Все работы с животными проводили в соответствии с протоколом исследования, утверждённым биоэтическим комитетом «Вектор» в условиях вивария ГНЦ ВБ «Вектор» с уровнем биологической безопасности BSL2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинические признаки заболевания гриппом у мышей линий BALB/c, инфицированных высокопатогенным вирусом гриппа птиц штаммом A/goose/Krasnozerskoye/627/05, а также у мышей, инфицированных адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа штаммом A/Russia/01/2009-MA, были отмечены уже в 1 сутки и проявлялись конъюнктивитами, снижением физической активности, снижением массы тела, ухудшением качества шерсти, одышкой, а на 10 сутки в обеих экспериментальных группах летальность составляла 50%. Результаты вирусологического анализа показали, что у мышей первой экспериментальной группы наибольший титр вируса в лёгком отмечали с 3 по 10 сутки, а во второй группе — с 1 по 6 сутки после инфицирования (рис. 1).

Морфологическое исследование лёгких мышей выявило в 1 сутки полнокровие капилляров в обеих группах, однако увеличение секреции муцин-продуцирующих клеток бронхиального эпителия отмечали только под воздействием штамма A/Russia/01/2009-MA. С 3 по 6 сутки в обеих группах отмечали десквамацию эпителия средних и мелких бронхов, активную трансэпителиальную миграцию лимфоцитов, активированных макрофагов, а также гранулоцитоз, гемолиз эритроцитов в мелких кровеносных сосудах, встречались явления микротромбоза и обнаруживались признаки ДВС-синдрома (резкое полнокровие, сосудистый отёк, кровоизлияния в альвеолы, образование фибриновых масс и геморрагии). В первой группе животных отмечали эхиноцитоз эритроцитов, а во второй — сладж эритроцитов. К концу первой недели наблюдений в обеих группах отмечали развитие интерстициальной пневмонии, которая к 10 суткам приобретала характер многоочаговости.

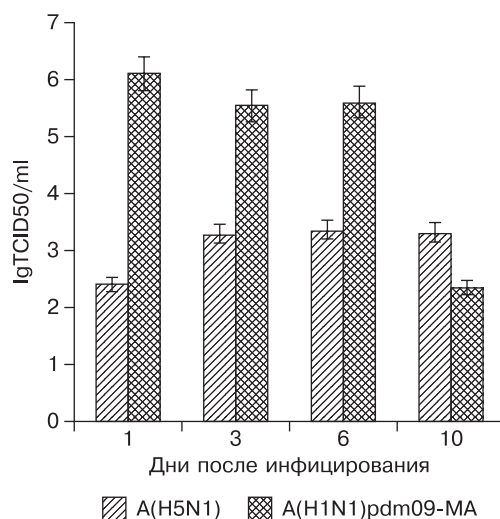


Рис. 1. Величина титров вируса в лёгких мышей, инфицированных высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N1) и адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа А(Н1N1) pdm09.

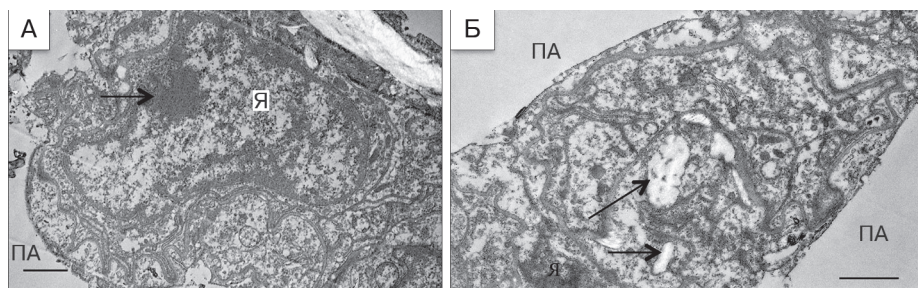


Рис. 2. Изменения ультраструктур клеток лёгких мышей линии BALB/с, инфицированных вирусом гриппа А(Н5N1).

Примечание: А — на 1 сутки видны глыбки гетерохроматина на периферии ядра (стрелка) (ПА — полость альвеолы; Я — ядро); Б — на 3 сутки отмечается вакуолизация клетки альвеолярного эпителия (стрелка). Бар соответствует 1 мкм.

Трансмиссионная электронная микроскопия позволила визуализировать отшнуровку вирусных частиц с поверхности альвеолоцитов 1 типа с первых суток после инфицирования (рис. 2А, 3А). На третьи сутки в лёгких мышей обеих групп деструктивный процесс усугублялся: наблюдалось хлопьевидное содержимое в альвеолярных мешках (рис. 2Б, 3Б).

Светооптическое исследование внутренних органов мышей обеих групп выявило следующие патологические изменения: в головном мозге — нейрональную дегенерацию, очаговые некрозы, кровоизлияния и отеки кровеносных сосудов; в печени — гиперемию центральных и воротных вен; в почках — умеренную гиперемию; в селезёнке — гиперемию и экссудацию белков плазмы крови.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что высокопатогенный вирус гриппа птиц А(Н5N1) способен вызывать тяжёлую гриппозную инфекцию у экспериментальных мышей линии BALB/с без предварительной адаптации, в то время как пандемическому вирусу гриппа А(Н1N1)рdm09 для увеличения патогенных свойств требуется

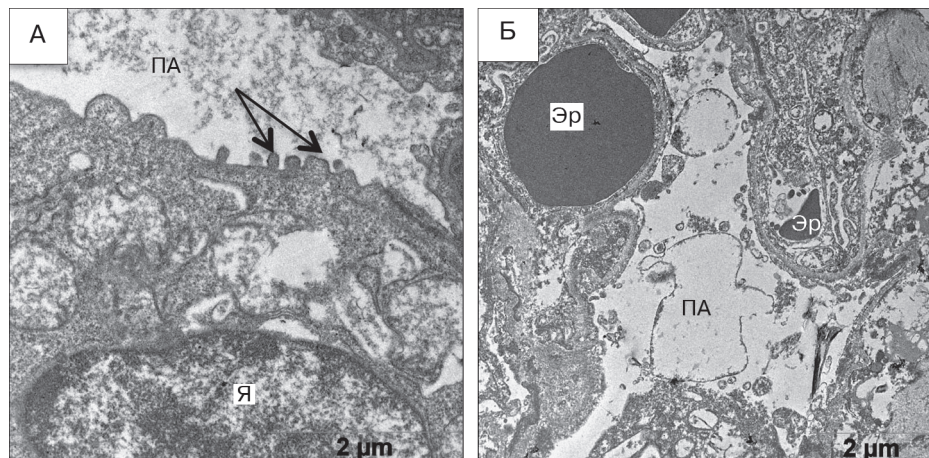


Рис. 3. Изменения ультраструктур клеток лёгких мышей линии BALB/с, инфицированных адаптированным вариантом вируса гриппа А(Н1N1)рdm09.

Примечание: А — на 1 сутки отмечали отпочковывание вирионов с поверхности альвеолоцитов (ПА — полость альвеолы; Я — ядро); Б — на 3 сутки отмечали клеточный детрит в альвеолярной полости, дистрофию альвеолярного эпителия. Бар соответствует 1 мкм.

предварительная адаптация путём пассирования в лёгких экспериментальных животных [2, 11, 12].

Наблюдаемые различия на 1 сутки в лёгких экспериментально инфицированных мышей в виде гиперсекреции муцин-продуцирующих клеток бронхиального эпителия, вероятно, связаны с высоким титром штамма A/Russia/01/2009-MA именно на начальном этапе воспаления, а также с большей тропностью пандемического вируса A(H1N1)pdm09 к бронхиальному эпителию [6, 7]. В период с 3 по 6 сутки было выявлено сходство в развитии патологического процесса на ультраструктурном уровне в лёгких обеих исследуемых групп животных: зарегистрированы деструктивные процессы не только в альвеолоцитах 1 типа, но также и в альвеолоцитах 2 типа. По последним данным, птичий тип рецепторов (SA α 2,3Gal) регистрируют в нижних отделах дыхательных путей респираторной ткани — преимущественно на альвеолоцитах 2 типа [13]. Вероятно, за счёт такого распределения рецепторов высокопатогенный вирус гриппа птиц A(H5N1), который преимущественно распознаёт SA α 2,3Gal рецепторы [8], в первую очередь, инфицирует альвеолоциты 2 типа и макрофаги лёгких, а пандемичный вирус гриппа A(H1N1)pdm09 преимущественно распознаёт человеческий тип (SA α 2,6Gal) рецепторов и чаще вызывает воспаление верхних дыхательных путей [4, 13]. В нашей работе было отмечено, что в случае инфицирования адаптированным вариантом пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 также регистрируются деструктивные процессы в альвеолоцитах 2 типа, что, в свою очередь, говорит о возможном увеличении патогенных свойств у данного субтипа вируса гриппа во время адаптации к мышам за счёт увеличения сродства к SA α 2,3Gal рецепторам.

Явления микротромбозов, зарегистрированных в обеих экспериментальных группах, к 6 суткам, возможно, сопряжены с повреждающим воздействием вирусов гриппа на эндотелий сосудов лёгких, что наиболее часто встречается при инфицировании высокопатогенным вирусом гриппа A(H5N1) [1], а также за счёт изменения реологических свойств крови, проявляющихся в виде сладжа эритроцитов и эхиноцитоза.

При сравнительном анализе структурных изменений во внутренних органах экспериментально инфицированных мышей были обнаружены патологические изменения не только в мозге и в селезенке, как это было описано в литературе ранее [6], но также в печени и почках, что, вероятно, объясняется развитием генерализованной инфекции под воздействием адаптированного варианта пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 подобно высокопатогенному гриппу птиц A(H5N1) [5].

Таким образом, обнаружено, что пандемический вирус гриппа A(H1N1)pdm09 способен вызывать высоко летальное заболевание в виде респираторной пневмонии среди экспериментально инфицированных мышей линии BALB/c аналогично высокопатогенному вирусу гриппа птиц A(H5N1) только после предварительной адаптации к мышам. При этом отмечается различный механизм развития патологического процесса: под воздействием адаптированного варианта вируса гриппа A(H1N1)pdm09 сперва развивается бронхит, который быстро усугубляется развитием альвеолита, в то время как под воздействием высокопатогенного вируса гриппа птиц A(H5N1) сразу же развивается альвеолит. На 6 сутки после инфицирования регистрируется развитие генерализованной инфекции у мышей обеих экспериментальных групп.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ номер проекта 17-44-07001.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковнер А.В., Потапова О.В., Шкурупий В.А. Морфофункциональные изменения эндотелиоцитов сосудов легких при гриппе А/Н5N1 А/goose/Krasnoozerskoe/627/05 у мышей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 154 (10): 472-475.
2. Романовская А.А., Шаршов К.А., Зайковская А.В. Дурьманов А.Г., Шестопалов А.М. Штамм вируса гриппа А/Russia/01/2009-МА субтипа Н1N1 для исследования лечебной и профилактической активности противовирусных препаратов *in vitro* и *in vivo*. Патент на изобретение. RUS 2451072 18.10.2010.
3. Belsler J.A., Szretter K.J., Katz J.M., Tumpey T.M. Use of animal models to understand the pandemic potential of highly pathogenic avian influenza viruses. *Advances in virus research*. 2009, 73: 55-97. doi: 10.1016/S0065-3527(09)73002-7.
4. Connor R.G., Kawaoka Y., Webster R.G., Paulson J.C.I. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*. 1994, 205(1): 17-23.
5. Garigliany M.M., Habyarimana A., Lambrecht B. et al. Influenza A strain-dependent pathogenesis in fatal H1N1 and H5N1 subtype infections of mice. *Emerging Infectious diseases*. 2010, 16(4): 595-603. doi: 10.3201/eid1604.091061.
6. Ilyushina N.A., Khalenkov A.M., Seiler J.P. et al. Adaptation of pandemic H1N1 influenza viruses in mice. *J. Virology*. 2010, 84 (17): 8607-8616. doi: 10.1128/JVI.00159-10.
7. Ito T., Couceiro J.N., Kelm S. et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol*. 1998, 72 (9): 7367-7373.
8. Kuiken T., Taubenberger J. Pathology of human influenza revisited. *Vaccine*. 2008, 26: D59-D66.
9. Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. World Health Organization. 2002.
10. Pandemic (H1N1) 2009—update 102. World Health Organization. http://www.who.int/csr/don/2010_05_28/en/index.html (Дата обращения 25.08.2014).
11. Prokopyeva E.A., Romanovskaya A.A., Sharshov K.A. et al. Pathogenicity assessment of A(H1N1)pdm09 and A(H5N1) viruses. *Histology and Histopathology*. 2017, 32: 1057-1063. doi: 10.14670/HH-11-866.
12. Prokopyeva E.A., Sobolev I.A., Prokopyev M.V., Shestopalov A.M. Adaptation of influenza A(H1N1)pdm09 virus in experimental mouse models. *Infection Genetic Evolution*. 2016, 29. pii: S1567-1348(16)30022-3. doi: 10.1016/j.meegid.2016.01.022.
13. Shinya K., Ebina M., Yamada S. et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 2006, 440 (7083): 435-436.

Поступила 05.11.17

Контактная информация: Прокопьева Елена Александровна,
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2, р.т. (383)333-64-56

АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ CLOSTRIDIUM DIFFICILE-АССОЦИИРОВАННОЙ ДИАРЕИ

Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих, Москва

Цель. Разработка оптимального алгоритма лабораторной диагностики Clostridium difficile-ассоциированной диареи для достижения максимально достоверных результатов. *Материалы и методы.* В исследование были включены 211 пациентов с клинической картиной C.difficile-ассоциированной диареи. Материалом для исследования служили просветные фекалии. Все образцы исследовались одновременно иммунологическими (определение глутаматдегидрогеназы — ГДГ, токсинов А и В C. difficile иммуноферментным и иммунохроматографическим анализом), бактериологическим и молекулярно-биологическими (полимеразная цепная реакция с использованием системы «GENEexpert rtPCR system», Cepheid, США) методами. *Результаты.* Из 211 образцов просветных фекалий были изолированы 126 штаммов C. difficile. В образцах просветных фекалий, из которых был выделен возбудитель, ГДГ определялась в 54% (68) случаев методом иммунохроматографического анализа (ИХА), и в 11,1% (14) случаев методом иммуноферментного анализа (ИФА). При возрастании степени обсемененности фекалий C. difficile увеличивалась чувствительность иммунологических тестов выявления ГДГ ($p < 0,05$). Начиная со степени обсемененности 10^7 КОЕ/г наблюдается резкое увеличение чувствительности обнаружения ГДГ иммуноферментным методом. Использование для диагностики C. difficile-ассоциированной инфекции только иммунологических тестов определения токсинов А и В приведет к ложноотрицательным результатам в 19,8% и 55,6% случаев при присутствии токсина А и в 35,7% и 44,4% случаев при наличии токсина В. *Заключение.* Трехступенчатый алгоритм лабораторной диагностики антибиотикоассоциированной диареи характеризуется высокой воспроизводимостью результатов исследований, чувствительностью и специфичностью. Основан на поэтапном выполнении тестов для детекции токсигенной C. difficile. Использование такого алгоритма диагностики обеспечит своевременную постановку диагноза, локальный микробиологический мониторинг и эпидемиологический надзор за C.difficile-ассоциированной инфекцией.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 45—53

Ключевые слова: C. difficile-ассоциированная инфекция, глутаматдегидрогеназа, токсин А, токсин В, бинарный токсин, антибиотикоассоциированная диарея, чувствительность, специфичность

М.А.Sukhina, I.V.Obraztsov, V.I.Mikhalevskaya, S.I.Achkasov, A.L.Safin, Yu.A.Shelygin

ALGORITHM FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE ASSOCIATED DIARRHEA

Ryzhikh State Scientific Centre of Coloproctology, Moscow, Russia

Aim. To develop an optimal algorithm for laboratory diagnosis of C. difficile associated diarrhea in context of obtaining the most reliable analysis results. *Materials and methods.* 211 patients with clinically significant C. difficile associated diarrhea participated in the study. Luminal faeces were analysed by immunological (immune chromatographic assay, ICA; ELISA) bacteriological and molecular (GENEexpert rtPCR system, Cepheid, USA) methods. *Results.* We isolated 126 C. difficile strains from 211 samples of luminal faeces. We identified glutamate dehydrogenase (GDH) in 54% of cases ($n=68$) by means of immune ICA, and in 11.1% of cases ($n=14$) by means of ELISA. The increase of bacterial concentration is associated with the growth of sensitivity of GDH detection by immunological tests ($p < 0.05$). We defined a dramatic increase of GDH detection sensitivity starting from 10^7 CFU/g concentration. Toxins A and B evaluation by immunological tests only leads to false-negative results in 19,8% (ICA) and 55,6% (ELISA) of toxin A positive

cases and in 35,7% (ICA) и 44,4% (ELISA) of toxin B positive cases. *Conclusion.* Three-step diagnostic algorithm for antibiotic-associated diarrhea is characterized by high replicability, sensitivity and specificity. It is based on step-by-step performance of the tests for detection of toxin-producing *C. difficile*. Application of such approach ensures timely diagnosis, local microbiological monitoring and epidemiological control of *C. difficile* associated infection.

Zh.Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.2, P. 45—53

Key words: *C. difficile* associated infection, glutamate dehydrogenase, toxin A, toxin B, binary toxin, antibiotic-associated diarrhea, sensitivity, specificity

ВВЕДЕНИЕ

Иррациональное и бесконтрольное применение антибактериальных препаратов провоцирует возникновение антибиотикассоциированных диарей. Это осложнение часто возникает в послеоперационном периоде у пациентов, перенесших обширные хирургические вмешательства [9]. Основным этиологическим агентом считается *Clostridium difficile* [5]. С 2003 года в странах Северной Америки и Европы тяжесть заболевания связывают с появлением нового высоковирулентного штамма — ПЦР риботипа NAP1/027, характеризующегося усиленной продукцией всех известных токсинов *C. difficile* [5].

Широкое распространение возбудителя *Clostridium difficile*-ассоциированной инфекции, частота рецидивов, высокая смертность и большие экономические затраты на лечение определили поиск и разработку оптимальных и максимально эффективных методов и алгоритмов лабораторной диагностики данного заболевания [2]. Современные подходы к детекции токсигенных штаммов *Clostridium difficile* должны быть направлены на получение аналитически надежных и клинически высокоинформативных данных, необходимых для постановки диагноза и назначения адекватной терапии.

В процессе клинического лабораторного исследования, как правило, решается несколько аналитических задач: разделение биологической смеси веществ/клеток и выделение из нее нужного компонента; детекция (идентификация) искомого компонента, в случае необходимости количественная оценка содержания определенного компонента; интерпретация результатов исследования.

Решение данных задач характеризуется надежностью лабораторных исследований. Качество лабораторных исследований отражает аналитическая надежность, которая характеризует степень достоверности лабораторных данных об изучаемом биоматериале. Достоверность полученных данных лабораторного исследования дает возможность использовать их при принятии клинических решений: для установления диагноза, назначения необходимых лечебных мер, оценки тяжести болезни и эффективности проводимого лечения.

Иммунологические методы детекции глутаматдегидрогеназы и токсинов А и В *C. difficile* относятся к визуальным неколичественным методам [1]. Их оценка происходит по частоте выявления фермента ГДГ и токсинов А и В *C. difficile* в биоматериале. Традиционно для оценки правильности лабораторной диагностики *C. difficile*-ассоциированной инфекции осуществляется относительно общепринятого «золотого стандарта» бактериологического метода и основана на градациях отрицательных и положительных результатов. Ключевым понятием в биомедицине является понятие достоверности, которое

определяет комплекс критериев оценки результатов диагностических и скрининговых тестов. К числу основных компонентов понятия достоверности относятся чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов. Каждый из данных критериев представляет собой определенный статистический показатель. Все методики, используемые в нашем исследовании, были оценены с позиции понятия достоверности.

Понятие чувствительность того или иного метода характеризует способность выявить возбудитель при минимальных его концентрациях. При этом чувствительность иммунологического теста всегда привязана к конкретной тест-системе, а не только к принципу самого метода. Чувствительность зависит от многих факторов: аффинности и avidности взаимодействия используемых (или искомым) антител с искомым (или используемым) антигеном, от других реагентов, включенных в систему, от условий проведения реакции.

Еще один термин, который характеризует достоверность исследований — это аналитическая специфичность метода. Это понятие определяется как способность метода обнаруживать или определять только искомый компонент в биоматериале и оценивается по степени влияния различных веществ биоматериала на результат анализа. Специфичность — это параметр, который позволяет не путать с другими заболеваниями искомую инфекцию.

Параметр диагностическая эффективность, используемый при характеристике той или иной тест-системы, показывает возможность конкретной тест-системы одновременно правильно определять позитивные пробы как позитивные, а негативные пробы как негативные. И еще одно понятие, которое характеризует надежность получаемых результатов — это положительная и отрицательная предсказательная значимость тест-систем. Эти характеристики позволяют оценить реальную распространенность данного инфекционного заболевания в обследуемых популяциях населения. Положительная предсказательная значимость рассчитывается как частота встречаемости инфицированных людей среди всех индивидуумов, определенных данной тест-системой как позитивные. Отрицательная предсказательная значимость тест-системы рассчитывается, как частота неинфицированных людей среди всех индивидуумов, определенных данной тест-системой как отрицательные [1].

Традиционно для определения присутствия в фекалиях *C. difficile* проводят детекцию фермента глутаматдегидрогеназы [1, 3]. ГДГ это метаболический фермент, кодируемый геном *Glud*. Он присутствует у всех штаммов *Clostridium difficile* вне зависимости от выработки токсинов, кроме того этот фермент определяется и у других видов рода *Clostridium* (например, *C. sordelli*). Данные разных исследователей показывают высокую чувствительностью и высокую прогностическую ценность определения ГДГ в кале для диагностики *C. difficile*-ассоциированной диареи [8]. Но наличие этого фермента у других представителей рода *Clostridium* снижает специфичность данного метода и обуславливает перекрестное реагирование. Чувствительность выявления ГДГ по данным литературы и производителей тест-систем методом иммунохроматографии составляет 94%, а специфичность 93% [4]. Таким образом, определение фермента ГДГ, как считают многие исследователи, может быть использовано на первом этапе диагностики *C. difficile*-ассоциированной диареи, при этом положительные результаты должны тестироваться на наличие токсинов различными доступными методами [2, 4].

Целью нашей работы было определение оптимального алгоритма лабора-

торной диагностики *C. difficile*-ассоциированной диареи для достижения максимально достоверных результатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 211 пациентов с клинической картиной *C. difficile*-ассоциированной диареи. Материалом для исследования служили просветные фекалии. Все образцы просветных фекалий исследовались одновременно иммунологическими, бактериологическим и молекулярно-биологическими методами.

Просветные фекалии тестировались иммунологическими методами — иммунохроматографический и иммуноферментный анализ на присутствие фермента ГДГ, токсинов А и В *C. difficile*. Независимо от результатов иммунологического исследования биоматериал подвергался бактериологическому исследованию с целью выделения токсигенной культуры *C. difficile*; 49 образцов просветных фекалий были дополнительно тестированы с помощью молекулярно-биологического метода с использованием системы GeneXpert® компании «Цефеид» (США), которая обеспечивает автоматизацию всех этапов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Метод ПЦР является быстрым, наиболее чувствительным и специфичным методом определения токсигенных *C. difficile*. Кроме того, тест-система, которая была использована нами для детекции возбудителя молекулярно-биологическим методом, является закрытой автоматизированной системой ПЦР-анализа, позволяющей определять не только присутствие *C. difficile* продуцирующей токсина А и В, но и определять наличие штаммов, продуцирующих бинарный токсин, а также ПЦР риботипа 027/NAP1/VI. Праймеры и пробы теста Xpert *C. difficile* выявляют последовательности генов токсина В (*tcdB*), комбинированного токсина (*cdt*) и делеции *tcdC*. Новый штамм 027/NAP1/VI с делецией в гене репрессора продукции токсинов А и В (*tcdC*) вырабатывает в 16 раз больше токсина А и в 23 раза больше токсина В, а также продуцирует бинарный токсин. Штамм *C. difficile* 027/NAP1/VI характеризуется повышенной резистентностью к антимикробным препаратам, что дает ему возможность распространяться в лечебных учреждениях. Присутствие такого штамма у пациентов свидетельствует о высоком риске летального исхода. Метод ПЦР позволяет обнаруживать минимальные микробные нагрузки. С его помощью можно обнаружить *C. difficile* с более высокой чувствительностью, чем культуральный метод, хотя именно культуральный метод обычно рассматривают как «золотой стандарт» диагностики.

Присутствие ГДГ определяли с помощью иммунохроматографического экспресс-теста «Экспресс-тест для качественного выявления глутаматдегидрогеназы *Clostridium difficile* в кале» (Vegal Farmaceutica, Испания) и иммуноферментного анализа с использованием ИФА тест-системы «CoproELISA TM *C. difficile* GDH. Глутаматдегидрогеназа *Clostridium difficile*. Иммуноферментный набор для определения глутаматдегидрогеназы *Clostridium difficile* в образцах кала» (Savyon Diagnostics Ltd., Израиль). Токсины А и В определяли с помощью иммунохроматографических экспресс-тестов «Токсины А/В *Clostridium difficile* для определения в кале» (VEDA.LAB, Франция) и иммуноферментных тест-систем «Набор для определения токсинов А+В *Clostridium difficile* иммуноферментным методом в образцах кала и суспензиях культур» (Serazym®, Германия).

Все этапы бактериологического исследования просветных фекалий проводили в условиях анаэробной рабочей станции Bactron (Sheldon Manufacturing

Inc., США), позволяющей работать на протяжении всего исследования, от первичного посева до идентификации и изучения антибиотикорезистентности, в условиях постоянного анаэробнозиса, что исключает гибель облигатно анаэробных бактерий. Материал просветных фекалий засеивался на кровяной агар (Columbia agar с 7% эритроцитов баранов), агар для селективного выделения *S. difficile* («Copan», Италия) и культивировался в анаэробных условиях при 37°C в течение 48 часов. Идентификацию проводили с помощью времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) (Bruker, США). Методика основана на выявлении уникального набора белков бактерии. Экстракцию рибосомальных белков проводили муравьиной кислотой. Для этого 24 часовую культуру клостридий собирали в количестве 1 бактериологической петли (объемом 10 мкл) в пробирку с деионизированной водой, гомогенизировали на приборе Vortex, добавляли этанол, центрифугировали 2 минуты на максимальной скорости (14 000 об/мин.). После этого удаляли супернатант и опять центрифугировали, чтобы удалить остатки этанола. Осадок высушивали при комнатной температуре, добавляли 70% муравьиную кислоту пропорционально количеству осадка, ацетонитрил, центрифугировали 2 минуты на максимальной скорости (14 000 об/мин.). На мишень MALDI наносили супернатант, затем покрывали высушенный экстракт раствором матрицы HCCA. Идентификация считалась достоверной при score $\geq 1,9$. Полученные результаты исследования были статистически обработаны при помощи программы Microsoft Office Excel 7.0. Оценивали диагностическую чувствительность, специфичность, а также точность и предсказательную ценность положительного и отрицательного результата обсуждаемых тестов. Чувствительность рассчитывали как долю истинноположительных результатов среди всех истинноположительных и ложно-отрицательных результатов, специфичность — как долю истинноотрицательных результатов среди всех истинноотрицательных и ложноположительных результатов. Точность диагностических методов оценивали как долю правильных результатов среди всех выполненных тестов. Предсказательную ценность положительного и отрицательного результатов рассчитывали как долю правильных результатов среди всех положительных или отрицательных результатов, соответственно. Достоверность различий между долями оценивали на основании критерия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 211 образцов просветных фекалий было изолировано 126 штаммов *S. difficile*. В образцах просветных фекалий, из которых был выделен возбудитель, фермент ГДГ определялся в 54% (68) случаев методом иммунохроматографического анализа (ИХА) и в 11,1% (14) случаев методом иммуноферментного анализа (ИФА). В образцах фекалий, имеющих положительную копрокультуру, в 46% (58) и 88,9% (109) случаев не обнаруживалась глутаматдегидрогеназа методами ИХА и ИФА соответственно. В образцах просветных фекалий, у которых не была выделена культура *S. difficile*, фермент ГДГ детектировался в 8,2% (7) случаев методом ИХА и в 3,5% (3) случаев методом ИФА.

Результаты детекции токсинов А и В иммунологическими методами имели различия при использовании тест-систем, основанных на методах ИХА и ИФА. Уровень совпадений этих результатов с бактериологическим исследованием колебался от 19,8% до 64,3%. Среди образцов фекалий, из которых была изолирована культура *S. difficile*, токсин А определялся в 19,8% (25) и

55,6% (70) случаев методами ИХА и ИФА соответственно. Токсин В только в 64,3% (81, ИХА) и 55,6% (70, ИФА) случаев совпадал с результатом бактериологического исследования. Образцы просветных фекалий, из которых не была изолирована культура *S. difficile* в скрининговом тесте детекции токсинов иммунологическими методами, обнаруживали наличие токсина А в 1,2% (1, ИХА) и 18,8% (16, ИФА) случаев. Токсин В определялся в 37,6% (32, ИХА) и 18,8% (16, ИФА) образцов. Таким образом, использование для диагностики *S. difficile*-ассоциированной инфекции только иммунологических тестов определения токсинов А и В приведет к ложноотрицательным результатам в 19,8% и 55,6% случаев при присутствии токсина А и в 35,7% и 44,4% случаев при наличии токсина В. Тем не менее, по данным Le Guern R. (2013), в большинстве французских лабораторий для выявления токсинов А и В *S. difficile* используют иммуноферментный анализ. Этот метод обеспечивает быстрый ответ (в течение 4 часов), но обладает низкой чувствительностью (около 50%) при высокой специфичности (95%).

Титр обсемененности *S. difficile* исследуемых образцов фекалий колебался от 10^3 до 10^9 КОЕ/г. При возрастании степени обсемененности фекалий *S. difficile* увеличивалась чувствительность иммунологических тестов выявления ГДГ ($p < 0,05$). Начиная со степени обсемененности 10^7 КОЕ/г наблюдается резкое увеличение чувствительности обнаружения ГДГ иммуноферментным методом (с 5% до 50%) и с 45% до 67% — иммунохроматографическим методом.

Кривая зависимости определения токсинов А и В от степени обсемененности просветных фекалий *S. difficile* методами ИФА и ИХА была идентична. Высокая степень положительных ответов присутствия токсинов при титре 10^3 КОЕ/г, далее происходило снижение позитивных результатов. Начиная с титра обсемененности 10^7 КОЕ/г — резкое увеличение положительных результатов детекции токсинов А и В *S. difficile*.

Среди 49 образцов просветных фекалий, которые были исследованы с помощью метода полимеразной цепной реакции, не наблюдалось ни одного ложноположительного и ложноотрицательного результата по сравнению с результатом бактериологического исследования; 7,7% (1 из 13) проб в тесте ИХА показывали присутствие ГДГ, в то время как при проведении ПЦР и бактериологическом исследовании не была выявлена *S. difficile*.

В этих образцах изолировались другие представители рода *Clostridium*. 9,09% проб имели ложноположительный результаты детекции ГДГ методом ИХА в сравнении с ПЦР и культуральным методом. Определение токсинов А и В методом ИХА показало несовпадение с ПЦР исследованием (60,6% токсин В и 33,3% токсин А).

Еще один показатель надежности диагностических тестов, который был использован при характеристике проводимых исследований — это сходимость результатов, которая характеризует степень согласованности результатов измерений, полученных одним и тем же методом на единичных объектах испытаний в одной и той же лаборатории одним и тем же испытателем. Сходимость результатов определения ГДГ методами ИФА и ИХА составила 94,03% при отсутствии фермента в образце и 13,64% при исследовании образцов просветных фекалий, у которых присутствовал данный фермент. Сходимость положительных результатов детекции токсинов А методом ИХА и ИФА составила 50%, токсинов В — 53,1% случаев. При отрицательном результате сходимость методов ИХА и ИФА составила при определении токсина А 58,38%, токсинов В — 69,39% случаев. Меньше всего несоответствий

среди результатов исследований, выполненных разными методами, наблюдалось при детекции токсина В, чем токсина А. Методом ИФА токсины А и В нельзя было дифференцировать, во всех положительных пробах методом ИФА определялись одновременно токсины А и В.

Таким образом, самый простой тест для выявления присутствия фермента ГДГ, токсинов А и В *C. difficile* в образце просветных фекалий это иммунохроматографический и иммуноферментный анализ. Оба этих метода позволяют получить быстрый ответ, но обладают низкой чувствительностью (ИФА) и специфичностью (ИХА), что определяет большое количество ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

К сожалению, выделение чистой культуры *C. difficile* не всегда рекомендуется в некоторых зарубежных клинических рекомендациях, вероятно, из-за технических трудностей работы с облигатно анаэробными бактериями. Но *C. difficile*-ассоциированная диарея, являясь нозокомиальной инфекцией, приводит к длительному пребыванию в лечебном учреждении, тем самым увеличивая финансовые расходы на лечение пациентов. Кроме того, вызывает серьезное беспокойство рост резистентности к антибактериальным препаратам у бактерий, в том числе и у *C. difficile*. Применение антибактериальных препаратов способствует селекции резистентных микроорганизмов. Это лежит в основе появления бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Поэтому необходим мониторинг антибактериальной резистентности *C. difficile*, что невозможно без выделения чистой культуры возбудителя.

Первым шагом в правильном лечении *C. difficile*-ассоциированной инфекции является быстрый и точный диагноз. Однако ни один из существующих методов выявления токсигенных *C. difficile* не является совершенным с точки зрения точности, стоимости и времени исполнения. Наличие положительного теста на ГДГ не позволяет определить способность *C. difficile* продуцировать токсины, дает большое количество ложных результатов. Дальнейший диагностический алгоритм предполагает определение токсинов А и В в кале доступными методами: ИФА, ИХА, выделение чистой культуры *C. difficile*, с последующим определением ее токсигенности молекулярно-генетическими методами (ПЦР), что имеет высокую прогностическую ценность. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам важно в свете нарастающей проблемы появления резистентных штаммов бактерий.

Использование одного из методов детекции токсигенной *C. difficile* приводит к ложноотрицательным или ложноположительным результатам, что негативно отражается на лечении пациентов с *C. difficile*-ассоциированной инфекцией. Использование в качестве первого и единственного скринингового метода диагностики *C. difficile*-ассоциированной инфекции определение фермента ГДГ иммунологическими методами приводит к ложноотрицательным результатам в 46% случаях при использовании ИХА и 88,9% случаях при использовании ИФА тест-систем. Вероятность выявления наличия фермента ГДГ иммунологическими (скрининговыми) методами повышается после достижения обсемененности кишечного биотопа *C. difficile* более 10^7 КОЕ/г.

В зарубежных клинических рекомендациях предлагается комбинировать тесты в двух- или трехэтапном алгоритме диагностики *C. difficile*-ассоциированной инфекции. На первом этапе определяют ГДГ *C. difficile*. Многими авторами считается, что в случае отрицательного результата дальнейшее обследование больного не требуется, при положительном необходимо проведение тестов, подтверждающих наличие токсинов (ПЦР или ИФА) [6, 7].

Для решения аналитических задач клинического лабораторного исследования с целью получения надежных лабораторных данных для постановки диагноза *C. difficile*-ассоциированной диареи, по нашему мнению, необходимо сочетание нескольких методов детекции токсигенных *C. difficile*. Трехэтапный алгоритм сочетает поэтапное выполнение тестов для детекции токсигенной *C. difficile*: на первом этапе — определение метаболического фермента ГДГ в просветных фекалиях, затем следует второй этап — выявления токсинов А, В, бинарного токсина; и третий этап — выделение токсигенной культуры *C. difficile* с обязательным тестированием ее чувствительности к антибактериальным препаратам. Таким образом, для достижения максимально высокой чувствительности и специфичности исследования при диагностике *C. difficile*-ассоциированной инфекции оптимален трехэтапный алгоритм лабораторной диагностики, включающий сочетание лабораторных методов. Многоэтапная лабораторная микробиологическая диагностика является адекватной стратегией, при которой низкая стоимость скринингового исследования и быстрота его исполнения, а именно определение ГДГ в просветных фекалиях, используется на первом этапе, за которым следует определение токсинов А и В в просветных фекалиях. При наличии диареи и отрицательных тестов на ГДГ и токсины А и В необходимо исключить наличие бинарного токсина. Бинарный токсин детектируется методом ПЦР. Определение токсигенных штаммов *C. difficile*, продуцирующих бинарный токсин, в лечебных учреждениях на современном этапе возможна только с использованием метода ПЦР, который имеет регистрационное удостоверение, выданное Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения. В нашем исследовании была использована единственная зарегистрированная на сегодняшний день ПЦР тест-система для анализатора GeneXpert DX. Заключительным этапом микробиологической диагностики является выделение токсигенной культуры *C. difficile* и определение ее чувствительности к антибактериальным препаратам.

Интерпретация результатов трехступенчатого алгоритма осуществляется следующим образом:

1. При положительном результате детекции ГДГ и токсинов А/В необходимо проведение дальнейшего исследования, направленного на выделение токсигенной культуры *C. difficile* и определение ее чувствительности к антибактериальным препаратам.

2. При отрицательном результате иммунологического исследования просветных фекалий на ГДГ необходимо проведение ПЦР анализа для верификации отрицательного результата.

3. Просветные фекалии, положительные по ГДГ и отрицательные по наличию токсина А/В, продолжают исследоваться на наличие возбудителя.

4. Просветные фекалии, положительные по токсинам и отрицательные по ГДГ, исследуются культуральным методом.

5. При выделении нетоксигенного штамма *C. difficile* результат следует расценивать как сомнительный, что требует дополнительного подтверждения.

6. При отсутствии ГДГ, токсинов А/В/бинарного токсина, а также возбудителя результат считается отрицательным.

Такой алгоритм характеризуется высокой воспроизводимостью результатов исследований, чувствительностью и специфичностью.

В последнее десятилетие отмечается повышенный интерес к проблеме клостридиальной инфекции. Длительная диагностика обуславливает несвоевременное проведение профилактических и санитарно-эпидемиологических

мероприятий. Все это создает предпосылки к персистенции возбудителя и его широкому распространению как в пределах одного отделения, так и в рамках целых учреждений. Именно поэтому исследования, направленные на создание оптимального диагностического алгоритма клостридиальной инфекции, чрезвычайно актуальны и позволят применить персонифицированный подход в ее лечении. Трехступенчатый алгоритм является эффективным способом обнаружения токсигенных *C.difficile*, позволяет диагностировать больше случаев, которые могут быть пропущены при исследовании биоматериала каким-либо одним методом. Уменьшение количества ложноотрицательных результатов позволяет снизить частоту внутрибольничной передачи, тем самым уменьшить годовые затраты, вытекающие из длительной госпитализации, снизить смертность от *C.difficile*-ассоциированной инфекции. Использование трехэтапного алгоритма исследования обеспечит правильную и своевременную диагностику, локальный микробиологический мониторинг и эпидемиологический надзор за *C.difficile*-ассоциированной инфекцией.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р 53022.2-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность). *Clinical laboratory technolog*, 2008.
2. Сафин А.Л., Ачкасов С.И., Сухина М.А. Сушков О.И. Факторы риска развития диареи, ассоциированной с *Clostridium difficile*, у колопроктологических больных. *Колопроктология*. 2017, 1 (59): 59-67.
3. Arimoto J., Horita N., Kato S. et al. Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for *Clostridium difficile*: Systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 2016, 6: 29754. doi: 10.1038/srep29754.
4. Burnham C.A., Carroll K.C. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26: 604-630.
5. Kazanowski M., Smolarek S., Kinnarney F. et al. *Clostridium difficile*: Epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities — A systematic review. *Techniques in coloproctology*. 2014, 18: 223-232.
6. Martin J., Monaghan T., Wilcox M.H. *Clostridium difficile* infection: advances in epidemiology, diagnosis and understanding of transmission. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2016, 13: 206-216.
7. Moon H-W., Kim H.N., Hur M. et al. Comparison of diagnostic algorithms for detecting toxigenic *Clostridium difficile* in routine practice at a tertiary referral hospital in Korea. *PLoS One*. 2016; 11 (8): e0161139; doi:10.1371/journal.pone.0161139.
8. Putsathit P., Morgan J., Bradford D. et al. Evaluation of the BD Max Cdiff assay for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* in human stool specimens. *Pathology*. 2015, 47 (2): 165-168.
9. Skříčka T., Hemmelová B., Mitáš L. et al. Клостридиальный колит — важная проблема в хирургии. *Колопроктология*. 2014, 4 (53): 17-23.

Поступила 04.10.17

Контактная информация: Сухина Марина Алексеевна, к.б.н.,
123423, Москва, ул. Саляма Адиля, 2

АКТИВНОСТЬ ЛАКТОФЕРРИНА РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ ГРАМПЛОЖИТЕЛЬНЫХ КОККОВ И *CANDIDA ALBICANS*

Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования

Цель. Изучение влияния лактоферрина (ЛФ) коровы и человека на штаммы *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus*, *Candida albicans*. **Материалы и методы.** Суточные агаровые культуры музейных и клинических штаммов микроорганизмов стандартизировали, развели физиологическим раствором до 5000 микробных клеток/мл, вносили по 0.1 мл в ступенчатое разведение ЛФ (от 1000 мкг/мл), инкубировали 18 — 24 часов при 37°C. Количество ЛФ в образце с полной видимой задержкой роста микробов являлось минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) для штамма. **Результаты.** МИК ЛФ человека была в 4 — 8 раз меньше, чем ЛФ коровы. Самые малые дозы требовались для подавления *C. albicans* ($11,3 \pm 1,5$ и $43,8 \pm 9,5$ мкг/мл соответственно), самые большие при использовании человеческого ЛФ необходимы для подавления *S. aureus* ($38,2 \pm 4,6$), а коровьего — *E. faecalis* ($206,3 \pm 51,1$). **Заключение.** ЛФ человека значительно эффективнее в подавлении бактериальной инфекции, однако в процессе эволюции наблюдается рост резистентности штаммов *S. aureus* к ЛФ. Учитывая большую доступность коровьего ЛФ и отсутствие тенденции к повышению резистентности, целесообразно использовать коровий ЛФ в высоких дозах при лечении инфекций, вызванных резистентными формами бактерий и *C. albicans*.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 54—58

Ключевые слова: лактоферрин, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, лекарственная устойчивость, минимальная ингибирующая концентрация

V.N.Zorina, O.N.Vorobeva, N.A.Zorin

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE HUMAN AND BOVINE LACTOFERRIN AGAINST GRAM-POSITIVE BACTERIA AND *CANDIDA ALBICANS*

Novokuznetsk State Institute for Further Training of Physicians — Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Russia

Aim. A comparative study of the effect of bovine and human lactoferrin (LF) on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* strains. **Materials and methods.** The daily agar cultures of museum and clinical strains of microorganisms were standardized, diluted with physiological solution up (from 5000 microbial cells/ ml to 0.1 ml) was added to the stepwise dilution of LF (from 1000 μg /ml) and incubated 18 — 24 hours at 37°C. The amount of LF in the sample with the total apparent growth retardation of the microbes was the minimum inhibitory concentration (MIC) for the strain. **Results.** The MIC of human LF was 4 — 8 times less than MIC of bovine LF. The smallest dose was required for the suppression of *C. albicans* (11.3 ± 1.5 and 43.8 ± 9.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively), the largest when using human LF was needed to suppress *S. aureus* ($38,2 \pm 4,6$), and in a case of bovine LF — *E. faecalis* ($206,3 \pm 51,1$). **Conclusion.** Human LF is much more effective in suppressing bacterial infection, but in the course of evolution, there is an increase in the resistance of *S. aureus* to LF. The higher availability of bovine LF and the lack of a tendency to increase resistance, it is advisable to use high-doses of bovine LF in the treatment of resistant forms of bacteria and *C. albicans*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 54—58

Key words: lactoferrin, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, drug resistance, minimal inhibitory concentration

ВВЕДЕНИЕ

Лактоферрин (ЛФ) является важнейшим компонентом мукозального иммунитета, осуществляющим эффективную первичную защиту от патогенной инвазии, а также обладающим выраженной иммуномодулирующей активностью [1]. Данный полифункциональный гликопротеин обнаружен у большинства млекопитающих, имеет сопоставимую структуру у человека и животных (80 кДа, 711 аминокислотных остатков у человека и из 689 у коровы) [5, 8]. Наибольшие концентрации ЛФ присутствуют в молозиве и молоке, меньшие — в слезной жидкости, слюне, семенной плазме, крови и моче, в секретах — вагинальных, бронхов, желудочно-кишечного тракта [5, 8]. Синтезируется ЛФ эпителиальными клетками, а также нейтрофилами, причем в экзокринных секретах и генитальном тракте его синтез постоянен, а в нейтрофилах он синтезируется при клеточной дифференциации, депонируется в гранулах и высвобождается лишь при активации клеток [1, 5]. Молекула белка пластична, состоит из N- и C-субъединиц, гомологичных по строению на 33 — 41% [5], но различающиеся по функциональной активности [7]. Различают нативную (апо-) и связанную с молекулами металлов (железо, медь, цинк, магний) холо-форму белка [5]. Антимикробная активность ЛФ реализуется сразу несколькими путями — он способен секвестрировать железо и дестабилизировать мембраны микроорганизмов, препятствует адгезии микробов, увеличивает фагоцитарную активность макрофагов, модулирует общий иммунный ответ, а также защищает от вирусных инфекций, подавляющих иммунный ответ [1, 8]. В частности, ЛФ напрямую взаимодействует с бактериальными ЛПС, предотвращая взаимодействие с CD14 и запуская сигнальный каскад, приводящий к высвобождению цитокинов и хемокинов, медиаторов липидов и активных форм кислорода [1, 8]. Кроме того, ЛФ обладает и выраженными антифунгицидными свойствами — индуцирует гибель клеток *Candida albicans* по апоптическому типу, провоцирует дисфункции их митохондрий, взаимосвязанные с накоплением ROS и высвобождением цитохрома C [2]. Защитными свойствами обладает не только целая молекула ЛФ, но и ее отдельные фрагменты: установлена эффективность применения пептида из 11 N-концевых остатков ЛФ человека (hLF1-11) против метициллинрезистентного стафилококка (*MRSA*) у мышей, а также при лекарственной устойчивости к *Acinetobacter baumannii* и инвазивной форме *Candida albicans*, устойчивой к флуконазолу [9]. Действие ЛФ избирательно: апо-форма ЛФ и его гидролизат ингибируют рост *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, однако не влияют на различных представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [3]. Необходимо отметить значительную гомологию ЛФ у различных млекопитающих: при сравнении C-субъединицы молока коровы с соответствующей субъединицей свиньи, лошади, человека, верблюда, козы и буйвола идентичность последовательностей составляет от 72% до 96% [7, 8]. Однако существует и ряд межвидовых различий, влияющих на защитные свойства ЛФ [7]. Подобные различия обосновывают противоречивость результатов при сравнении эффективности ЛФ от разных видов и при разной патологии: по данным одних авторов против вируса гепатита (HIV) наиболее активен ЛФ верблюда, активность ЛФ человека и коровы сопоставимо меньше [4], по другим публикациям ЛФ коровы значительно превосходит человеческий при менингококковой инфекции у мышей [6].

Целью нашего исследования было сравнительное изучение влияния лактоферрина коровы и человека на гноеродные кокки и *C. albicans in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коровье и сливное человеческое молоко (3 — 5 сутки лактации) освобождали от жира центрифугированием. Казеин осаждали подкислением препарата до $\text{pH}=4,0$ и отделяли центрифугированием. Надосадок нейтрализовали диализом в течение ночи и вносили на колонку анионообменника MacroPrep High Q (Bio-Rad, США). ЛФ элюировали линейным градиентом NaCl. Остаточные примеси удаляли гель-хроматографией на колонке TSK-gel Toyopearl 55F (Toyo Soda, Япония).

Для сравнительного изучения антимикробных свойств лактоферрина молока человека и коровы использовали 28 штаммов грамположительных кокков (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*) и 10 культур *Candida albicans*, из которых 4 были музейные с типичными свойствами, а 34 — клинические, полученные от больных с различными гнойно-воспалительными заболеваниями кожи, мягких тканей, дыхательной и мочевыделительной систем. Все они характеризовались множественной лекарственной устойчивостью к антибактериальным и антимикотическим препаратам и хлорсодержащим дезинфектантам.

Определение чувствительности микроорганизмов к ЛФ проводили стандартным методом двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне с концентрациями: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,8; 3,9; 1,95; 1,0; 0,5 мкг/мл. Суточные агаровые культуры исследуемых штаммов стандартизировали, разводили физиологическим раствором до 5000 микробных клеток в 1 мл (КОЕ/мл). В каждое разведение ЛФ и в контрольную пробирку с МПБ вносили по 0,1 мл микробной взвеси, перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 18 — 24 часов. Результат учитывали визуально по появлению признаков роста в контрольной и в опытных пробирках. Количество ЛФ в последней пробирке с полной видимой задержкой роста культуры расценивалось как минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для испытуемого штамма.

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи компьютерной программы InStat-II (GraphPad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным, минимальная ингибирующая концентрация ЛФ, полученного из молока человека, была в 4 — 8 раз меньше, чем ЛФ коровы (табл.).

При этом активнее всего ЛФ, вне зависимости от происхождения, ингибировал рост грибов рода *Candida*. Однако и в этом случае требовалось почти в 4 раза больше коровьего ЛФ для достижения эффекта, сходного с использованием человеческого.

В случае использования ЛФ коровьего молока в отношении двух изученных видов стафилококков эффективность его влияния была сопоставимой. Для подавления *E. faecalis* требовалось в среднем в 2 раза больше ЛФ, однако вследствие достаточно большой индивидуальной вариабельности результатов в данной подгруппе, статистически достоверных отличий не выявлено.

При изучении ЛФ из молока человека *S. aureus* значительно хуже поддавался воздействию, требовалась достоверно большая концентрация ЛФ — в среднем +30% к объему, необходимому для подавления *S. epidermidis* и *E. faecalis*.

Таким образом, эффективность ЛФ коровы значительно уступает ЛФ человека при противодействии бактериальной инвазии и грибам рода *Candida*,

самым устойчивым к воздействию ЛФ человека оказался *S. aureus*, а к ЛФ коровы — *E. faecalis*.

В целом, ЛФ коровы и человека обладают антимикробными свойствами, бактериостатические эффекты которых были показаны в отношении антибиотикорезистентных стафилококков и энтерококков и дрожжеподобных грибов рода *Candida*, однако МИК у них значительно различается. Это может быть связано, с одной стороны, со структурными различиями белка у разных видов млекопитающих [7, 8], а с другой, с объектом приложения — в эксперименте использовали штаммы возбудителей, полученных от человека.

Кроме того, антимикробная активность ЛФ в значительной степени обусловлена его способностью связывать железо, лишая бактерию необходимого для роста и жизнедеятельности микроэлемента [1, 8]. Возможно, потенциальная связывающая способность ЛФ коровьего молока, содержащего в среднем в 4 раза больше железа, чем ЛФ женского молока, также оказала влияние на результаты исследования.

Обращает на себя внимание повышенная устойчивость *S. aureus* к ЛФ человека по сравнению с двумя другими видами бактерий и отсутствие сходной реакции на коровий ЛФ. Можно предположить, что за время эволюции *S. aureus* выработал способы защиты от ЛФ, либо, что более вероятно, злоупотребление антибиотикотерапией привело к формированию резистентных мутантных форм, не чувствительных не только к биогенным и абиогенным лекарственным препаратам, но и к ЛФ. Это предположение косвенно подтверждается тем, что использование ЛФ (перорально) с антибиотиками при лечении гнойно-воспалительных заболеваний повышает его эффективность [8] — механизмы воздействия частично перекрываются, усиливая друг друга и сходным образом ослабевая у устойчивых форм. В этом случае перспективным представляется использование в схемах лечения стафилококковых инфекций коровьего лактоферрина, отличающегося от человеческого по структуре — его требовалось в 2,7 раза больше, однако эффективность в отношении *S. aureus* была наибольшей, по сравнению с воздействием на другие бактерии.

Таким образом, человеческий ЛФ демонстрирует значительно большую антимикробную активность в отношении штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* и *C. albicans*, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Однако приемлемая эффективность в сочетании со значительно боль-

Сравнительная характеристика противомикробной активности ЛФ человека и ЛФ коровы по МИК

Вид патогена	ЛФ человека (а) (мкг/мл) M±m [95% ДИ]	ЛФ коровы (б) (мкг/мл) M±m [95% ДИ]	p
<i>S. aureus</i> (1)	38,2±4,6 (n=9) [27,6—48,8] SD=13,780	104,2±20,8 (n=9) [56,1—152,2] SD=62,500	1a-1б) p=0,0070 1a-2a) p=0,0594nds 1a-3a) p=0,0333 1a-4a) p=0,0001 1б-4б) p=0,0143
<i>S. epidermidis</i> (2)	27,8±2,3 (n=9) [22,5—33,1] SD=6,890	118,1±26,4 (n=9) [57,1—179,0] SD=79,331	2a-2б) p=0,0036 2a-1a) p=0,0594nds 2a-4a) p=0,0001 2б-4б) p=0,0135
<i>E. faecalis</i> (3)	26,6±2,4 (n=10) [21,2—32,0] SD=7,550	206,3±51,1 (n=10) [90,7—321,8] SD=161,51	3a-3б) p=0,0025 3a-1a) p=0,0333 3a-4a) p=0,0001 3б-4б) p=0,0058
<i>C. albicans</i> (4)	11,3±1,5 (n=10) [8,0—14,7] SD=4,679	43,8±9,5 (n=10) [22,2—65,3] SD=30,190	4a-4б) p=0,0035 4a-1a) p=0,0001 4a-2a) p=0,0001 4a-3a) p=0,0001 4б-1б) p=0,0143 4б-2б) p=0,0135 4б-3б) p=0,0058

Примечание. SD — стандартное отклонение, [95% ДИ] — доверительный интервал, nds — приближающиеся к достоверным, но недостаточно значимые различия.

шей доступностью коровьего ЛФ представляются более перспективными, особенно при лечении антибиотикорезистентных форм бактериальной и кандидозно-инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зорина В.Н., Зорин Н.А. Белковые компоненты врожденного иммунитета в защите от патогенной инвазии. Журн. микробиол. 2013, 3: 111-117.
2. Acosta-Zaldívar M., Andrés M.T., Rego A. et al. Human lactoferrin triggers a mitochondrial- and caspase-dependent regulated cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. Apoptosis. 2016, 21(2): 163-173. doi: 10.1007/s10495-015-1199-9.
3. Chen P.W., Jheng T.T., Shyu C.L., Mao F.C. Synergistic antibacterial efficacies of the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with probiotic secretion in curbing the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 2013, 62 (Pt 12): 1845-1851. doi: 10.1099/jmm.0.052639-0.
4. El-Fakharany E.M., Sánchez L., Al-Mehdar H.A., Redwan E.M. Effectiveness of human, camel, bovine and sheep lactoferrin on the hepatitis C virus cellular infectivity: comparison study. Virol. J. 2013, 10: 199. doi: 10.1186/1743-422X-10-199.
5. Giansanti F., Panella G., Leboffe L., Antonini G. Lactoferrin from milk: Nutraceutical and pharmacological properties. Pharmaceuticals (Basel). 2016, 9 (4). pii: E61.
6. Schryvers A.B., Gonzalez G.C. Comparison of the abilities of different protein sources of iron to enhance *Neisseria meningitidis* infection in mice. Infect. Immun. 1989, 57 (8): 2425-2429.
7. Sharma S., Sinha M., Kaushik S. et al. C-lobe of lactoferrin: the whole story of the half-molecule. Biochem Res. Int. 2013; 2013: 271641. doi: 10.1155/2013/271641.
8. Siqueiros-Cendón T., Arévalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B.F. et al. Immunomodulatory effects of lactoferrin. Acta Pharmacol Sin. 2014, 35 (5): 557-566. doi: 10.1038/aps.2013.200.
9. van der Does A.M., Bogaards S.J., Jonk L. et al. The human lactoferrin-derived peptide hLF1-11 primes monocytes for an enhanced TLR-mediated immune response. Biometals. 2010, 23 (3): 493-505. doi: 10.1007/s10534-010-9322-4.

Поступила 15.10.17

Контактная информация: Зорина Вероника Николаевна, д.б.н., 654007, Новокузнецк, пр. Строителей, 5, р.т. (3843)45-84-18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Е.В.Отрашевская*¹, *В.Н.Винокурова*¹, *Е.А.Шитиков*²,
*Е.А.Сотникова*², *Т.А.Перевышина*¹, *С.А.Колченко*², *Т.Б.Бутусова*²,
*Е.С.Кострюкова*², *Е.Н.Ильина*², *Г.М.Игнатьев*^{1,3}

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ СУБ-ШТАММА *M. BOVIS* VCG-1 (RUSSIA) В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ БЦЖ

¹НПО «Микроген», Москва; ²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, Москва; ³Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов

Цель. Изучение структуры генома и анализ стабильности генетических свойств субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia), применяемого для производства вакцин. *Материалы и методы.* Было проведено полногеномное секвенирование и последующий сравнительный анализ образцов субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia) от рабочего банка до конечного пассажа производственного культивирования, а также производственных серий. Молекулярно-биологическими методами был проведен анализ числа тандемных повторов (VNTR) по 24 локусам и сполиготипирование. *Результаты.* Последовательность субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia) рабочего посевного банка была полностью собрана, аннотирована и депонирована в базу GenBank. Анализ DU2- и RD-регионов подтвердил принадлежность субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia) к группе DU2-I, BCG Russia.

Полногеномное выравнивание образцов суб-штамма производственных серий вакцины на геном *M. bovis* BCG-1 (Russia) рабочего банка не выявило структурных отличий. Сполиготипирование и VNTR-профиль также продемонстрировали идентичность структур. *Заключение.* Результатом проведенного исследования явилось как подтверждение подлинности производственного суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia), так и демонстрация его генетической стабильности в процессе производства вакцины БЦЖ и БЦЖ-М. Стабильность генома суб-штамма опосредованно подтверждает стабильность производственных условий культивирования и качество производственного процесса.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 58—67

Ключевые слова: *M. bovis* BCG-1 (Russia) суб-штамм, подлинность, стабильность генома

*E.V.Otrashevskaya*¹, *V.N.Vinokurova*¹, *E.A.Shitikov*²,
*E.A.Sotnikova*², *T.A.Perevyshina*¹, *S.A.Kolchenko*², *T.B.Butusova*²,
*E.S.Kostryukova*², *E.N.Ilina*², *G.M.Ignatev*^{1,3}

***M. BOVIS* BCG-1 (RUSSIA) SUB-STRAIN GENOME STABILITY INVESTIGATION WITHIN THE ENTIRE PRODUCTION PROCESS**

¹Scientific and Production Association for Immunobiological Preparations «Microgen», Moscow; ² Federal Scientific and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Moscow; ³St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera and the Bacterial Preparations Factory, Russia

Aim. The aim of the current study was to analyze the genome structure of the *M. bovis* BCG-1 (Russia) sub-strain, used for the vaccine production, as well as its genome stability within the entire production process. *Materials and methods.* Whole genome sequencing and *M. bovis* BCG-1 (Russia) working seed lot and for the last production passage of the sub-strain cultivation from a number of the vaccine batches. Additionally, VNTR sequences of 24 locus analyses, RD patterns comparison, as well as spoligotyping were performed. *Results.* The whole genome sequence of the *M. bovis* BCG-1 (Russia) working seed lot was assembled, annotated and deposited to GenBank. On the basis of DU2- and RD-regions analyzes *M. bovis* BCG-1 (Russia) sub-strain was confirmed to be belonged to BCG Russia strains of DU2-I group. Whole genome sequencing followed by comparative analysis of RD patterns and SNPs confirmed the stability of the vaccine sub-strain genome from the working seed lot to a number of the vaccine batches obtained within the two-years period. VNTR profile and spoligopattern exactly matched the *M. bovis* BCG-1 (Russia). *Conclusion.* Thus the *M. bovis* BCG-1 (Russia) sub-strain genome identity and stability have been studied and demonstrated. The obtained result confirmed the vaccine production process consistency.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 58—67

Key words: *M. bovis* BCG-1 (Russia) sub-strain, identity, genome stability

ВВЕДЕНИЕ

Вакцина БЦЖ (бациллы Кальметта-Герена) существует на протяжении почти 100 лет и является одной из наиболее используемых в настоящее время вакцин, охватывая более 90% новорожденных и детей грудного возраста в странах, где она является компонентом национальной программы иммунизации детей [23]. Все существующие вакцинные суб-штаммы имеют происхождение от первоначального изолята *M. bovis*, который Кальметт и Герен пассировали в течение 13 лет. В результате последующих пассажей штамма в различных условиях были получены разнообразные вакцинные суб-штаммы

BCG с фенотипическими и генотипическими различиями [23]. В плане эффективности ни один суб-штамм BCG не обладает явными преимуществами перед другими [22]. ВОЗ признала необходимость молекулярно-генетической характеристики всех вакцинных суб-штаммов *M. bovis* BCG в связи с их разнообразием [9, 24]. На данном этапе разработаны и полностью охарактеризованы четыре референсных штамма *M. bovis* BCG: Danish 1331, Tokyo 172-1, Russian BCG-1 и Moreau RDJ [15, 22, 24].

Согласно Европейской Фармакопее VIII и Фармакопее РФ XIII подтверждение подлинности производственного суб-штамма *M. bovis* BCG должно проводиться не только традиционными методами, но и молекулярно-биологическими, в качестве дополнительных. На данном этапе ВОЗ предлагает использовать для подтверждения подлинности производственного суб-штамма *M. bovis* BCG мультиплексную ПЦР, которая позволяет анализировать шесть регионов генома [15, 22, 23]. Однако так как данный метод не позволяет выявлять возможные мутации в иных регионах генома, ВОЗ также рекомендует более тщательное изучение генетической стабильности производственных суб-штаммов *M. bovis* BCG иными молекулярно-биологическими методами [9]. Во избежание возникновения фенотипических изменений суб-штаммов *M. bovis* BCG ВОЗ также рекомендует всем производителям ограничить количество пассажей между главным и рабочим посевными банками и мониторировать генетическую стабильность суб-штамма в процессе производства от главного банка и до конечного продукта [24].

Целью настоящего исследования явилось изучение структуры генома и анализ стабильности генетических свойств *M. bovis* суб-штамм BCG-1 (Russia), применяемого для производства вакцин БЦЖ и БЦЖ-М НПО «Микроген». Для достижения поставленной цели было проведено полногеномное секвенирование и сравнительный геномный анализ образцов суб-штамма от рабочего посевного банка до конечного пассажа производственного культивирования, а также десяти последовательных производственных серий вакцины БЦЖ/БЦЖ-М.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2014 году были исследованы образцы суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) рабочего посевного банка и образцы последнего пассажа производственного культивирования одной производственной серии вакцины БЦЖ (филиал «Аллерген», Ставрополь). Рабочий посевной банк был наработан из вакцинного штамма *M. bovis* суб-штамм BCG-1 (Russia), полученного от НЦ ЭСМП (№ 70001, посевная серия 368 «щ», 2006 г.). Последним пассажем производственного культивирования суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) в соответствии с производственным регламентом являлся шестой пассаж.

В 2015 году для исследования были взяты образцы последнего шестого пассажа производственного культивирования суб-штамма BCG-1 (Russia) десяти последовательных производственных серий вакцины БЦЖ и БЦЖ-М (НПО «Микроген»). Данные серии вакцин были наработаны из исследованного в 2014 году рабочего посевного банка.

Сбор материала для исследования проводился путем отделения микробной массы от культуральной среды на фильтровальной бумаге, отмывания культуры 0,9% раствором натрия хлорида и дальнейшим сбором микробной массы в микроцентрифужные пробирки микробиологическими петлями. Собранный материал хранился при температуре $\leq +4^{\circ}\text{C}$.

Выделение тотальной геномной ДНК из всех образцов производственной культуры *M. bovis* BCG-1 (Russia) было осуществлено с использованием набора «ПРОБА-НК» («ДНК-Технология», Москва) согласно инструкции производителя.

Определение полногеномной последовательности суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) из образцов рабочего посевного банка, а также образцов *M. bovis* BCG-1 (Russia) последнего пассажа одного производственного цикла 2014 г. было проведено методом секвенирования с использованием высокопроизводительного секвенатора GS FLX+ (Roche, США). Фрагментные библиотеки были получены в соответствии с протоколом производителя (Rapid Library Preparation Method Manual GS FLX+ Series — XL+, Roche, США) с использованием коммерческого набора GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (Roche, США). Дополнительно для образцов было проведено секвенирование с использованием прибора Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). Для этого были получены две библиотеки парных фрагментов (с размером библиотеки 2000–3000 п.о. и 5000–6000 п.о.) с помощью коммерческого набора 5500 SOLiD Mate-Paired Library Construction Kit (Life Technologies, США) в соответствии с протоколом Ion Mate-Paired Library Preparation (Life Technologies Demonstrated Protocol). Для сборки геномов *de novo* использовалась программа GS De Novo assembler version 2.9. Объединение полученных контигов в скаффолды осуществлялось с помощью программы SSPASE [5].

Полногеномную последовательность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) из образцов десяти последовательных производственных серий вакцины БЦЖ/БЦЖ-М 2015 г. определяли с использованием секвенатора ionTorrent PGM (Life Technologies). Фрагментные библиотеки были получены с использованием коммерческого набора Ion Xpress™ Plus gDNA Fragment Library Preparation (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Каждый из геномов был секвенирован в среднем с 14-кратным покрытием.

Для сравнительного анализа были использованы данные полногеномного секвенирования двух суб-штаммов BCG Russia, GenBank №ERR766224 [1] и BCG Russia, GenBank №SRR398629 [17]. Дополнительно были использованы геномные последовательности *M. bovis* BCG Tokyo 172, GenBank №AP010918.1, и *M. bovis* BCG Moreau RDJ, GenBank №AM412059.2, относящиеся к группе DU2-1, а также *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2, GenBank №AM408590.1, *M. bovis* AF2122/97, GenBank №NC_002945.4 и *M. tuberculosis* H37Rv, GenBank №NC_000962.3.

Картирование чтений с прибора на геномы *M. bovis* BCG Pasteur и *M. tuberculosis* H37Rv осуществлялось с помощью инструмента bowtie2 [11]. Анализ данных выравнивания проводился в приложении samtools 0.1.19 [13]. Поиск однонуклеотидных полиморфизмов осуществлялся с помощью программы VarScan v 2.3.1 [10]. Выравнивание и поиск замен в образцах, представленных полногеномными последовательностями, осуществлялся с помощью программного пакета MUMMER 3 [8].

Для анализа делетированных последовательностей, так называемых регионов различия (Region of Difference; RD), проводилось сравнение покрытия анализируемого региона с покрытием фланкирующих участков. В соответствии с ранее опубликованным исследованием [2] был проведен сравнительный анализ основных RD-регионов, отличающихся как между представителями первой (DU2-1) группы, так и от штамма *M. bovis* BCG Pasteur. Дополнительно

были определены размеры отдельных RD-регионов согласно проведенному ранее исследованию [3].

Результаты сборки de novo с применением программы GS De Novo assembler version 2.9 использовались для определения количества и локализации повторяющегося элемента IS6110.

Анализ числа tandemных повторов в различных локусах генома (Variable Number of Tandem Repeats; VNTR) для суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») проводился по 24 локусам с использованием праймеров, описанных ранее [21]. Сполиготипирование исследуемых образцов производственного суб-штамма проводилось, как описано ранее [4]. Для геномов суб-штамма BCG Russia (GenBank №ERR766224 и №SRR398629), представленных в виде чтений с прибора, сполитип определялся с использованием программы SpolPred [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Подтверждение подлинности вакцинного суб-штамма M. bovis BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген»). В ходе исследования было проведено полногеномное секвенирование суб-штамма M. bovis BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») из образцов рабочего посевного банка. Суммарное количество контигов при сборке чтений фрагментной библиотеки составило 81, покрытие — 54. На следующем этапе обработки данных было проведено объединение контигов в скаффолды с использованием чтений с библиотек парных фрагментов. В результате проведенной работы для генома M. bovis BCG-1 (Russia) было получено 8 скаффолдов. Дальнейшее «закрытие» генома производственного суб-штамма было осуществлено с использованием секвенирования по Сэнгеру. Полногеномная последовательность суб-штамма M. bovis BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») депонирована в базу GenBank под номером №CP013741.1.

1.1 Анализ структуры генома суб-штамма M. bovis BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген»). Для M. bovis BCG-1 (Russia), так же как и для M. bovis BCG Tokyo 172 и BCG Moreau RDJ, была проанализирована дупликация DU2, которая лежит в основе классификации вакцинных штаммов BCG [6]. В геноме M. bovis BCG-1 (Russia) дублированный участок имеет протяженность 20704 п.н. и включает 20 генов (Rv3299c-Rv3317, аннотация по M. tuberculosis H37Rv). Такие границы также характерны для ранних штаммов BCG Tokyo 172 и BCG

Таблица 1. Сравнение RD-регионов суб-штамма *M. bovis* BCG-1 Russia (НПО «Микроген») и других суб-штаммов группы DU2-1 относительно штамма BCG Pasteur 1173P2

Регион отличия	Коорд. по H37Rv	Суб-штаммы <i>M. bovis</i>					
		BCG-1 (Russia) (рабочий банк НПО «Микроген»)	BCG Russia (ERR766224)	BCG Russia (SRR398629)	Moreau RDJ	Tokyo 172	Pasteur 1173P2
RD2	2221057-2231845	+	+	+	+	+	—
RD14	1998225-2007297	+	+	+	+	+	—
nRD18	1332920-1334466	+	+	+	+	+	—
PhoP ins IS6110	852067-852068	+	+	+	+	+	—
RD Japan	3825027-3825048	+	+	+	+	—	+
RD16	3817365-3824973	+	+	+	—	+	+
ΔfadD26-ppsA	3244503-3245478	—	—	—	+	—	—
RD Moreau (ΔRv3887c)	4370517-4371645	—	—	—	+	—	—
RD Russia	4140085-4141688	—	—	—	+	+	+

Moreau RDJ, образующих вместе с BCG Russia группу DU2-I. При этом в геноме BCG Russia и BCG Tokyo 172 дупликация DU2 состоит из трех копий, а в геноме Moreau RDJ из двух. В свою очередь, DU2 BCG Pasteur имеет длину 36163 п.н., относится к группе DU2-IV и образуется в результате дупликации более протяженного фрагмента, чем в случае DU2-I и двух последующих делеций [6].

Результаты исследования основных RD-регионов суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia), а также сравнительный анализ их наличия/отсутствия в суб-штаммах *M. bovis* BCG первой (DU2-I) группы представлены в табл. 1. Полученные в результате проведенных исследований данные суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) совпали с ранее опубликованными данными для *M. bovis* BCG Russia [2, 12].

Результаты определения размеров отдельных RD-регионов представлены в табл. 2. Как видно из табл., суб-штамм *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген»), как и другие представители BCG Russia, может быть дифференцирован от суб-штаммов *M. bovis* BCG Tokyo 172 и *M. bovis* BCG Moreau RDJ по локусам RD16 и *senX3-regX3*.

Полученные результаты подтверждают принадлежность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») к группе DU2-I, в целом, и к подгруппе *M. bovis* BCG Russia, в частности, и позволяют проводить дифференцирование суб-штаммов *M. bovis* BCG Russia, в целом, внутри группы DU2-I с достаточной степенью точности.

1.2 Анализ количества тандемных повторов (VNTR) в различных локусах генома *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») и сполиготипирование. В ходе исследования была установлена структура DR (direct repeat, прямые повторы) региона для исследуемого суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia). Споллигопаттерн штаммов содержал спейсеры 1, 2, 4–8, 10 — 15, 17 — 31, 25 и 32 — 38 (SIT 482 по международной базе данных SITVIT WEB) (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE). Между 24 и 25 спейсерами была расположена последовательность IS6110 элемента.

Для определения VNTR-профиля *M. bovis* BCG-1 (Russia) в дополнение к результатам полногеномного секвенирования была использована 24-локусная система типирования *M. tuberculosis*. Результаты исследования суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia), а также сравнительный анализ с другими образцами *M. bovis* BCG представлены в табл. 3. Как видно из табл. 3, локус 2461 суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) и суб-штамма *M. bovis* BCG Tokyo 172 содержат по 5 копий повтора, тогда как у суб-штамма *M. bovis* BCG Moreau RDJ — 3 копии. В свою очередь, локус 4052 штаммов *M. bovis* BCG Russia и *M. bovis* BCG Moreau RDJ содержит 5 копий повтора, в отличие от штамма *M. bovis* BCG Tokyo 172, содержащего 4 копии повтора, что согласуется с ранее опубликованными данными [18]. По локусу VNTR 580 суб-штаммы *M. bovis*

Таблица 2. Сравнительный анализ размеров RD-регионов суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») относительно других суб-штаммов группы DU2-I

Суб-штамм <i>M. bovis</i>	Регион отличия* (п.о.)					
	RD1	RD2	RD8	RD14	RD16	<i>senX3-regX3</i>
BCG-1 (Russia) (рабочий банк НПО «Микроген»)	193	315	472	252	401	276
BCG Russia (GenBank №ERR766224)	193	315	472	252	401	276
BCG Russia (GenBank №SRR398629)	193	315	472	252	401	276
BCG Tokyo 172	193	315	472	252	379	353
BCG Moreau RDJ	193	315	472	252	—	276

Примечание. *Как описано ранее [2].

BCG-1 (Russia) и *M. bovis* BCG Moreau RDJ содержат равное количество копий повтора (два), что отличает их от суб-штамма *M. bovis* BCG Токуо 172, содержавшего 3 копии. Полученные по локусу VNTR 580 результаты согласуются с ранее опубликованными данными [14]. Полученный VNTR профиль *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») подтверждает принадлежность суб-штамма к группе DU2-1.

1.3 Анализ однонуклеотидных полиморфизмов *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген»). В ходе сравнительного анализа производственного суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) и других представителей группы DU2-1 относительно генома *M. bovis* BCG Pasteur1173P2 было обнаружено 23 полиморфизма, которые также характерны для других суб-штаммов *M. bovis* BCG Russia (GenBank №ERR766224 и №SRR398629). Из них 4 SNPs находились в межгенных областях генома: C204726T, C207243T, G1165130A и C2645769T. Из мутаций, найденных в кодирующей области генома *M. bovis* BCG Russia, всего одна была синонимичной, а 18 приводили к несинонимичным заменам. При этом два полиморфизма относились к нонсенс-мутациям и вели к образованию стоп-кодона — BCG_0237 (S123*) и BCG_0908 (Q64*). Результаты проведенного сравнительного исследования подтверждают принадлежность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) к группе *M. bovis* BCG Russia.

При сравнительном анализе суб-штаммов *M. bovis* BCG Russia в каждом были найдены штаммо-специфические полиморфизмы. Для суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») была обнаружена синонимичная замена в гене *glnD*. Для суб-штамма *M. bovis* BCG Russia (GenBank №SRR398629) была идентифицирована синонимичная замена в гене Rv0383c, а для суб-штамма *M. bovis* BCG Russia (GenBank №ERR766224) мутации были обнаружены в гене *rhoR* двухкомпонентной системы PhoP-PhoR и в гене PE_PGRS27.

2. Подтверждение стабильности суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») в процессе производственного культивирования. Для исследования стабильности генома *M. bovis* BCG-1 (Russia) было проведено полногеномное секвенирование образцов суб-штамма последнего пассажа производствен-

Таблица 3. Сравнительный анализ VNTR-профиля суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») относительно других суб-штаммов группы DU2-1

Суб-штамм <i>M. bovis</i>	VNTR-локус*																								
	154	580	960	1644	2059	2531	2687	2996	3007	3192	4348	802	424	577	1955	2163	2165	2347	2401	2461	3171	3690	4052	4156	
BCG Pasteur 1173P2	2	2	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	0	6	1	3	5	2	2	5	3	2	2	5	0
BCG Токуо 172	2	3	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	0	5	1	3	5	2	2	5	3	2	2	4	0
BCG Moreau RDJ	2	2	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	0	5	1	3	5	2	2	3	3	2	2	5	0
BCG-1 (Russia) (рабочий банк)	2	2	2	3	2	4	2	5	3	3	2	2	0	5	1	3	5	2	2	5	3	2	2	5	0

Примечание. * Как описано ранее [19].

ной серии вакцины БЦЖ 2014 г. по схеме, аналогичной для образцов рабочего посевного банка *M. bovis* BCG-1 (Russia) (Материалы и методы). Суммарно геном *M. bovis* BCG-1 (Russia) был прочитан со 115-кратным покрытием. В ходе обработки данных было получено 6 скаффолдов. Полногеномное выравнивание исследуемых образцов последнего производственного пассажа на геном суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) рабочего банка не выявило структурных изменений как на уровне RD-регионов, так и на уровне однонуклеотидных полиморфизмов. Результаты сравнительного анализа DR региона (сполиготипирование) и VNTR профиля суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) на разном уровне производственного культивирования также продемонстрировали идентичность суб-штамму *M. bovis* BCG-1 (Russia) рабочего посевного банка, депонированному ранее в базу данных NCBI (GenBank №C3013741.1). Таким образом, в ходе сравнительного анализа было определено полное совпадение геномов производственного суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») от рабочего банка до последнего пассажа производственного культивирования (до этапа лиофилизации).

Полногеномное выравнивание образцов производственного суб-штамма десяти последовательных производственных серий вакцины БЦЖ и БЦЖ-М (НПО «Микроген») 2015 г. на геном *M. bovis* BCG-1 (Russia) рабочего банка также не выявило структурных изменений как на уровне RD-регионов, так и на уровне однонуклеотидных полиморфизмов. Сполиготипирование и VNTR-профиль суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) десяти производственных серий 2015 г. также продемонстрировали идентичность относительно друг друга и относительно суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) рабочего посевного банка. Результаты сравнительного анализа полногеномных последовательностей образцов десяти производственных серий суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) депонированы в базу GenBank под номером №PRJNA3862621.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время все большее значение в паспортизации вакцинных штаммов вирусов и бактерий и соответственно в аттестации производственных банков вакцинных штаммов придается молекулярно-биологическим методам. Наибольшее развитие среди них получили амплификационные технологии, позволяющие достаточно быстро провести идентификацию (подтверждение подлинности) исследуемого штамма. При этом стоит отметить, что данные методы позволяют анализировать лишь небольшую часть генома. Полногеномное секвенирование дает исчерпывающую информацию о последовательности и структуре всего генома исследуемого штамма и может быть использовано как для подтверждения подлинности, так и для оценки стабильности исследуемого штамма.

Для подтверждения подлинности вакцинного суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») методами сравнительной геномики был проведен анализ геномной организации штамма, а также однонуклеотидных полиморфизмов относительно представителей группы DU2-I, а также референсных геномов *M. bovis* BCG Pasteur и *M. tuberculosis* H37Rv. Исходя из анализа DU2- и RD-регионов было подтверждено, что суб-штамм *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») относится к «ранним» вакцинным суб-штаммам группы DU2-I, *M. bovis* BCG Russia. Суб-штамм *M. bovis* BCG-1 (Russia) имел, как и другие представители *M. bovis* BCG Russia [2, 17], включая *M. bovis* BCG Sofia SL222 [20], характерную делецию RDRussia. Данная делеция, впервые описанная Mostowy S. et al. [16], имеет протяженность 1603 п.н.

и затрагивает гены Rv3697c, Rv3697A, Rv3698 (согласно аннотации *M. tuberculosis* H37Rv).

Для более детального анализа суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») были дополнительно определены размеры шести отдельных локусов, как было опубликовано ранее [3]. Данный подход также позволяет дифференцировать суб-штаммы внутри группы DU2-I и удовлетворяет критериям точности, надежности и воспроизводимости, рекомендованным ВОЗ.

В результате проведенного исследования были получены данные, полностью согласующиеся с ранее опубликованными [2, 3, 15, 17, 20], что подтверждает принадлежность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») к группе DU2-I, в целом, и к подгруппе *M. bovis* BCG Russia, в частности.

Для оценки возможных микроэволюционных изменений суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») был проведен поиск однонуклеотидных полиморфизмов как в самом образце, так и в других представителях группы *M. bovis* BCG Russia (GenBank №ERR766224, №SRR398629) относительно штамма *M. bovis* BCG Pasteur. Большинство полиморфизмов (N=23), общих для проанализированных в данном исследовании штаммов *M. bovis* BCG Russia, было найдено и в исследованных образцах суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia). При этом была выявлена всего одна синонимичная мутация в гене *glnD*, отличающая *M. bovis* BCG-1 (Russia) от других представителей *M. bovis* BCG Russia [2, 17].

Генетическая стабильность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) была изучена на разных уровнях в соответствии с рекомендациями ВОЗ [9, 23]. Рекомендованное ВОЗ сравнительное исследование VNTR-профилей и RD-регионов, а также элемента IS6110 [9] выявило полную идентичность всех производственных образцов суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia). Сравнительный анализ однонуклеотидных полиморфизмов также не выявил различий. При этом специфическая для *M. bovis* BCG-1 (Russia) (НПО «Микроген») мутация в гене *glnD* сохранялась на всех пассажах культивирования суб-штамма в течение всего двухлетнего периода мониторинга стабильности генома. Таким образом, в результате проведенного исследования продемонстрирована генетическая стабильность суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) в процессе одного производственного цикла, а также в процессе производства десяти последовательных серий вакцины БЦЖ и БЦЖ-М. Стабильность генома вакцинного суб-штамма опосредованно подтверждает стабильность производственных условий культивирования и качество производственного процесса.

Результаты исследования генетической стабильности генома вакцинного суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) как ранее опубликованные [1, 19], так и представленные в данном исследовании позволяют вносить в паспорта посева серий суб-штамма информацию о генетических маркерах, что позволит производителям вакцины БЦЖ и БЦЖ-М осуществлять контроль подлинности, а также мониторировать стабильность генома вакцинного суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) молекулярно-биологическими методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леви Д.Т., Обухов Ю.И., Александрова Н.В., Волкова Р.А., Эльберт Е.В., Альварес Фигероа М.В., Прокопенко А.В., Луданный Р.И. Оценка подлинности и стабильности вакцины БЦЖ методом мультиплексной ПЦР. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016, 16 (1): 49-53.

2. Abdallah A.M., Hill-Cawthorne G.A., Otto T.D. et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci. Rep.* 2015, 5: 15443 (online).
3. Bedwell J., Kairo S.K., Behr M.A., Bygraves J.A. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine.* 2001, 19: 2146-2151.
4. Bespyatykh J.A., Zimenkov D.V., Shitikov E.A. et al. Spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis complex isolates using hydrogel oligonucleotide microarrays. *Infection, Genetics, Evolution*, 2014, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.024.
5. Boetzer M., Henkel C.V., Jansen H.J. et al. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics.* 2001, 4: 578-579.
6. Brosch R., Gordon S.V., Garnier T. et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2007, 13: 5596-5601.
7. Coll F., Mallard K., Preston M.D. et al. SpolPred: rapid and accurate prediction of Mycobacterium tuberculosis spoligotypes from short genomic sequences. *Bioinformatics.* 2012, 22: 2991-2993.
8. Delcher A.L., Phillippy A., Carlton J., Salzberg S.L. Fast algorithms for large-scale genome alignment and comparison. *Nucleic Acids Res.* 2002, 11: 2478-2483.
9. Knezevic I., Corbel M.J. WHO discussion on the improvement of the quality control of BCG vaccines. Pasteur Institute, Paris, France, 7 June 2005. *Vaccine*, 2006, 24: 3874-3877.
10. Koboldt D.C., Zhang Q., Larson D.E. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012, 3: 568-576.
11. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods.* 2012, 4: 357-359.
12. Leung A.S., Tran V., Wu Z. et al. Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. *BMC Genomics.* 2008, 9: 413.
13. Li H., Handsaker B., Wysoker A. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009, 16: 2078-2079.
14. Magdalena J., Supply P., Loch C. Specific differentiation between Mycobacterium bovis BCG and virulent strains of the Mycobacterium tuberculosis complex. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 9: 2471-2476.
15. Markey K., Ho M.M., Choudhury B. et al. Report of an international collaborative study to evaluate the suitability of multiplex PCR as an identity assay for different sub-strains of BCG vaccine. *Vaccine.* 2010, 28: 6964-6969.
16. Mostowy S., Tsolaki A.G., Small P.M. et al. The in vitro evolution of BCG vaccines. *Vaccine.* 2003, 21: 4270-4274.
17. Pan Y., Yang X., Duan J. et al. Whole-Genome sequences of four Mycobacterium bovis BCG vaccine strains. *J. Bacteriol.* 2011, 12: 3152-3153.
18. Pym A.S., Brosch R. Tools for the population genomics of the tubercle bacilli. *Genome Res.* 2000, 12: 1837-1839.
19. Sotnikova E.A., Shitikov E.A., Malakhova M.V. et al. Complete genome sequence of Mycobacterium bovis strain BCG-1 (Russia). *Genome Announcements.* 2016, 4: 1-2.
20. Stefanova T. Quality control and safety assessment of BCG vaccines in the post-genomic era. *Biotechnology Biotechnological Equipment.* 2014, 28: 387-391.
21. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 12: 4498-4510.
22. WHO. Informal Consultation on Standardization and Evaluation of BCG Vaccines, 22-23 September 2009, WHO, Geneva, Switzerland. p.1-25
23. WHO. Information Sheet observed rate of vaccine reactions Bacille Calmette — Guérin (BCG) vaccine. *Global Vaccine Safety, Immunization, Vaccines and Biologicals.* Geneva. April 2012. p. 1-5.
24. WHO. Report WHO Consultation on the characterisation of BCG vaccines. Geneva, Switzerland, 8-9 December, 2004. p. 1-8.

Поступила 30.10.17

Контактная информация: Отрашевская Елена Викторовна,
115088, Москва, 1-я Дубровская ул., 15, п.т. (495)790-77-73

*И.В.Фельдблюм¹, В.В.Романенко³, А.М.Николаева², К.А.Субботина¹,
О.Ю.Соснина², О.А.Перминова¹, О.В.Белякова², Т.В.Данилина², А.Е.Ершов²,
Д.М.Трофимов², Е.А.Быкова², С.В.Мартirosян³, А.В.Анкудинова⁴*

РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЦЕНТРОВОГО КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ АКДС-ГепВ+Ниб ПРОИЗВОД- СТВА НПО «МИКРОГЕН» ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ДЕТЕЙ 6 МЕСЯЦЕВ

¹Пермский государственный медицинский университет им. Е.А.Вагнера; ²НПО «Микроген», Москва; ³Детская городская больница № 10, Екатеринбург; ⁴НИИ вирусных инфекций, Екатеринбург

Цель. Оценка реактогенности, безопасности и иммуногенности новой отечественной комбинированной вакцины АКДС-ГепВ+Ниб. *Материалы и методы.* Оценка реактогенности, безопасности и иммуногенности препарата исследованы в многоцентровом простом слепом сравнительном рандомизированном клиническом исследовании при иммунизации детей 6 месяцев (препарат сравнения — вакцина АКДС-ГепВ в сочетании с вакциной Хиберикс®). *Результаты.* Отечественная комбинированная вакцина АКДС-ГепВ+Ниб характеризуется хорошей переносимостью, высоким профилем безопасности и выраженной иммуногенностью. По показателям серопротекции, сероконверсии и средней геометрической титров антител сопоставима с используемыми в России вакцинами АКДС-ГепВ и Хиберикс®. *Заключение.* Вакцина АКДС-ГепВ+Ниб может быть рекомендована для регистрации на территории Российской Федерации для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и Ниб-инфекции.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 68—75

Ключевые слова: АКДС-ГепВ+Ниб вакцина, реактогенность, безопасность, иммуногенность

*I.V.Feldblyum¹, V.V.Romanenko³, A.M.Nikolaeva², K.A.Subbotina¹,
O.Yu.Sosnina², O.A.Perminova¹, O.V.Belyakova², T.V.Danilina², A.E.Ershov²,
D.M.Trofimov², E.A.Bykova², S.V.Martirosyan³, A.V.Ankudinova⁴*

RESULTS OF A MULTICENTER CLINICAL STUDY OF A NEW COMBINATION VACCINE DTaP-HepB+Hib PRODUCTION OF THE CPA «MICROGEN» FOR IMMUNIZATION OF CHILDREN 6 MONTHS

¹Wagner Perm State Medical University; ²Scientific and Production Association for Immunobiological Preparations «Microgen», Moscow; ³City Children's Hospital No. 10, Ekaterinburg; ⁴Research Institute of Viral Infections, Ekaterinburg, Russia

Aim. The aim of the study is evaluate of reactogenicity, safety and immunogenicity of the native combined vaccine DTaP-HepB+Hib. *Materials and methods.* Assessment of reactogenicity, safety and immunogenicity of the drug is investigated in a multicenter, comparative, randomized, simple-blind clinical trial of immunization of children 6 months (the comparator vaccine DTaP-HepB combined vaccine, Hiberix®). *Results.* The native combined vaccine DTaP-HepB+Hib is characterized by good tolerability, high safety profile and a pronounced immunogenicity. In terms of seroprotection, seroconversion and geometric mean titers of antibodies comparable to that used in Russia of vaccines DTP-HBV and Hiberix®. *Conclusion.* Vaccine DTaP-HepB+Hib can be recommended for registration in the territory of the Russian Federation⁴ for the prevention of pertussis, diphtheria, tetanus, hepatitis B and Hib-infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 68—75

Key words: DTaP-HepB+Hib vaccine, reactogenicity, safety, immunogenicity

ВВЕДЕНИЕ

Вакцинопрофилактика является высокоэффективной мерой борьбы с инфекционными болезнями, воздействующей на важнейший регулятор эпидемического процесса — иммунитет населения. В нашей стране иммунопрофилактика поднята до ранга государственной политики и рассматривается как одна из ведущих здоровьесберегающих технологий. Расширение числа инфекций, контролируемых специфической профилактикой, обуславливает необходимость максимально широкого использования комбинированных вакцин, которые позволяют уменьшить затраты на иммунизацию, повысить приверженность населения к вакцинации [8].

Первыми отечественными комбинированными вакцинами, которые широко используются в рамках реализации Национального календаря профилактических прививок, являются АКДС, Бубо-Кок и АКДС-ГепВ вакцины. Для альтернативной иммунизации против дифтерии, коклюша столбняка и гепатита В применяются комбинированные вакцины импортного производства (Инфанрикс-Гекса, Пентаксим), содержащие бесклеточный коклюшный компонент, зарегистрированные в РФ в установленном порядке. Комбинированные вакцины отечественного производства, по сравнению с зарубежными, не содержат вакцину для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* тип b (Hib).

Между тем, носителями *Haemophilus influenzae* тип b являются до 40% детей в возрасте до 5 лет и около 5% взрослых. В настоящее время Hib-инфекция в России выходит на лидирующие позиции в структуре детской инфекционной заболеваемости и смертности, являясь причиной не менее трети случаев ОРЗ, до 25% случаев воспаления легких, до 55% менингитов и около 20% отитов у детей в возрасте до 5 лет [3, 6]. Надежным способом защиты от Hib-инфекции является иммунопрофилактика. В связи с доказанной безопасностью и эффективностью ВОЗ рекомендовала включить Hib-вакцину во все программы иммунизации детей раннего возраста. В настоящее время вакцинация против данной инфекции проводится в 120 странах мира [9].

В связи с этим, в Пермском филиале НПО «Микроген» была разработана новая пятивалентная вакцина АКДС-ГепВ+Hib для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b у детей.

На основании результатов доклинических исследований, установивших безопасность и высокую иммунологическую эффективность вакцины АКДС-ГепВ+Hib, она была рекомендована для клинического изучения [7].

Целью настоящего исследования явилось изучение реактогенности, безопасности и иммуногенности новой отечественной комбинированной вакцины против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша и инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b конъюгированной синтетической (АКДС-ГепВ+Hib) в сравнении с вакциной АКДС-Геп В в сочетании с вакциной Хиберикс® (Hiberix®).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактогенность, безопасность и иммуногенность вакцины АКДС-ГепВ+Hib производства Пермского филиала НПО «Микроген» были изучены в многоцентровом (Пермский государственный медицинский университет и Детская городская больница № 10, Екатеринбург) простом слепом сравнительном рандомизированном клиническом исследовании. Исследование проводилось

в соответствии с этическими нормами и требованиями, регламентированными Хельсинской декларацией и Надлежащей клинической практикой (ICHGCP).

Критериями включения в исследование явились: здоровые дети обоего пола в возрасте от 6 месяцев до 6 месяцев 29 дней; наличие подписанного и датированного информированного согласия одного из родителей ребенка на участие в клиническом исследовании; наличие двукратной вакцинации против гепатита В моновакциной (в первые 12 ч после рождения и в возрасте 1 мес.); двукратной вакцинации вакциной АКДС в возрасте 3 и 4,5 месяцев и двукратной вакцинации против гемофильной инфекции в возрасте 3 и 4,5 месяцев.

Критериями невключения в исследование явились: наличие у детей аллергических реакций к компонентам вакцины или на любую предшествовавшую вакцинацию, а также на пекарские дрожжи; сильные реакции в первые двое суток после предыдущей вакцинации; афебрильные или фебрильные судороги в анамнезе; бронхиальная астма любой этиологии; системные заболевания соединительной ткани; прогрессирующие заболевания нервной системы; энцефалопатия в анамнезе, развившаяся после введения любой вакцины, содержащей антигены *Bordetella pertussis*; хирургическая или функциональная аспления; выраженные врожденные дефекты или серьезные хронические заболевания; соматические заболевания в стадии суб- и декомпенсации; острые инфекционные заболевания на момент включения в исследование или если прошло меньше 4 недель после выздоровления; лейкоз и острые лихорадочные состояния любой этиологии; онкологические заболевания; желтая лихорадка или положительные реакции на ВИЧ-инфекцию, сифилис, гепатиты В и С; иммуносупрессивные или иммунодефицитные состояния; эпилепсия с частыми припадками, фебрильными судорогами; диабет, тиреотоксикоз и другие заболевания эндокринной системы; экзема; а также дети, которые длительно принимали (более 14 дней) иммунодепрессанты или иммуномодулирующие препараты, иммуноглобулины и препараты крови в течение 6 месяцев, предшествующих исследованию.

По результатам клинико-лабораторного скрининга были отобраны 160 детей в возрасте от 6 месяцев до 6 месяцев 29 дней, которые были рандомизированы на 2 группы. Дети 1 группы (группа наблюдения, n=80) были привиты вакциной АКДС-ГепВ+Ниб, дети 2 группы (группа сравнения, n=80) вакциной АКДС-ГепВ в сочетании с вакциной Хиберикс®.

Вакцина АКДС-ГепВ+Ниб для профилактики гепатита В, дифтерии, коклюша, столбняка и инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, является комплектом из 2 компонентов: АКДС-ГепВ компонента (суспензия для внутримышечного введения) и Ниб компонента (лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения). АКДС-ГепВ компонент вакцины представляет собой смесь убитых формальдегидом коклюшных микробов 1 фазы (10 млрд) и сорбированных на геле алюминия гидроксида дифтерийного анатоксина (15 Lf в дозе), столбнячного анатоксина (5 Lf в дозе) и рекомбинантного дрожжевого поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) (5 мкг в дозе). Ниб-компонент представляет собой полирибозилрибитола фосфат, конъюгированный со столбнячным анатоксином (10 мкг в дозе).

Препаратом сравнения явилась вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная (АКДС-Геп В) в сочетании с вакциной для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b,

Хиберикс® (Hiberix®). Вакцина АКДС-ГепВ представляет смесь убитых формальдегидом коклюшных микробов 1 фазы (10 млрд) и сорбированных на геле алюминия гидроксида дифтерийного (15 Lf в дозе) и столбнячного анатоксинов (5 ЕС) и рекомбинантного дрожжевого поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) (5 мкг в дозе).

Вакцина Хиберикс® (Hiberix®) представляет собой капсульный полисахарид *Haemophilus influenzae* тип b (10 мкг), конъюгированный со столбнячным анатоксином (25 мкг). Вакцины АКДС-ГепВ и Хиберикс® вводились согласно утвержденным инструкциям по применению. Вакцина АКДС-ГепВ+Hib вводилась внутримышечно в передненаружную область бедра в дозе 0,5 мл.

Реактогенность вакцин оценивали по наличию местных и общих поствакцинальных реакций, степени их выраженности и продолжительности. Местные реакции оценивали по величине участка гиперемии, отеку в месте введения препарата и болезненности, системные реакции — по степени повышения температуры тела и выраженности симптомов интоксикации (повышенная утомляемость, беспокойство, сонливость, потеря аппетита и др.). Оценка выраженности поствакцинальных местных и системных реакций проводилась по следующим критериям: слабая степень выраженности реакции — гиперемия диаметром до 50 мм или инфильтрат диаметром до 25 мм, гипертермия от 37,0°C до 37,5°C, наличие слабовыраженных симптомов интоксикации; средняя степень выраженности — гиперемия диаметром более 50 мм или инфильтрат диаметром 26 — 50 мм, гипертермия от 37,6°C до 38,5°C, симптомы интоксикации, заметно нарушающие нормальную ежедневную деятельность; сильная реакция — инфильтрат более 50 мм в диаметре, температура более 38,6°C, симптомы, препятствующие нормальной ежедневной деятельности.

Активное наблюдение за привитыми проводили в течение 7 дней в условиях поликлиники. На 7 день после вакцинации родители пациентов получали дневник самонаблюдения, в который с 8 по 30 день вносили данные об общем состоянии ребенка, температуре тела, наличии поствакцинальных реакций, осложнений и нежелательных явлений.

Безопасность вакцины оценивали по показателям общего и биохимического анализа крови, содержанию IgE в динамике перед вакцинацией и на 31 сутки после введения вакцины.

Иммуногенную активность оценивали по содержанию специфических антител в сыворотках крови детей до и на 31 день после иммунизации в отношении каждого антигена, входящего в состав вакцины, с помощью следующих зарегистрированных и разрешенных к применению в РФ тест-систем: «Ифа Анти-ДС» и «МикРАТ-HBs» (НПО «Микроген»), диагностикум коклюшный жидкий для регистрации агглютинации (АООТ «Биомед» им. И.И. Мечникова), тест-система иммуноферментная для определения IgG к полирибозилрибитолфосфату *Haemophilus influenzae* тип b («IBL-International», Гамбург Германия). Рассчитывали уровень сероконверсии (%), уровень серопротекции (%), средние геометрические титры антител (СГТ), фактор сероконверсии. За уровни защитных антител принимались следующие титры: при коклюше — не ниже 1:160; дифтерии — не ниже 0,03 МЕ/мл; столбняке — не ниже 0,01 МЕ/мл; гепатите В — не ниже 0,01 МЕ/мл; Hib-инфекции — не ниже 0,15 мкг/мл.

Статистический анализ проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Достоверность различий оценивали при помощи компьютерной программы Statistica (версия 6.0) с использовани-

ем теста t-распределения Стьюдента и Хи-квадрата. Уровень статистической значимости (вероятность получения ошибки) в 95,0% расценивали как наличие статистической значимости между двумя явлениями с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Для создания базы данных была применена программа MSExcel. При анализе полученных результатов определяли средние величины и стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Местные реакции как у детей группы наблюдения, так и в группе сравнения проявлялись в виде гиперемии, отечности, инфильтрата и болезненности в месте введения препарата (табл. 1). Все местные реакции были слабовыраженными, и только у одного ребенка, привитого вакциной АКДС-ГепВ+Ниб, была выявлена местная реакция средней степени выраженности.

Системные реакции как в группе наблюдения, так и в группе сравнения были представлены лихорадкой от 37,2°C до 38,5°C, беспокойством, сонливостью и потерей аппетита. Большинство системных реакций были слабой степени выраженности, за исключением 3 детей из группы наблюдения и 2 детей из группы сравнения, у которых системные реакции характеризовались средней степенью выраженности ($\chi^2=0,891$, $p=0,345$).

Структура клинических проявлений местных и системных поствакцинальных реакций в сравниваемых группах была однотипна, за исключением отечности в месте введения препарата, которая возникла у 4 детей группы наблюдения, тогда как в группе сравнения данного проявления местной поствакцинальной реакции зарегистрировано не было ($\chi^2=4,103$ $p<0,05$). Продолжительность поствакцинальных реакций колебалась от нескольких часов до 7 суток в обеих группах, все реакции купировались самостоятельно и не требовали применения медикаментозной терапии.

В поствакцинальный период было зарегистрировано 6 нежелательных явлений, не связанных с вакцинацией, которые были расценены нами как присоединение интеркуррентных заболеваний. Статистически достоверных различий в частоте нежелательных явлений в группах наблюдения и сравнения выявлено не было ($\chi^2=2,771$, $p=0,096$). Все нежелательные явления разрешились самостоятельно без применения медикаментозной терапии в обеих группах. Серьезных нежелательных явлений зарегистрировано не было.

Таблица 1. Поствакцинальные реакции на введение АКДС-ГепВ+Ниб и АКДС-ГепВ+Хиберикс

Поствакцинальные реакции	Количество детей				χ^2
	АКДС-ГепВ+Ниб (n=80)		АКДС-ГепВ+Хиберикс (n=80)		
	Абс.	%±m	Абс.	%±m	
Отсутствие реакций	63	78,8±4,6	58	72,5±5,0	—
Наличие реакций	17	21,2±4,6	22	27,5±5,0	0,848 (p=0,357)
	Местные реакции				
Гиперемия	10	12,5±3,7	11	13,8±3,9	0,055 (p>0,05)
Отечность	4	5,0±2,4	—	—	4,103 (p<0,05)
Инфильтрат	2	2,5±1,8	1	1,3±1,2	0,340 (p>0,05)
Болезненность	1	1,3±1,2	4	5,0±2,4	1,858 (p>0,05)
	Системные реакции				
Повышение температуры	8	10,0±3,4	11	13,8±3,9	0,538 (p>0,05)
Сонливость	2	2,5±1,8	2	2,5±1,8	0,0 (p>0,05)
Беспокойство	1	1,3±1,2	—	—	1,006 (p>0,05)
Потеря аппетита	1	1,3±1,2	1	1,6±1,2	0,0 (p>0,05)

Таблица 2. Иммуногенность вакцины АКДС-ГепВ+Ніб к отдельным компонентам препарата

Компоненты	АКДС-ГепВ+Ніб (n=80)	АКДС-Геп В +Хиберикс® (n=80)
Дифтерийный, СГТ, МЕ/мл	0,79 [0,60—1,03]	0,82 [0,60—1,12]
Уровень серопротекции, %	100,00	98,75
Уровень сероконверсии, %	80,00	82,50
Фактор сероконверсии	6,6	6,3
Столбнячный, СГТ, МЕ/мл	0,85 [0,64—1,14]	0,90 [0,67—1,20]
Уровень серопротекции, %	100,00	100,00
Уровень сероконверсии, %	78,75	83,75
Фактор сероконверсии	5,7	6,4
Гепатитный, СГТ, мМЕ/мл	510,73 [326,16—799,73]	396,36 [256,77—612,46]
Уровень серопротекции, %	100,00	100,00
Уровень сероконверсии, %	75,00	67,50
Фактор сероконверсии	14,0*	5,0
Коклюшный, СГТ (величина, обратная разведению)	215,34 [155,28—298,64]	215,34 [150,03—309,09]
Уровень серопротекции, %	70,00	73,75
Уровень сероконверсии, %	72,50	80,00
Фактор сероконверсии	4,3	4,3
ХИБ,		
Уровень серопротекции, %	100	100
0,15 мкг/мл		
1,0 мкг/мл	80,0	82,5
СГТ, мкг/мл	4,89 [3,14—7,61]	7,42 [4,81—11,46]
Уровень сероконверсии, %	60	67,5
Фактор сероконверсии	3,1	6,1

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с группой 2.

Сравнительная оценка результатов общего и биохимического анализа крови в группах привитых АКДС-ГепВ+Ніб и АКДС-ГепВ в сочетании с вакциной Хиберикс® в динамике наблюдения не выявила достоверных различий. Большинство показателей находились в пределах нормальных значений. Исключение составил уровень креатинина, содержание которого было ниже нормативного значения у большинства детей как первой, так и второй группы, обусловленное возрастными особенностями обменных процессов в организме детей первого года жизни.

Кроме того, в обеих группах в динамике наблюдения средние значения показателей АЛат и АСаТ снизились в 1,2 — 1,3 раза, а уровень непрямого билирубина, наоборот, повысился в 1,1 раза, что также связано с особенностями обменных процессов детей до 1 года и введением первого прикорма. С введением прикорма связан и повышенный уровень содержания глюкозы в крови отдельных детей. Увеличения содержания IgE в сыворотке крови в процессе иммунизации выявлено не было. Показатели общего анализа мочи находились в пределах нормативных значений и не изменились в динамике наблюдения.

Анализ содержания специфических антител в сыворотках крови детей на 31 день после вакцинации показал высокую иммуногенность вакцины АКДС-ГепВ+Ніб (табл. 2).

Уровень сероконверсии и серопротекции ко всем компонентам вакцины у детей, привитых АКДС-ГепВ+Ніб, был высоким и не отличался от таковых в группе сравнения ($p > 0,05$).

Наиболее выраженный рост средней геометрической титра антител (в 14 раз) был выявлен на гепатитный компонент вакцины АКДС-ГепВ+Ніб, что достоверно выше, чем при иммунизации вакциной АКДС-ГепВ в сочетании

с вакциной Хиберикс® ($p < 0,05$). К дифтерийному, столбнячному, коклюшному и Hib-компонентам вакцины достоверных различий в кратности нарастания титров антител в процессе иммунизации не выявлено.

Отсутствие статистически значимых различий в уровнях серопротекции, сероконверсии, а также средней геометрической титров антител между исследуемыми группами свидетельствует о сопоставимости вакцины АКДС-ГепВ+Hib по показателям иммуногенности с используемыми в России вакцинами АКДС-ГепВ и Хиберикс®.

Таким образом, полученные данные доказывают хорошую переносимость, слабую реактогенность, высокий профиль безопасности и выраженную иммуногенную активность отечественной комбинированной вакцины АКДС-ГепВ+Hib.

Результаты многоцентрового простого слепого сравнительного рандомизированного клинического исследования позволяют рекомендовать вакцину АКДС-ГепВ+Hib для регистрации на территории Российской Федерации для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* тип b у детей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Комбинированные вакцины, включающие цельноклеточные антигены *Bordetella pertussis*, дифтерийный и столбнячный анатоксины (АКДС-вакцина), начали применяться в программах массовой иммунизации с 60-х годов прошлого века. Их широкое использование позволило значительно снизить заболеваемость и смертность от этих инфекционных заболеваний во всех странах мира. Однако применение комбинированных вакцин, содержащих цельноклеточный коклюшный компонент, нередко сопровождалось поствакцинальными реакциями, что и обусловило разработку комбинированных вакцин, содержащих бесклеточный коклюшный компонент (БКВ) и их использование с начала 90-х годов в рамках Национальных календарей профилактических прививок большинства развитых стран [12]. В многоцентровых клинических испытаниях БКВ демонстрировали профилактическую эффективность от 51 до 86% [4]. Однако после многолетнего применения БКВ на фоне высокого охвата детского населения прививками наблюдается рост заболеваемости коклюшной инфекцией, которая в ряде стран (США, Австралия) приняла характер эпидемии [Althouse V.M. et al., 2015]. Согласно заключению ВОЗ, именно бесклеточная коклюшная вакцина является одной из основных причин увеличения заболеваемости коклюшем в странах, использовавших ее для первичного вакцинального комплекса. Это связано с тем, что цельноклеточные коклюшные вакцины (подобно естественной инфекции) стимулируют выработку как гуморального иммунитета (ответа по Th2-типу), так и клеточного иммунитета (ответа по Th1-типу), а бесклеточные коклюшные вакцины — только ответа по Th2-типу [10, 11]. Формирование иммунного ответа по Th1-типу обеспечивает более напряженный и продолжительный иммунитет по сравнению с иммунным ответом по Th2-типу. В связи с этим, по мнению ряда авторов, бесклеточные коклюшные вакцины не всегда формируют полноценный продолжительный иммунный ответ у детей до пятилетнего возраста [1, 2, 13].

Таким образом, согласно заключению экспертов ВОЗ, комбинированные вакцины на основе АКДС остаются основными (базовыми) препаратами для проведения первичного вакцинального комплекса против коклюша. Переход от цельноклеточных к бесклеточным вакцинам для первичной вакцинации можно рассматривать только при условии обеспечения дополнительной бу-

стерной вакцинации детей более старшего возраста, подростков и взрослых, а также вакцинации беременных женщин [5].

В настоящее время во всем мире доступен широкий ряд детских многокомпонентных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В, Hib-инфекции и полиомиелита [Plotkin S.A., 2013]. К сожалению, перечень отечественных комбинированных вакцин ограничен тремя вакцинами: АКДС, АКДС-ГепВ и Бубо-Кок. В условиях курса на импортозамещение разработка новой отечественной пятивалентной вакцины АКДС-ГепВ+Hib, обладающей высоким профилем безопасности и выраженной иммуногенной активностью, позволяет рекомендовать ее для массового применения в рамках Национального календаря прививок в качестве базового препарата для иммунизации детей в 6 месяцев, привитых в роддоме против гепатита В, и двукратно (в 4,5 и 6 месяцев) для вакцинации детей, не привитых в роддоме против гепатита В. Использование новой комбинированной вакцины позволит не только уменьшить стрессовую нагрузку на прививаемых, но и более успешно реализовать принцип своевременности иммунизации детей против дифтерии, коклюша, столбняка, гепатита В и Hib-инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева И.А. Микробиологический надзор за качеством коклюшного компонента комбинированных вакцин. Автореф. дисс. д-ра мед.наук, М., 2015.
2. Алексеева И.А., Чуприна Р.П., Борисова В.Н. Сравнительный анализ безопасности и эффективности отечественных и зарубежных комплексных вакцин, содержащих цельноклеточную коклюшную вакцину. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012, 3 (64): 48-54.
3. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. В.В. Зверев, Б.Ф. Семенов, Р.М. Хаитов (ред.). М., ГЭОТАР-Медиа, 2011.
4. Вакцины против коклюша: документ по позиции ВОЗ — октябрь 2010. *Еженедельный эпидемиологический бюллетень*. 2010, 40 (85): 385-400. http://www.who.int/immunization/documents/PP_Pertussis_Nov_2010_RU.pdf.
5. Вакцины против коклюша: документ по позиции ВОЗ — август 2015. *Еженедельный эпидемиологический бюллетень*. 2015, 35 (90): 433-460. http://www.who.int/immunization/policy/position_papers/pp_pertussis_august2015_ru.pdf?ua=1.
6. Николаев М.К., Платонов А.Е. Инфекция, вызываемая *Haemophilus influenzae* серотипа b (Hib), и перспективы ее вакцинопрофилактики в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2009, 4: 125-133.
7. Николаева А.М., Петровских В.П., Соснина О.Ю., Белякова О.В., Вязникова Т.В., Афанасьева Т.М. Доклинические исследования новой пятикомпонентной вакцины АКДС-Геп В+Hib. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2013, 3 (47): 41-44.
8. Таточенко В.К. Комбинированные вакцины в практике педиатра: когда коклюшная прививка в радость! *Педиатрическая фармакология*. 2012, 9 (4): 26-35.
9. Chandran A., Watt J.P., Santosh M. *Haemophilus influenzae* vaccines. Plotkin S.A. et al. (ed.). *Vaccines*. Elsevier Inc., 2013, p. 167-183.
10. Lavigne M.V., Castro M., Mateo N. et al. Whole-cell *Bordetella pertussis* vaccine component modulates the mouse immune response to an unrelated soluble antigen. *Microbes Infect*. 2002, 4: 815-820.
11. Mills K.H., Ryan M., McGuirk P. et al. The immunology of *Bordetella pertussis* infection. *Biologicals*. 1999, 27: 77.
12. Plotkin S.A., Liese J., Madhi S.A. et al. A DTap-IPV//PRP~T vaccine: a review of 16 years' clinical experience. *Expert Review of Vaccines*. 2011, 10 (7): 981-1005.
13. Strathdee S.A., Loughlin A.M. *Vaccines: past, present, and future*. Nelson K.E., Williams C.M., Graham N.M.H. (ed.). *Infectious disease epidemiology*. Gaithersburg (MD): Aspen Publishers Inc., 2001, p. 255-280.

Контактная информация: Фельдблюм Ирина Викторовна, д.м.н., проф., 614000, Пермь, Петропавловская, 26, р.т. (342)218-16-68

Л.П.Базанова, Е.Г.Токмакова, Г.А.Воронова, С.В.Балахонов

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИДНОГО СОСТАВА *YERSINIA PESTIS* НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ В ОРГАНИЗМЕ БЛОХ С РАЗНОЙ ВЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Анализ влияния плазмидного состава возбудителя чумы на формирование биопленки *in vivo* и смертность блох-переносчиков с разной векторной активностью в эксперименте. *Материалы и методы.* Использованы три штамма *Yersinia pestis*: вирулентные И-3230 (pYT, pYV, pYP) и И-2638 (pYT, pYV, pYP, pTP 33) и селекционированный от него авирулентный изогенный клон И-3480, утративший две плазмиды (pYV, pYP). Искусственно инфицировали блох трех видов: 477 особей *Xenopsylla cheopis* (высокоактивный переносчик), 441 — *Citellophilus tesquorum* (активный переносчик), 519 — *Frontopsylla luculenta* (малоактивный переносчик). Особенности формирования в организме блох биопленки *Y. pestis* оценивали по доле особей с бактериальными «глыбками» и «блоками» за подкормку. Смертность насекомых определяли по доле мертвых при каждой подкормке. *Результаты.* У всех трех видов блох, зараженных штаммами возбудителя, имеющими дополнительную плазмиду pTP33 (И-2638 и И-3480), отмечено увеличение числа особей с различными формами биопленки по сравнению с трехплазмидным штаммом И-3230. У *X. cheopis* это происходило за счет блокированных насекомых, у *C. tesquorum* — преимущественно за счет блох, содержавших «глыбки», у *F. luculenta* определялось полностью эктопаразитами с «глыбками». Доля погибших за подкормку *X. cheopis* и *C. tesquorum* была выше среди эктопаразитов, инфицированных штаммом И-3230, а *F. luculenta* — И-2638. *Заключение.* Штаммы *Y. pestis*, обладавшие дополнительным репликоном pTP33, образовывали биопленку у зараженных насекомых чаще и большего размера, чем штамм классического трехплазмидного варианта. Влияние плазмидного состава штаммов на смертность зараженных ими блох зависело от вида переносчика.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 76—83

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, плазмидный состав, блохи, биопленка, смертность переносчиков

Л.П.Базанова, Е.Г.Токмакова, Г.А.Воронова, С.В.Балахонов

INFLUENCE OF *YERSINIA PESTIS* PLASMID CONTENT ON BIOFILM FORMATION IN FLEAS WITH DIFFERENT VECTOR ACTIVITY

Irkutsk Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Influence of the plague agent plasmid content on biofilm formation *in vivo* and death rate of fleas-vectors with different vector activity in experiment were analyzed. *Materials and methods.* Three *Yersinia pestis* strains: virulent I-3230 (pYT, pYV, pYP) and I-2638 (pYT, pYV, pYP, pTP 33), and its selected avirulent isogenic clone I-3480 lacking two plasmids (pYV, pYP) were used. Three species of fleas were artificially infected: 477 individuals of *Xenopsylla cheopis* (a highly active vector), 441 — *Citellophilus tesquorum* (an active vector), 519 — *Frontopsylla luculenta* (a low-active vector). The peculiarities of *Y. pestis* biofilm formation in fleas were estimated by a portion of individuals with bacterial «conglomerates» and «blocks» for a feeding. Death rate of the insects was defined by the percent of the dead fleas at each feeding. *Results.* All three flea species infected by *Y. pestis* strains carrying an additional plasmid pTP33 (I-2638 and I-3480) demonstrated the increase of the individual number with various biofilm forms in comparison with the three-plasmid strain I-3230. In *X. cheopis* it occurred due to the blocked insects, in *C. tesquorum* — mainly due to the fleas containing «conglomerates», in *F. luculenta* it was completely connected with ectoparasites with «conglomerates». A share of *X. cheopis* and *C. tesquorum* died at a

feeding was higher in ectoparasites infected with I-3230 strain and *F. luculenta* — infected by I-2638. *Conclusion.* *Y. pestis* strains possessing an additional replicon pTP33 formed a biofilm in the infected insects more often and larger size than a classical three-plasmid variant. Influence of the strain plasmid content on death rate of the infected fleas depended on a vector species.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 76—83

Key words: *Yersinia pestis*, plasmid content, fleas, biofilm, death rate of vectors

ВВЕДЕНИЕ

Патогенные микроорганизмы способны формировать биопленку, что обеспечивает их выживание, сохранение и распространение в окружающей среде. Возбудитель чумы также формирует биопленку, которая защищает бактериальные клетки от утилизации при попадании в организм блох [12]. Наличие таких структур в организме блох выявляли в форме «блоков» и «глыбок» из клеток *Y. pestis*, заключенных в капсулу [8, 9]. Образование внеклеточной биопленки в организме блох обеспечивает реализацию трансмиссивной передачи возбудителя и долговременную персистенцию *Y. pestis* [Eisen R. J., Gage K.L., 2009]. Длительность персистенции зависит также от жизнедеятельности инфицированных блох (способности питаться и продолжительности жизни). Генетические детерминанты вирулентности *Y. pestis* имеют внехромосомную локализацию. Изучение роли плазмид в реализации патогенных свойств *Y. pestis* позволяет на качественно новом уровне подойти к выяснению механизмов формирования популяций возбудителя в условиях конкретных очагов, к проблеме сохранения бактерий в межэпизоотический период. Сравнительный анализ плазмидного состава возбудителя чумы показал, что профили плазмид штаммов *Y. pestis*, изолированных в одном природном очаге (Сайлюгемском, Тувинском, Забайкальском, Хурхинском), отличаются стабильностью вне зависимости от источника и срока выделения. Установлена особенность штаммов *Y. pestis*, циркулирующих на территории Тувинского природного очага, заключающаяся в наличии дополнительной плазмиды pTP33 с молекулярной массой ~22 МД [3]. Полная нуклеотидная последовательность четвертой маркерной плазмиды, специфической для тувинских штаммов, определена, но ее функциональная роль только предполагается [1, 10]. Значение отдельных плазмид, определяющих основные факторы вирулентности *Y. pestis*, для существования возбудителя в блохе-переносчике оценивалось на моделях *Xenopsylla cheopis* [6, 13] и *Frontopsylla luculenta* [11].

Цель исследований — изучение в эксперименте и анализ влияния плазмидного состава возбудителя чумы на формирование биопленки *in vivo* и смертность блох-переносчиков с разной векторной активностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментального исследования использованы три штамма *Y. pestis*: вирулентный трехплазмидный штамм И-3230, изолированный в Монголии (Хэнтейский аймак, Омнодэлгэр сомон), и референтный для Тувинского природного очага чумы штамм И-2638, имеющий четыре плазмиды (pYT, pYV, pYP, pTP33), а также селекционированный от него авирулентный изогенный клон И-3480, утративший две плазмиды (pYV, pYP). Элиминация плазмид pYV, pYP из исходного штамма описана ранее [Балахонов С.В. и др., 2004].

Блох заражали искусственно на биомембране. Заражающую смесь готовили из равных частей 2 млрд суспензии двухсуточной агаровой культуры, выращенной при 28°C, и дефибринированной крови морской свинки. Исходная зараженность насекомых составляла 80 — 100%. В качестве прокормителя использовали беспородных мышей. Подкормки блох проводили через 2 — 3 суток в течение 3 часов. Между подкормками их содержали в прокаленном песке при температуре 18 — 20°C и относительной влажности 87 — 90%. В каждом опыте проведено не менее 8 подкормок инфицированных эктопаразитов. В опыты взяты инсектарные культуры трех видов блох, представителей по В.С. Вашенок [5] разных категорий как переносчиков возбудителя чумы: *Xenopsylla cheopis* — высокоактивный переносчик; *Citellophilus tesquorum* — активный переносчик; *Frontopsylla luculenta* — малоактивный переносчик. Лабораторная популяция *X. cheopis* происходит от имаго, полученных из Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб». Начало *F. luculenta* положили эктопаразиты из Юго-Восточного Забайкалья (падь Крементуй, район Торейских озер). Блохи собраны из гнезд даурского суслика. Началом инсектарной культуры *C. tesquorum* послужили насекомые из Каргинской популяции Тувинского природного очага чумы, собранные из гнезд длиннохвостого суслика. Всего использовано блох: 477 (361 ♀ и 116 ♂) *X. cheopis*, 441 (272 ♀ и 169 ♂) *C. tesquorum*, 519 (412 ♀ и 107 ♂) *F. luculenta*. Особенности формирования в организме блох биопленки *Y. pestis* с различным плазмидным составом оценивали по доле особей с бактериальными «глыбками», полными и частичными «блоками» за подкормку. Смертность насекомых определяли по доле мертвых имаго при каждой подкормке. Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартных методов [7] с применением программы Excel. Влияние различных факторов (штамм *Y. pestis*, вид блох) на изучаемые показатели оценивали с помощью одно- и двухфакторного дисперсионного анализов. Различия между двумя группами по средним показателям оценивались с применением критерия Стьюдента, по изменчивости — F-критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием методов трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии на примере блохи *X. cheopis* отмечено, что по две и более бактериальные клетки, окруженные, как правило, остатками разрушенных форменных элементов крови, осаждаются в лакунах «акантов» преджелудка, что приводит в последующем к формированию «микрocolоний». Данное морфологическое образование в экстрацеллюлярной матриксной оболочке определено как способность возбудителя чумы формировать в организме блохи биопленку [8]. Отмечено различие морфологических форм *Y. pestis* в конгломератах с разной степенью агрегированности в организме *C. tesquorum altaicus*. Так, в мазках из содержимого желудочно-кишечного тракта перезимовавших блох с «глыбками» прослеживается полиморфизм клеток *Y. pestis*: палочковидные и шаровидные формы. Встречаются клетки необычной формы — утолщенные с обоих концов (гантелевидные). Шаровидные формы бактерий бледно окрашены и имеют средние размеры (1,5 — 2 мкм). У «блокированных» блох отмечены только шаровидные очень мелкие (0,2 — 0,5 мкм), бледно окрашенные формы бактерий единичные и в конгломератах [9].

В проведенных нами опытах установлены различия как во времени образования первых конгломератов *Y. pestis* после инфицирования блох, так и в их визуализируемой форме («глыбки» или «блоки»). Так, у *X. cheopis* — высокоактивного переносчика — штаммы, имеющие плазмиду рТР33 (И-2638 и И-3480), формировали «блоки» желудка уже при первой подкормке после заражения блох (на вторые сутки), а бактериальные «глыбки» — после второй подкормки

(на пятые сутки). В то время как трехплазмидный штамм, не несущий эту плазмиду, формировал сначала «глыбки» на пятые сутки, а затем «блоки», причем только на 11 сутки после инфицирования. У активного переносчика *C. tesquorum*, инфицированных штаммами И-2638 и И-3480, формирование первых «глыбок» зарегистрировано при первой подкормке, а «блоков» — при третьей (И-3480) и пятой (И-2638) подкормках. Образование первых бактериальных «глыбок» штаммом И-3230 отмечено после второй подкормки, «блоков» после пятой (16 сутки). У малоактивного переносчика *F. luculenta* все исследуемые штаммы формировали «глыбки» с первой подкормки до конца опыта. Блокированные блохи выявлены только в двух случаях в конце опыта: при инфицировании штаммами И-2638 и И-3480 (по одному самцу на 29 и 25 сутки). Результаты наблюдений за формированием конгломератов (био пленки) *Y. pestis* с различным плазмидным составом в организме блох трех видов, полученные в наших опытах, отражены в табл. 1. Приведены данные визуальной регистрации конгломератов различных форм при просмотре блох после подкормки, из которых следует, что самые низкие показатели частоты формирования био пленки всех регистрируемых образований отмечали у блох, инфицированных трехплазмидным штаммом И-3230.

В то же время, у всех трех видов блох заражение штаммами возбудителя, имеющими дополнительную плазмиду рТР33 (И-2638 и И-3480), приводило к увеличению количества особей с различными формами био пленки по сравнению с трехплазмидным штаммом. Причем у *X. cheopis* это происходило за счет блокированных насекомых, у *C. tesquorum*, в первую очередь, было связано с нарастанием количества блох, содержавших компактные свободноплавающие «глыбки» и, в меньшей степени, блокированных блох, у *F. luculenta* определялось полностью эктопаразитами с «глыбками» возбудителя. Представляет интерес, что изогенный мутантный вариант штамма *Y. pestis* И-3480, утративший две плазмиды (pCad, pPst), в условиях опыта по способности формировать био пленку у блох либо не отличался (*X. cheopis*, *F. luculenta*) от полноценного штамма И-2638, имеющего четыре плазмиды (pCad, pPst, pFra, pТР33), либо отличался (*C. tesquorum*), но значительно

Таблица 1. Формирование конгломератов *Y. pestis* с различным плазмидным составом в организме блох трех видов

Вид блохи	Штамм <i>Y. pestis</i>	Доля блох в среднем за подкормку с конгломератами <i>Y. pestis</i> , %			
		«блоками»	частичными «блоками»	«глыбками»	конгломератами всех форм
<i>X. cheopis</i>	И-2638	5,4±1,78	5,9±0,94	3,1±0,73	14,3±2,85
	И-3480	7,8±1,91	6,0±1,13	3,8±0,66	17,5±2,61
	И-3230	1,7±0,66	0,8±0,28	8,9±4,18	11,4±4,52
<i>C. tesquorum</i>	И-2638	0,8±0,43	1,6±0,76	44,4±4,64	46,8±5,35
	И-3480	0,2±0,16	0,2±0,17	22,1±3,44	22,6±3,51
	И-3230	0,3±0,31	0,2±0,16	7,0±1,63	7,4±1,77
<i>F. luculenta</i>	И-2638	—	0,2±0,19	18,0±1,78	19,3±1,22
	И-3480	0,1±0,13	—	28,2±2,15	28,5±2,17
	И-3230	—	—	6,9±1,02	6,9±1,02

Примечание. Жирным шрифтом выделены самые низкие показатели частоты формирования конгломератов в организме данного вида блохи.

меньше, чем трехплазмидный штамм. Необходимо добавить, что формирование биопленки разными штаммами у блох *F. luculenta* характеризовалось не только количественными, но и качественными различиями. Агрегаты, образованные штаммами, содержащими плазмиду рТР33, достигали очень крупных размеров, представляя по сути слепок с преджелудка и желудка блохи до подкормки. Скорее всего, разросшаяся биопленка в таких случаях сохраняется в блохе пожизненно, поскольку ее размеры не позволяют пройти из желудка в кишечник. У насекомых, инфицированных трехплазмидным штаммом, как правило, наблюдали небольшие одиночные образования. Таким образом, присутствие плазмиды рТР33 усиливало формирование биопленки *in vivo* вне зависимости от активности вида блох как переносчика.

Двухфакторный дисперсионный анализ показал значительное влияние на формирование конгломератов всех форм («глыбки», частичные и полные «блоки» преджелудка) факторов: «штамм» ($F=10,44$; $P<0,001$) и «вид блохи» ($F=27,65$; $P<0,001$), а также их взаимодействие ($F=12,33$; $P<0,001$). То есть взаимодействие каждого штамма с определенным видом блохи имеет свои особенности. В табл. 2 приведены результаты двухфакторного дисперсионного анализа, свидетельствующие о высокой степени достоверности влияния обоих анализируемых факторов (вид блохи, штамм *Y. pestis*) на образование всех форм биопленки в организме блох. При этом наиболее высока достоверность влияния двух факторов на формирование бактериальных «глыбок» и частичных «блоков», в то время как на блокообразование (полных «блоков») фактор «вид блохи» оказывал даже большее влияние, чем фактор «штамм».

У инфицированных блох, различающихся по векторной активности, наблюдали прямо противоположную картину в частоте формирования «глыбок» и «блоков». Так, у высокоактивных переносчиков — *X. cheopis* — показатель частоты блокообразования при заражении штаммами И-2638 и И-3480 (несущими плазмиду рТР33) выше, чем показатель частоты формирования «глыбок». В то время как у тех же блох, зараженных трехплазмидным штаммом И-3230, выше частота формирования «глыбок». У *S. tesquorum* — активного переносчика — «глыбки» формировались значительно чаще «блоков», что показано при заражении всеми тремя штаммами. У *F. luculenta* — малоактивного переносчика — все три штамма формировали в основном «глыбки». Отмечены только единичные случаи «блокообразования», причем среди блох, зараженных штаммами, имеющими плазмиду рТР33 (табл. 1).

Считается, что способность формировать биопленку в преджелудке блохи является решающей для долговременной энзоотичной персистенции *Y. pestis* [Eisen R.J., Gage K.L., 2009]. В то же время, для длительной персистенции не-

Таблица 2. Влияние вида блохи и штамма *Y. pestis* на формирование биопленки *in vivo* (двухфакторный дисперсионный анализ)

Источник вариации	«глыбки»			частичные «блоки»			полные «блоки»		
	df	MS	F	df	MS	F	df	MS	F
Вид блохи	2	2512,06	39,73***	2	122,48	47,55***	2	160,52	21,24***
Штамм	2	1373,35	21,72***	2	32,90	12,77***	2	30,33	4,02*
Взаимодействие	4	1367,81	21,63***	4	21,13	8,20***	4	28,37	3,75**
Случайная	63	63,23		63	2,58		63	7,56	
	71			71			71		

Примечание. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

маловажным фактором может служить и жизнедеятельность инфицированных блох (способность питаться и продолжительность жизни). В этой связи, мы провели анализ влияния штамма *Y. pestis*, использованного для заражения блох, на их гибель (табл. 3).

Из приведенных в табл. 3 данных видно, что доля погибших за подкормку *X. cheopis* и *C. tesquorum* была выше среди эктопаразитов, инфицированных штаммом И-3230, а *F. luculenta* — И-2638. Такая тенденция отмечена как среди самок, так и среди самцов. Аналогичные результаты получены при разных

способах учета смертности блох. Так, погибших за весь опыт в целом особей *X. cheopis* и *C. tesquorum* было также больше среди инфицированных И-3230 (30,8% ♀ и 51,9% ♂ для *X. cheopis*; 45,9% ♀ и 88,6% ♂ для *C. tesquorum*). В то время, как у *F. luculenta* большее количество погибших зарегистрировано у зараженных четырехплазмидным штаммом И-2638 (24,7% ♀ и 90,6% ♂). Таким образом, возбудитель чумы с различным плазмидным составом в неодинаковой степени подавлял жизнеспособность видов блох, использованных в опытах. Различия в смертности переносчиков, зараженных анализируемыми штаммами микроба, высоко достоверны. У *X. cheopis*, зараженных штаммом И-3230, выявлено большее количество погибших особей по сравнению как со штаммом И-2638 ($t=3,83$; $P<0,001$), так и И-3480 ($t=5,34$; $P<0,001$). У *C. tesquorum*, зараженных трехплазмидным штаммом И-3230, гибель блох также была значительно выше, по сравнению с двумя другими штаммами ($t=3,73$, $P<0,001$ для штамма И-2638; $t=3,29$, $P<0,001$ для штамма И-3480). У *F. luculenta* отмечена более высокая смертность особей обоего пола при заражении четырехплазмидным штаммом И-2638, по сравнению с инфицированными *Y. pestis* И-3230 ($t=2,32$; $P<0,05$). При сравнении со штаммом И-3480 по анализируемому показателю И-2638 вызывал гибель преимущественно самцов ($t=2,49$; $P<0,05$), у самок различия недостоверны.

Возможное патогенное действие возбудителя чумы на членистоногих, в организм которых он может попадать при кровососании, неоднократно обсуждалось в специальных монографиях [4, 5, 8]. В целом ряде экспериментальных работ выявлено значительное сокращение сроков жизни у инфицированных *Y. pestis*, но не заблокированных блох [5]. При этом прослеживается прямая связь между степенью вирулентностью штаммов *Y. pestis* для лабораторных животных и патогенностью для разных видов блох. Нами установлено влияние фактора «штамм» на смертность инфицированных блох всех использованных в опытах видов, однако действие одного и того же штамма на разные виды различалось. В опытах с классическим переносчиком *X. cheopis* и *Y. pestis* И-2638 и И-3480 не установлено различий в смертности особей, зараженных этими штаммами [6]. Сходные результаты получены и в опытах других авторов [13], использовавших тот же вид блох и изогенные варианты

Таблица 3. Смертность блох трех видов, инфицированных *Y. pestis* с различным плазмидным составом

Вид блохи	Штамм <i>Y. pestis</i>	Доля погибших в среднем за подкормку блох, %		
		♀	♂	оба пола
<i>X. cheopis</i>	И-2638	1,6±0,52	5,6±1,13	2,5±0,43
	И-3480	0,9±0,26	3,5±1,18	1,6±0,24
	И-3230	4,6±1,22	8,5±2,59	5,4±1,35
<i>C. tesquorum</i>	И-2638	4,2±1,01	10,7±2,70	6,1±0,88
	И-3480	4,6±1,47	9,4±1,77	6,5±1,30
	И-3230	6,9±3,41	21,5±6,52	10,7±3,76
<i>F. luculenta</i>	И-2638	3,9±0,79	11,3±2,12	6,8±0,83
	И-3480	2,5±0,92	8,4±2,31	4,7±0,86
	И-3230	2,5±0,98	7,5±1,87	4,3±0,71

Примечание. Жирным шрифтом выделены самые высокие показатели смертности блох данного вида.

штаммов 195/P и KIM, различающиеся по плазмидному профилю. В то же время, средняя доля погибших за подкормку *X. cheopis*, зараженных трехплазмидным штаммом И-3230, была выше, чем инфицированных двумя другими штаммами. Смертность зараженных самок *F. luculenta* не зависела от использованного штамма и подчинялась общей закономерности: более высокая в первые подкормки, во второй половине опыта снижалась в 1,5 — 2 раза. Самцы *F. luculenta*, инфицированные четырехплазмидным штаммом, погибли почти все. Лучше имаго данного вида переносили сосуществование с классическим трехплазмидным штаммом. Менее всего ухудшало состояние блох присутствие в них дефектного по плазмидам вирулентности и пестициногенности варианта, сохранившего, тем не менее, плазмиду рTP33. В то время как более высокая смертность среди *C. tesquorum*, наоборот, отмечена в группе особей, зараженных штаммом И-3230 из Монголии.

Таким образом, обнаружено, что штаммы *Y. pestis*, обладавшие дополнительным репликоном рTP33, образовывали биопленку у зараженных насекомых чаще и большего размера, чем штамм классического трехплазмидного варианта. Более крупная биопленка означает повышенную бактериальную нагрузку как в числе микробных клеток, так и в дозе вырабатываемых ими метаболитов. Учитывая многочисленные данные о негативном влиянии *Y. pestis* на организм блох-переносчиков, логично ожидать, что присутствие именно этих штаммов будет иметь наиболее выраженные отрицательные последствия для эктопаразитов. Однако не наблюдалось закономерной связи между плазмидным составом штаммов и смертностью зараженных ими блох: *F. luculenta*, происходившие из Забайкалья, чаще гибли при инфицировании четырехплазмидным штаммом из Тувы, а *C. tesquorum* из Тувинского природного очага — от трехплазмидного штамма из Хэнтейского аймака Монголии, граничащего с Забайкальским краем Российской Федерации. Ранее на примере блох двух видов и возбудителя чумы из Тувинского природного очага было показано, что частота образования биопленки выше в том случае, если штамм выделен с той же территории, что и популяция переносчика [2]. По-видимому, смертность блох имеет обратную зависимость: чем ближе территориально возбудитель, тем менее он вредоносен для насекомого.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев М.В., Балахонов С.В., Токмакова Е.Г., Половинкина В.С., Сидорова Е.А., Синьков В.В. Анализ нуклеотидной последовательности криптической плазмиды рTP33 *Yersinia pestis* из Тувинского природного очага чумы. Генетика. 2016, 9: 1012-1020.
2. Базанова Л.П., Вержуцкий Д.Б., Никитин А.Я., Токмакова Е.Г., Воронова Г.А., Хабаров А.В. Особенности взаимоотношений возбудителя чумы и блох с различных участков Тувинского природного очага. Мед. паразитол. 2006, 3: 35-38.
3. Балахонов С.В. Результаты скрининга плазмид штаммов *Yersinia pestis* из разных очагов центрально-азиатской зоны природной очаговости чумы. Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол. 1989, 4: 39-42.
4. Бибилова В.А., Класовский Л.Н. Передача чумы блохами. М., Медицина, 1974.
5. Вашенок В.С. Блохи (Siphonaptera) — переносчики возбудителей болезней человека и животных. Л., Наука, 1988.
6. Воронова Г.А., Токмакова Е.Г., Балахонов С.В., Базанова Л.П. Взаимоотношения штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом и блох *Xenopsylla cheopis* (Roths. 1903). Мед. паразитол. 2011, 2: 15-18.

7. Елисеева И.И., Юзбашев М.М. Общая теория статистики. М., Финансы и статистика, 2006.
8. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М., Медицина, 2007.
9. Маевский М.П., Базанова Л.П., Конов Н.П., Капустин Ю.М., Сахаров С.В. Изменчивость *Yersinia pestis* в организме блохи. Журн. микробиол. 1994, 3: 16-21.
10. Оглодин Е.Г., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Одинокоев Г.Н., Гусева Н.П., Бугоркова С.А., Кутырев В.В. Структурно-функциональный анализ криптических плазмид штаммов *Yersinia pestis* из двух природных очагов чумы России. Проблемы особо опасн. инф. 2015, 4: 82-85.
11. Токмакова Е.Г., Базанова Л.П., Воронова Г.А., Балахонов С.В. Особенности взаимоотношений блохи *Frontopsylla luculenta luculenta* (J. et R., 1923) и возбудителя чумы с различным плазмидным составом. Мед. паразитол. 2016, 1: 38-41.
12. Jarrett C.O., Deak E., Isherwood K.E. et al. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. Infect. Dis. 2004, 190: 783-792.
13. Hinnebusch B.J., Ficher E.R., Schwan T.G. Evaluation of the role *Yersinia pestis* plasminogen activator and other plasmid-encoded factors in temperature-dependent blockage of the flea. J. Infect. Dis. 1998, 178: 1406-1415.

Поступила 27.07.17

Контактная информация: Базанова Любовь Петровна, д.б.н., 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р.т. (3952) 23-99-76

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

О.В.Дуванова, Б.Н.Мишанькин, С.В.Титова, Л.А.Корнеева

ДЕЙСТВИЕ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА НА БИОПЛЕНКИ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Изучить действие N-ацетил-L-цистеина на биопленки холерных вибрионов разных серогрупп, выделенных из различных источников и с разной эпидемической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctxAB* и *tcpA*). *Материалы и методы.* Бактериальные культуры *Vibrio cholerae* El Tor O1 и O139 серогрупп выращивали в виде биопленок. Оценивали влияние препарата N-ацетил-L-цистеина в концентрации 0.5 — 4 мг/мл на формирование, сформированную биопленку, а также на планктонную форму. *Результаты.* Обнаружена антибактериальная активность N-ацетил-L-цистеина. Отмечено, что он влиял как на формирование, так и на уже сформированные биопленки, а также на планктонную форму у представителей *Vibrio cholerae* El Tor O1 и O139 серогрупп в концентрации 2 — 4 мг/мл, проявляя антибактериальный эффект независимо от наличия/отсутствия генов *ctxAB* и *tcpA*. *Заключение.* Выявленное антибактериальное действие препарата N-ацетил-L-цистеина в отношении биопленок холерных вибрионов указывает на целесообразность рассмотрения вопроса о возможности использования препарата в терапии случаев диареогенных заболеваний, обусловленных возбудителями II — IV групп патогенности.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 83—87

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, штамм, N-ацетил-L-цистеин

THE EFFECT OF N-ACETYL-L-CYSTEINE ON BIOFILM OF *VIBRIO CHOLERA*

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

Aim. To study the effect of N-acetyl-L-cysteine on biofilm of *V. cholerae* of different serogroups isolated from various sources and with different epidemiological significance (the presence/absence of the ctx AB genes and tcpA). *Materials and methods.* Bacterial culture of *Vibrio cholerae* El Tor O1 and O139 serogroups were grown as biofilms. We have estimated the influence of the drug N-acetyl-L-cysteine at a concentration of 0.5 — 4 mg/ml on the formation, of the formed biofilm and in planktonic form. *Results.* Discovered antibacterial activity of N-acetyl-L-cysteine. Noted that it was influenced as in the formation, of the already formed biofilm and the planktonic form, the representatives of the *Vibrio cholerae* El Tor O1 and O139 serogroups in concentrations of 2 — 4 mg/ml, showing an antibacterial effect regardless of the presence/absence of genes ctx and tcpA AB. *Conclusion.* Identified the antibacterial action of the drug N-acetyl-L-cysteine against biofilm of *V. cholerae* indicates the desirability of considering the possibility of using drug therapy in cases variety of diseases caused by causative agents II — IV groups pathogenicity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No 2, P. 83—87

Key words: *Vibrio cholerae*, strain, N-acetyl-L-cysteine

В настоящее время в России и во всем мире продолжается активный поиск лекарственных средств с высоким потенциалом воздействия на биопленки микроорганизмов. Это объясняется тем, что растущие в составе биопленки бактерии проявляют высокую устойчивость к антибиотикам и дезсредствам, создавая серьезные проблемы для здравоохранения. Стандартная терапия антибиотиками часто неэффективна, что диктует необходимость апробации новых средств, проявляющих активность в отношении биопленок, особенно патогенных микроорганизмов. Актуальным является не только разработка новых фармацевтических препаратов, но и анализ и возможность использования давно известных и хорошо себя зарекомендовавших на практике препаратов, имеющих невысокую себестоимость, доступность, расшифрованный механизм действия и возможность производства в России.

Так, на основании многочисленных экспериментальных и клинических исследований стало известно, что N-ацетил-L-цистеин (АЦЦ) ($C_5H_9NO_3S$) — ацилированная тиолсодержащая аминокислота, являющаяся одновременно предшественником L-цистеина и глутатиона, широко применяется в различных областях медицины. Препарат представлен на отечественном фармацевтическом рынке и издавна используется в качестве муколитического агента для лечения хронических заболеваний легких. Применяется он также внутривенно в виде 20% раствора в качестве антидота при отравлении парацетамолом [8], может конкурентно ингибировать утилизацию цистеина, реагировать через свою SH-группу с мембранами бактерий и подавлять у них синтез полисахарида, не влияя при этом на его структуру, замедлять образование биопленки у бактерий [5]. Обладает выраженным антиоксидантным действием, способен восстанавливать уровень клеточного глутатиона, используется при воспалениях (панкреатиты), фиброзе легких, нарушениях эндотелия сосудов, сохранении трансплантантов, а также лечении гастритов, вызванных *Helicobacter pylori* [6]. В настоящее время обсуждается применение ацетилцистеина при поражении почек, ишемической болезни сердца, ВИЧ-инфекции и других заболеваниях. Механизм его действия основан на разрыве

дисульфидных (-S-S-) связей высокомолекулярных гликопротеинов слизи, что сопровождается уменьшением вязкости. Антибактериальные свойства N-ацетил-L-цистеина характеризуются высокими значениями минимальных подавляющих концентраций (МПК), достигающих до 5 — 80 мг/мл [5], хотя имеются отдельные сообщения о повышенной чувствительности штаммов, например, псевдомонад до уровня 2 — 20 мкг/мл [7]. Низкая токсичность препарата (ЛД₅₀ для крыс при оральном применении составляет более 5 г/кг), а также хорошая переносимость позволяют длительно использовать его в высоких концентрациях и разных способах введения при лечении различных заболеваний. Как было установлено в последнее время в экспериментальных и клинических исследованиях, препарат обладает способностью уменьшать адгезию некоторых возбудителей к слизистым оболочкам, а также оказывает прямое разрушающее воздействие на внеклеточный матрикс, что позволяет рассматривать N-ацетил-L-цистеин в терапии инфекций, связанных с образованием биопленок [1]. Потенциал действия АЦЦ к настоящему времени остается не до конца изученным. Данные о влиянии N-ацетил-L-цистеина на биопленки холерных вибрионов в литературе отсутствуют. Учитывая способность препарата подавлять образование биопленок на примере *Pseudomonas aeruginosa* [10], мы провели исследование чувствительности к нему биопленок штаммов *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп.

Цель исследования состояла в изучении действия N-ацетил-L-цистеина на биопленки холерных вибрионов разных серогрупп, выделенных из различных источников и с разной эпидемической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctxAB* и *tcrA*).

При выполнении исследований использовали разные группы штаммов: 4 штамма *V. cholerae* O1 Эль Тор (*ctx+* *tcr+*), 4 дефектных по синтезу токсина и токсинорегулируемых пилей штаммов ($\Delta ctx\Delta tcr$), выделенных из воды поверхностных водоемов, 8 штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы, из которых 4 (*ctx+* *tcr+*) были выделены из клинического материала, а 4 атоксигенных ($\Delta ctx\Delta tcr$) — из проб воды поверхностных водоемов. Штаммы получали из музея живых культур Ростовского НИПЧИ, где их хранили в лиофилизированном состоянии.

В работе использовали препарат N-ацетил-L-цистеина (BioChemica, Россия). Для культивирования микроорганизмов использовали агар Мартена (рН 7.6). Получение биопленок холерных вибрионов проводили способом, описанным ранее [3]. Действие препарата N-ацетил-L-цистеина (0.5 — 4 мг/мл) анализировали по его влиянию на этапы формирования биопленки, на уже сформированные 5 — 30-суточные биопленки и планктонную культуру. Инкубацию с препаратом проводили при 20°C. Через 0, 1, 3, 6, 24, 48 часов, 5 — 14 суток инкубации осуществляли высев планктонной культуры и биопленок на пластинки агара Мартена (рН 7.7). Результаты учитывали через 24 часа по наличию или отсутствию роста холерных вибрионов.

В результате проведенного исследования обнаружено, что препарат АЦЦ влиял как на формирование, уже сформированные биопленки, а также на планктонную форму у представителей *Vibrio cholerae* El Tor O1 и O139 серогрупп в концентрации 2 — 4 мг/мл, проявляя антибактериальный эффект независимо от наличия/отсутствия генов *ctxAB* и *tcrA* (срок наблюдения до 30 дней). Концентрация АЦЦ 0.5 мг/мл не действовала на планктонную форму, формирование и на сформированную биопленку. N-ацетил-L-цистеин в концентрации 2 — 4 мг/мл влиял на планктонную и зрелые 5 — 7-суточные

био пленки, проявляя антибактериальный эффект в экспериментах *in vitro* у представителей *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп уже через 3 часа после добавления независимо от объектов выделения, наличия или отсутствия генов *ctxA* и *tcpA*. Следует отметить, что антибактериальный эффект исследуемый препарат оказывал на планктонную культуру и сформированную 30-суточную био пленку в концентрациях 4 мг/мл у штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы (*ctx+* *tcp+*/Δ*ctx*Δ*tcp*). В ходе исследования не удалось обнаружить штаммы, образующие нечувствительную к АЦЦ био пленку.

Обнаружение в ходе проведенного исследования способности препарата АЦЦ оказывать антибактериальный эффект на формирование, зрелую био пленку, а также на планктонную форму у всех взятых в исследование штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, с разной эпидемической значимостью и выделенных из различных источников расширяет наши представления о механизме его действия. Выявленная активность N-ацетил-L-цистеина в отношении био пленок холерных вибрионов указывает на целесообразность рассмотрения вопроса об использовании препарата в терапии случаев диареегенных заболеваний, обусловленных возбудителями II — IV групп патогенности.

N-ацетил-L-цистеин относится к лекарственным средствам, интерес к которым со временем не только не ослабевает, но и усиливается, так как открываются все новые области и возможности его применения.

Отсутствие в доступной литературе сведений по влиянию АЦЦ на био пленки холерного вибриона диктует целесообразность дальнейшего изучения действия этого препарата.

В связи с низкой себестоимостью и доступностью на отечественном фармацевтическом рынке, возможностью его производства в России и всё увеличивающимся спектром показаний к применению данного препарата в комплексе с его низкой токсичностью и хорошей переносимостью, а также в выявленном антибактериальном действии на био пленку холерного вибриона позволяет позиционировать N-ацетил-L-цистеин в терапии случаев диареегенных заболеваний, обусловленных возбудителями II — IV групп патогенности. Нельзя исключить и возможность N-ацетил-L-цистеина подавлять биологическую активность *ctxA* и *ctxB*-субъединиц, а также *zot*-токсина, токсинов-корегулируемых пилей и гемагглютинин/протеазы (НА/Р) холерных вибрионов, несущих в своем составе от 2 до 4 остатков цистеина, на которые и оказывает свое действие препарат. Наличие у многих бактериальных ферментов остатков цистеина объясняет возможные точки приложения N-ацетил-L-цистеина в ингибировании ряда ферментов патогенности и персистенции холерных вибрионов и других микроорганизмов.

Современные представления о роли био пленок в патогенезе инфекционных заболеваний требуют новых подходов к их диагностике и лечению. В настоящее время ведется разработка и изменение тактики антибиотикотерапии. Изучается действие новых антибактериальных препаратов на био пленки с расшифровкой механизма их действия [2].

Нельзя не согласиться с мнением Ушкаловой Е.А. [4] о том, что исследования N-ацетил-L-цистеина могут в перспективе значительно расширить показания к его применению, а проведенное изучение его влияния на био пленки, в составе которых микроб приобретает свою гиперинфекциозность [9], поможет решить ряд задач практического здравоохранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голуб А.В. Бактериальные биопленки — новая цель терапии? *Клин. микробиол. и анти-микроб. химиотер.* 2012, 1: 23-29.
2. Селянская Н.А., Титова С.В., Головин С.Н. и др. Действие антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов Эль Тор. *Журн. микробиол.* 2017, 2: 8-15.
3. Титова С.В., Кушнарева Е.В. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок in vitro с помощью нового методического подхода. *Фундаментальные исследования.* 2014, 10: 375-379.
4. Ушкалова Е. А. Ацетилцистеин в клинической практике: настоящее и перспективы. *Фармацевтика.* 2007, 17: 30-36.
5. Aslam S., Darouiche R.O. Role of antibiofilm — antimicrobial agents in control of device — related infections. *Int. J. Artif. Organs.* 2011, 34 (9): 752-758.
6. Huynh H.Q., Couper R.T., Tran C.D. et al. N-acetylcysteine, a novel treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Dis. Sci.* 2004, 49: 1853-1861.
7. Parry M.F., Neu H.C. Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro. *J. Clin. Microbiol.* 1977, 5 (1): 58 —61.
8. Prescott L.F., Illingworth R.N., Critchley J.A. et al. Intravenous N-acetylcystein : the treatment of choice for paracetamol poisoning. *Brithish Med. J.* 1979, 2: 1097-1100.
9. Tamayo R., Patimalla B., Camilli A. Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2010, 78 (8): 3560-3569.
10. Zhao T., Liu Y. N-acetylcystein inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2010, 10: 140.

Поступила 12.09.17

Контактная информация: Дуванова Ольга Викторовна, к.б.н.,
344002, Ростов-на дону, ул. Горького, 117/40, р.т. (8863)240-91-13

ОБЗОРЫ

© Т.А.СЕМЕНЕНКО, В.Г.АКИМКИН, 2018

Т.А.Семененко¹, В.Г.Акимкин²

СЕРОЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В СИСТЕМЕ НАДЗОРА ЗА ВАКЦИНОУПРАВЛЯЕМЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, ²Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

Сероэпидемиологические исследования, основанные на оценке превалентности антител в популяции, являются мощным инструментом для прогнозирования и контроля эффективности программ специфической профилактики. Наличие паспортизированной коллекции сывороток крови (банка сывороток) позволяет проводить достоверную оценку состояния популяционного иммунитета к вакциноуправляемым инфекциям; определять степень эпидемиологической опасности распространения заболеваний на отдельных территориях страны; осуществлять краткосрочное и долгосрочное прогнозирование изменения ситуации по актуальным инфекциям; научно обосновывать профилактические и противоэпидемические мероприятия в системе биологической безопасности для определенных групп населения и декретированных контингентов; обеспечивать информацией, необходимой для принятия оптимальных управленческих решений.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 87—94

Ключевые слова: сероэпидемиологические исследования, банк сывороток, надзор, вакциноуправляемые инфекции

SEROEPIDEMIOLOGY IN THE SURVEILLANCE OF VACCINE-PREVENTABLE DISEASES

¹Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, ²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Seroepidemiology is a potentially powerful tool for predicting and monitoring the effectiveness of specific prevention program using studies of antibody prevalence. The availability of a certified collection of blood serum (serum bank) allows to carry out a reliable assessment of population immunity to vaccine-preventable diseases; to determine the degree of epidemiological risk of the infection spread in various areas of the country; to implement short-term and long-term forecasting of changes in the situation on topical infections; to substantiate preventive measures in the system of biosafety for defined population groups and decreed contingents; to provide information necessary for making the optimal management decisions.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.2, P. 87—94

Key words: seroepidemiology, serum bank, surveillance, vaccine-preventable diseases

Несмотря на очевидные успехи здравоохранения в борьбе с инфекционной патологией, сохраняется возможность активизации эпидемического процесса и роста заболеваемости. В последнее десятилетие в Российской Федерации существенно расширен перечень нозологий, регистрация которых осуществляется в рамках федерального государственного статистического наблюдения; приняты меры по совершенствованию эпидемиологического надзора и повышению качества лабораторной диагностики, что оказало влияние на увеличение общего числа регистрируемых инфекционных и паразитарных заболеваний [8]. В целом, можно говорить о достаточно напряженной эпидемической ситуации в стране, поскольку ежегодно регистрируется около 30 — 40 млн случаев инфекционных заболеваний [3].

Мировой опыт здравоохранения показал, что иммунизация населения является мощным средством профилактики целого ряда инфекций и по оценкам ВОЗ позволяет ежегодно предотвращать от 2 до 3 млн случаев смерти от дифтерии, столбняка, коклюша и кори [4]. Однако медицинская и социальная значимость вакциноуправляемых инфекций остается высокой. Так, за январь-декабрь 2016 г. по сравнению с аналогичным периодом 2015 г. в Российской Федерации зарегистрирован рост заболеваемости коклюшем на 27,4%, краснухой — в 2,2 раза, эпидемическим паротитом — в 5,7 раза [15]. Федеральная служба по контролю в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека информирует, что согласно информации Европейского центра по контролю и профилактике заболеваний (ECDC), в странах европейского региона с начала 2017 г. наблюдается эпидемический подъем заболеваемости корью с общим числом пострадавших более 4000 человек. По данным эпидемиологического расследования эпидемическое распространение кори стало возможным на фоне низкого уровня иммунизации населения стран Европейского региона [10].

Направления деятельности в области организации и осуществления вакцинопрофилактики в Российской Федерации соответствуют принципам Расширенной программы иммунизации (РПИ), принятой ВОЗ в 1974 г. Стратегия и тактика РПИ базируется на признании мировым сообществом факта, что вакцинопрофилактика является наиболее эффективным и эконо-

мически доступным средством достижения здоровья во всех социальных группах развитых и развивающихся стран, прежде всего за счет снижения детской смертности и увеличения ожидаемой продолжительности жизни. По рекомендации ВОЗ для ликвидации кори, краснухи и эпидемического паротита, а также для снижения заболеваемости дифтерией и столбняком до единичных случаев и предотвращения тяжелых форм заболевания необходимо достижение и поддержание уровня охвата профилактическими прививками против указанных инфекций не менее 95% детского и не менее 90% взрослого населения [Orenstein W.A. et al., 2005].

Несмотря на значимость и простоту организации мониторинга «документированной привитости», включающей охват прививками, показатель привитости и своевременность вакцинации, ее ценность весьма условна и формальна, поскольку не отражает главного результата: фактической защищенности различных возрастных и социальных групп от той или иной инфекции. Недостаточная объективность оценки качества иммунопрофилактики только по документации может быть связана с несоблюдением «холодовой цепи» при транспортировке препарата, низкой эффективностью вакцины, нарушением схем иммунизации, наличием в популяции лиц, не способных к выработке полноценного иммунного ответа (нон-респондеры) и других причин [13]. В связи с этим, особую значимость в условиях гетерогенности прививаемого населения приобретает слежение за состоянием популяционного и индивидуального специфического иммунитета с помощью серологического мониторинга, являющегося компонентом подсистемы информационного обеспечения системы эпидемиологического надзора за вакцинопрофилактикой [2, 14].

Сероэпидемиологические исследования, основанные на сборе сывороток крови и оценке распространенности антител в популяции, являются мощным инструментом для прогнозирования и контроля эффективности программ специфической профилактики [21, 23]. Достоверность использования серологических методов в отношении вакциноуправляемых инфекций зависит от целого ряда факторов: является ли серологический маркер результатом перенесенной инфекции или прививки, какова степень выраженности и продолжительности гуморального иммунитета, какой титр антител является протективным для конкретного заболевания и др. [16, 20]. Кроме того, трактовка результатов тестов значительно варьирует в зависимости от типа патогенов, среди которых можно условно выделить четыре группы [20]. В первую группу входят инфекции (например, корь, краснуха, оспа), вызванные иммуногенными, антигенно стабильными возбудителями, наличие антител к которым свидетельствует о пожизненном иммунитете и является четким маркером перенесенной инфекции (или вакцинации). Вторая группа заболеваний (грипп, инвазивные бактериальные инфекции, лихорадка денге и др.) обусловлена иммуногенными, но антигенно вариабельными инфекционными агентами. При наличии банка сывороток использование современных серологических тестов могло бы помочь прояснить связь между их серологическим профилем и протективным иммунитетом. В третью группу входят инфекции, для которых индуцированные антитела не являются защитными. Так, при туберкулезе показатели иммунного ответа меняются в зависимости от стадии заболевания; при малярии происходит образование антител к эритроцитам; при гепатите С и ВИЧ-инфекции — наличие антител свидетельствует лишь о текущем или перенесенном заболевании, но не об иммунитете против данной инфекции. Наконец, к последней обширной группе относятся инфекции (на-

пример, ОКИ, папилломавирусная инфекция), при которых или не детектируются специфические антитела, или они не являются защитными. В этих случаях некоторые серологические данные, тем не менее, могут быть полезны для оценки охвата населения программами иммунизации [20].

В контексте общественного здравоохранения серологические исследования наиболее актуальны для формирования стратегии вакцинации против инфекций первой и второй групп, т.е. направленной на защиту иммунизированных лиц и, косвенно, непривитых лиц за счет поддержания высокого уровня популяционного иммунитета [18]. Перед вакцинацией данные о серопревалентности являются наиболее важными для таких заболеваний, как гепатиты В, гепатит А и краснуха, которые часто протекают в инapparантной форме, но имеют характерные серологические маркеры инфекции. На фоне весьма скудных статистических сведений о заболеваемости сероэпидемиологические данные имеют решающее значение для оценки глобального бремени болезни и вклада вакцинации. Так, например, ВОЗ в 1992 г. классифицировала страны мира по степени эндемичности в зависимости от распространенности HBsAg, являющегося маркером хронического гепатита В: высокий ($\geq 8\%$); средний (2 — 7%) и низкий ($< 2\%$) уровень. Результаты серологических исследований позволили осуществить прогноз, в соответствии с которым около 1,4 млн смертей от данной инфекции могли произойти в 2000 году при отсутствии прививок, и 90% из них стало возможным избежать с помощью рутинной вакцинации новорожденных [16]. Это послужило основанием для рекомендаций ВОЗ внедрить вакцинацию против гепатита В в высокоэндемичных странах к 1995 г. и во всех остальных странах к 1997 г. [22]. В целом, данные о серопревалентности, особенно при антигенно стабильных инфекциях, позволяют определить дизайн программ вакцинации с учетом наиболее уязвимых возрастных групп, бремени болезни и теоретических пороговых значений иммунитета для ликвидации инфекции.

Не меньшую значимость имеет и поствакцинальное тестирование, поскольку оценку фактической защищенности необходимо проводить на основании сопоставления данных о привитости детей по документации и результатов серологических исследований [1]. Мониторинг эффективности вакцинации осуществляется преимущественно путем оценки гуморального иммунного ответа (уровень титров антител), поскольку определение антиген-специфичного Т-клеточного ответа, который также играет важную роль в защите от инфекций, является дорогостоящим и трудоемким методом и не используется в рутинной практике здравоохранения [12]. Для многих инфекций, при которых формируется гуморальный иммунитет, определен защитный титр антител, обеспечивающий устойчивость к заражению возбудителем. В табл. 1 представлены ориентировочные защитные титры антител, определенные с помощью таких традиционных серологических методов исследований, как РНГА (реакция не-

Таблица 1. Защитные и высокие титры антител у привитых лиц (Медуницын Н.В. и др., 2016)

Инфекции	Титры антител после вакцинации		Метод индикации антител
	защитные титры	высокие титры	
Грипп	1:40	$> 1:2560$	РТГА
Дифтерия	1:40	$> 1:640$	РТГА
Столбняк	1:20	$> 1:320$	РПГА
Коклюш	1:160	$> 1:2560$	РА
Корь	1:10	$> 1:80$	РНГА
	1:4	$> 1:64$	РТГА
Краснуха	1:20	$> 1:320$	РТГА
Паротит	1:10	$> 1:80$	РПГА
Гепатит В	≥ 10 мМЕ/мл	≥ 1000 мМЕ/мл	ИФА
Клещевой энцефалит	1:20	$> 1:60$	РТГА

Таблица 2. Оценка популяционного иммунитета при управляемых инфекциях (Медуницын Н.В. и др., 2016)

Инфекции	Методы определения антител	Контингент	Наличие антител	Допустимый % вакцинированных лиц с уровнем антител ниже защитного
Дифтерия, столбняк	РПГА	дети	<1 : 20	<10%
		взрослые	серонег.	<20%
Корь	ИФА	дети	серонег.	<7%
Краснуха	ИФА	дети	серонег.	<4%
Паротит	ИФА	дети, вакц. однократно	серонег.	<5%
		дети, вакц. двукратно	серонег.	<10%
Полиомиелит	РН	дети	серонег.	<20% к каждому штамму

прямой гемагглютинации), РТГА (реакция торможения гемагглютинации), РПГА (реакция пассивной гемагглютинации) и др. В настоящее время при осуществлении мониторинга эффективности вакцинации и оценки протективного иммунитета в большинстве стран мира, включая Россию, используется метод иммуноферментного анализа (ИФА). В связи с разнообразием выпускаемых наборов реагентов с различной чувствительностью, защитный титр антител определяют в соответствии с инструкцией к конкретной тест-системе.

Термин «защитный титр», естественно, является относительным понятием, поскольку титры ниже защитного могут играть существенную роль в противоинфекционной резистентности, а защитные титры антител не являются абсолютной гарантией невосприимчивости макроорганизма. Кроме того, для большинства инфекций, защита против которых обусловлена клеточными факторами иммунитета (туберкулез, туляремия, бруцеллез и др.), «защитные титры» клеточных реакций после вакцинации не установлены [6].

Мероприятия по специфической профилактике управляемых инфекций направлены на создание популяционного иммунитета (коллективного, стадного, «herd immunity»), который характеризуется как приобретенное состояние специфической защищенности населения, слагающееся из иммунитета индивидумов, входящих в данную популяцию [18]. Для оценки эпидемиологической ситуации в каждой развитой стране мира проводится мониторинг состояния популяционного иммунитета с помощью сбора информации о его напряженности при проведении серологических исследований [5, 17]. Устанавливаются лимиты — допустимое относительное число вакцинированных лиц с уровнем антител ниже защитного титра (табл. 2).

Динамическое слежение за состоянием иммунитета населения к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики, позволяет своевременно установить признаки эпидемиологического неблагополучия свидетельствующего о начавшейся активизации эпидемического процесса. Прогноз дальнейшего развития ситуации по каждой из наблюдаемых инфекций считается неудовлетворительным, если выявляется тенденция к увеличению доли серонегативных лиц и превышению допустимого уровня. В этом случае необходимо провести анализ прививочной документации, оценить условия хранения и транспортировки вакцин, порядок проведения иммунизации; дополнительно проверить состояние иммунитета к дифтерии, столбняку, коклюшу, кори, краснухе, эпидемическому паротиту, полиомиелиту и

гепатиту В у лиц того же возраста в количестве не менее 100 человек и др. При выявлении на какой-либо территории первых прогностических признаков, свидетельствующих о приближении ухудшения эпидемической ситуации по любой из рассматриваемых инфекций, принимаются управленческие решения, направленные на увеличение уровня иммунной прослойки среди населения [7].

Несмотря на потенциальные возможности сероэпидемиологических исследований, организационные сложности и высокая стоимость ограничивают широкомасштабное применение данного подхода. Использование образцов венозной крови сталкивается с трудностями ее получения для исследований, а результативность анализов на основе менее инвазивных образцов, таких как засохшие пятна крови или материал из ротовой полости, значительно варьирует. В связи с этим, проблемы, связанные со сбором сывороток от репрезентативных групп населения, стандартизацией информативных лабораторных тестов и адекватным статистическим анализом, ограничили возможность проведения качественных сероэпидемиологических исследований в странах с недостаточным финансированием программ здравоохранения. В то же время, увеличивается потребность в достоверных данных по популяционному иммунитету населения, поскольку осуществляются программы, направленные на эрадикацию полиомиелита и элиминацию кори и краснухи, однако их следует адаптировать к долгосрочному контролю и за другими вакциноуправляемыми инфекциями, такими как дифтерия, *Haemophilus influenzae* тип В, коклюш и др. [13].

Предпринимаемые в последние годы усилия по определению превалентности биомаркеров для СПИД (например, в рамках демографических медико-санитарных обследований) могут обеспечить сбор сывороток и их тестирование в отношении широкого диапазона инфекций на основе существующей платформы. Однако при многих заболеваниях отличить поствакцинальный иммунный ответ от выработки антител на естественную спонтанную инфекцию не представляется возможным. Эти трудности исключают простую интерпретацию результатов серологических тестов в контексте вакцинации, однако существует возможность разработки новых аналитических методов, например, количественной оценки, которые могли бы дифференцировать поствакцинальный и постинфекционный гуморальный ответ [19]. Подобный подход представляется весьма важным, особенно в случаях сомнительной достоверности охвата прививками. В настоящее время приобретенный иммунитет возможно дифференцировать лишь для некоторых инфекций, таких как столбняк (естественное инфицирование не приводит к устойчивой выработке антител) и гепатит В (при вакцинации антитела продуцируются только к HBsAg, а при естественной инфекции — и к HBeAg). Повышение интереса к разработке маркированных вакцин позволит, скорее всего, существенно расширить спектр этих инфекций [16, 23].

В опубликованной менее года назад совместной статье американских и английских специалистов [20] аргументированно утверждается, что сероэпидемиологические исследования являются наиболее эффективным методом определения динамики показателей восприимчивости населения к инфекциям и обеспечивают максимально достоверной информацией для определения панорамы (ландшафта, пейзажа) иммунитета популяции, однако данная методология используется не в полной мере. По мнению авторов, для устранения

этой проблемы необходимо создание в каждой стране банка сывороток крови и связанных с ним основных методических разработок в области серологического тестирования, дизайна исследования и количественного анализа, которые могли бы повысить уровень наших знаний и усилить контроль за инфекционной заболеваемостью.

Государственной программой Российской Федерации «Развитие здравоохранения» и Стратегией развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года определена необходимость создания эффективной модели управления деятельностью в сфере охраны здоровья. В соответствии с Государственной программой в разделе приоритетных направлений развития медицинской науки (научная платформа «микробиология») отмечено, что для формирования и развития системы эффективного эпидемиологического надзора за возбудителями инфекционных заболеваний необходимо адекватное информационное обеспечение, уровень которого в значительной мере определяется наличием паспортизированной коллекции сывороток крови [11].

Ожидаемыми результатами функционирования банка сывороток крови являются: достоверная оценка состояния популяционного иммунитета к вакциноуправляемым и другим актуальным инфекциям; оценка риска и степени эпидемиологической опасности распространения различных инфекций на отдельных территориях Российской Федерации; обеспечение учреждений биоматериалами для повышения уровня, эффективности и конкурентоспособности научных работ и клинических исследований, испытания и оценки качества диагностических, вакцинных и лечебных препаратов; краткосрочное и долгосрочное прогнозирование изменения эпидемиологической ситуации по актуальным инфекциям; научное обоснование профилактических и противоэпидемических мероприятий в системе биологической безопасности для определенных групп населения Российской Федерации и декретированных контингентов; обеспечение информацией, необходимой для принятия оптимальных управленческих решений при угрозе и возникновении чрезвычайных ситуаций, связанных с распространением биопатогенов [9, 11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Акимкин В.Г., Семенов Т.А., Никитина Г.Ю., Годков М.А., Скворцов С.В. Эпидемиология гепатитов В и С в лечебно-профилактических учреждениях. М., Бионика, 2013.
2. Брико Н.И. Оценка качества и эффективности иммунопрофилактики. Лечащий врач. 2012, 10: 47-52.
3. Брико Н.И. Парадигма современной эпидемиологии. МедиАль. 2014, 3 (13): 8-36.
4. Информационный бюллетень ВОЗ: Охват иммунизацией. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/ru/>.
5. Медуницын Н.В., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Бондарев В.П. Персональный и коллективный иммунитет при вакцинации. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016, 4 (60): 195-208.
6. Медуницын Н.В., Миронов А.Н. Вакцины. Новые способы повышения эффективности и безопасности вакцинации. Вопросы вирусологии. 2012, 1: 43-51.
7. МУЗ.1.2943-11.3.1.Профилактика инфекционных болезней. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В). Методические указания. 2011.
8. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской

- Федерации в 2015 году: Государственный доклад. М., Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2016.
9. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 28 декабря 2012 г. N 2580-р «Стратегия развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 г.». <http://www.msmsu.ru/userdata/manual/doc/nauka/strategiya%20razvitiya%20med%20nauki.pdf>.
 10. Роспотребнадзор: Об эпидемическом подъеме заболеваемости корью в странах Европейского региона. http://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=8196.
 11. Семененко Т.А., Ананьина Ю.В., Боев Б.В., Гинцбург А.Л. Банки биологических ресурсов в системе фундаментальных эпидемиологических и клинических исследований. Вестник РАМН. 2011, 10: 5-9.
 12. Семененко Т.А. Иммунный ответ при вакцинации против гепатита В у лиц с иммунодефицитными состояниями. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011, 1 (56): 51-59.
 13. Семененко Т.А., Никитина Г.Ю., Ярош Л.В., Баженов А.И., Эльгорт Д.А., Клейменов Д.А. и др. Серологический и молекулярно-биологический анализ результатов вакцинации против гепатита В медицинского персонала многопрофильного стационара. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015, 17 (1): 73-78.
 14. Фельдблюм И.В. Эпидемиологический надзор за вакцинопрофилактикой. МедиАль. 2014, 3 (13): 37-55.
 15. Форма №1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях». <http://www.rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/>.
 16. Cutts F.T., Hanson M. Seroepidemiology: an underused tool for designing and monitoring vaccination programmes in low- and middle-income countries. Trop. Med. Int. Health. 2016, 21 (9): 1086-1098.
 17. Dimech W., Mulders M.N. A 16-year review of seroprevalence studies on measles and rubella. Vaccine. 2016, 34 (35): 4110-4118.
 18. Fine P., Eames K., Heymann D.L. «Herd immunity»: a rough guide. Clin. Infect. Dis. 2011, 52 (7): 911-916.
 19. Kafatos G., Andrews N., McConway K.J. et al. Estimating seroprevalence of vaccine-preventable infections: is it worth standardizing the serological outcomes to adjust for different assays and laboratories? Epidemiol. Infect. 2015, 143 (11): 2269-2278.
 20. Metcalf C.J., Farrar J., Cutts F.T. et al. Use of serological surveys to generate key insights into the changing global landscape of infectious disease. Lancet. 2016, 388 (10045): 728-730.
 21. Osborne K., Gay N., Hesketh L. et al. Ten years of serological surveillance in England and Wales: methods, results, implications and action. Int. J. Epidemiol. 2000, 29: 362-368.
 22. WHO. World Health Organization Expanded Programme on Immunization. Global Advisory Group. Weekly Epidemiological Record. 1992, 3: 11-16.
 23. Wilson S.E., Deeks S.L., Hatchette T.F., Crowcroft N.S. The role of seroepidemiology in the comprehensive surveillance of vaccine-preventable diseases. CMAJ. 2012, 184: E70-E76.

Поступила 25.10.17

Контактная информация: Семененко Татьяна Анатольевна, д.м.н., проф.,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)190-30-01

КОИНФЕКЦИЯ ВИРУСАМИ ГЕПАТИТОВ В И ДЕЛЬТА: МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ФАРМАКОТЕРАПИИ

¹Российский университет дружбы народов, ²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова, Москва

Вирус гепатита дельта (ВГдельта) является дефектным вирусом и облигатным спутником вируса гепатита В (ВГВ). Клиническое значение ВГдельта и ВГВ коинфекции связано с более тяжелыми формами острого или хронического вирусного гепатита, более высоким риском развития цирроза печени и гепатоклеточной карциномы по сравнению с ВГВ-моноинфекцией. Современный уровень знаний по молекулярной биологии возбудителей подтверждает существование очень сложных взаимоотношений между ВГВ, ВГдельта, зараженными гепатоцитами и клетками иммунной системы. Несмотря на то, что виремия ВГВ в настоящее время может контролироваться у подавляющего большинства лиц с помощью нуклеозидных аналогов, проблема лечения ВГдельта и ВГВ коинфекции далека от своего решения. Фундаментальные исследования последних лет позволили добиться значительного прогресса в понимании биологии ВГдельта и создают основу для разработки и внедрения в клиническую практику высокоэффективных противовирусных препаратов.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 95—102

Ключевые слова: вирус гепатита дельта, вирус гепатита В, коинфекция, молекулярная биология вирусов, противовирусная терапия

I.P.Balmasova^{1,2}, R.I.Sepiashvili¹, T.A.Slavyanskaya¹, E.S.Malova¹, Ya.R.Sepiashvili¹

COINFECTION BY HEPATITIS B AND HEPATITIS DELTA VIRUSES: MOLECULAR BIOLOGY OF PATHOGENS AND PROSPECTS OF PHARMACOTHERAPY

¹People's Friendship University, Moscow; ²Evdokimov Moscow State Medical-Stomatological University, Russia

Hepatitis delta virus (HDV) is a defective virus and obligate companion of hepatitis B virus (HBV). The clinical significance of HDV and HBV coinfection is associated with more severe forms of acute or chronic viral hepatitis, a higher risk of developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma compared to BGV-monoinfection. Current knowledge of the molecular biology of pathogens confirms the existence of a very complex relationship between the HBV, HDV, infected hepatocytes and cells of the immune system. Despite the fact that HBV viremia can now be controlled by using nucleoside analogues in the majority of patients, the problem of treating HDV and HBV coinfection is far from being resolved. Fundamental studies in recent years have led to significant progress in understanding the biology of HDV and provide the basis for the development and introduction into clinical practice highly effective antiviral drugs.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), No. 2, P. 95—102

Key words: hepatitis delta virus, hepatitis B virus, coinfection, molecular biology of viruses, antiviral therapy

Среди всего разнообразия вирусно-вирусных взаимодействий при коинфицировании существует один уникальный вариант, представляющий огромный интерес не только с медицинской, но и с биологической точки зрения. Речь идет о коинфекции вирусами гепатита В (ВГВ) и D (ВГдельта), а уникаль-

ность проблемы определяется биологическими особенностями одного из возбудителей — вируса гепатита дельта.

Вирус гепатита дельта является дефектным вирусом и облигатным спутником вируса гепатита В. Его геномная РНК является уникальной среди животных вирусов, при этом ВГдельта имеет общие черты с некоторыми вирионами растений, включая механизм репликации, в процессе которого используются РНК-полимеразы [17]. Он заражает людей одновременно с ВГВ (коинфекция) или после развития ВГВ-инфекции (суперинфекция), при этом коинфекция обычно проявляется как острый гепатит, а суперинфекция ВГдельта приводит к хроническому течению заболевания. Клиническое значение ВГдельта-инфекции связано с более тяжелыми формами вирусного гепатита В — острою или хроническою — и с более высоким риском развития цирроза печени и гепатоклеточной карциномы по сравнению с ВГВ-моноинфекцией [27, 31].

В последние десятилетия были разработаны системы для экспериментального исследования взаимодействия вирусов гепатита В и дельта. К ним относятся, в частности, hNTCP клеточные культуры [26], а также получение линий гуманизированных мышей, которым трансплантированы клеточные линии иммунодепрессанта и гепатоцита человека [18]. Именно эти и другие технологии позволили детально исследовать взаимодействие ВГВ и ВГдельта, а также работать над получением новых противовирусных препаратов.

Как уже упоминалось, ВГдельта известен как дефектный вирус, спутник вируса гепатита В [13]. В глобальном масштабе 350 миллионов человек являются носителями ВГВ, среди них 15 — 20 миллионов человек инфицированы еще и ВГдельта [6, 21]. Несмотря на то, что эта коинфекция известна во всем мире, ее распространенность не является равномерной. В эндемичные регионы по ВГдельта-инфекции входят Средняя Азия, Средняя и Южная Америка, Западная и Центральная Африка, страны Средиземноморья [28, 32]. После внедрения вакцинации против гепатита В распространенность ВГдельта-инфекции сократилась в несколько раз [29], однако до сих пор проблема окончательно не решена.

Вирус гепатита дельта (HDV) был обнаружен в 1977 году Маркусом Ризетто. По последней классификации ВГдельта делят на 8 генотипов [7], генотип 1 является наиболее частым и регистрируется во всем мире, распространение же других генотипов ограничено определенными географическими районами: ВГдельта 2 и 4, в основном, встречаются на Дальнем Востоке и в России; генотип 3 связан с наиболее тяжелой формой хронического гепатита и наблюдается, главным образом, в северной части Южной Америки в районе Амазонки; генотипы 5, 6, 7 и 8 обычно встречаются в Африке или среди африканских мигрантов [23].

В России в связи с отсутствием официальной регистрации гепатита дельта и определения антител к ВГдельта (anti-HDV) у лиц, положительных по HBsAg, представления об эпидемиологии и клинко-вирусологическом характере этой инфекции довольно ограничены, хотя известно, что ряд территорий страны (Республика Тыва, Республика Саха) являются эндемичными для ВГдельта [3].

В инфицированных клетках репликация генома ВГдельта и формирование рибонуклеопротеида (РНП) происходит независимо от ВГВ, однако РНП не может выйти из клетки и, следовательно, распространиться в печени в отсутствие ВГВ, так как последний дает возможность РНП вируса гепатита дельта

соединиться с белками конверта ВГВ для выхода из клеток и доставки вирионов ВГДельта в другие гепатоциты человека [31].

Вирион дельта содержит наименьшую РНК среди всех патогенов человека, эта одноцепочечная циркулярная РНК (геномная РНК ВГДельта) кодирует один единственный белок — НDAg. Для репликации в гепатоцитах ВГДельта использует РНК-полимеразы клетки-хозяина, которые участвуют в преобразовании геномной РНК в ее точную комплементарную форму — антигеномную РНК, а затем в новый вирусный геном [8, 34], при этом уникальный открытый для чтения участок на антигеномной РНК ВГДельта после транскрипции мРНК приводит к синтезу НDAg, который существует в двух различных формах: малый НDAg и большой НDAg [19]. Оба белка присоединяются к РНК ВГДельта с образованием рибонуклеопротеидного (РНП) комплекса дефектного вируса. При этом малый НDAg (24 кДа) имеет важное значение для репликации вируса и присоединения к РНК большого НDAg, тогда как большие формы (27 кДа) подавляют репликацию, вступая во взаимодействие с РНК-полимеразами, и приводят к формированию РНП [14, 19], который самостоятельно не может покинуть клетку.

При наличии в клетке еще и реплицирующего ВГВ оба вируса вступают в сложный цикл взаимодействий. Во-первых, большой НDAg не только ограничивает репликацию ВГДельта, но и через взаимодействие с РНК-полимеразой II препятствует транскрипции кольцевой комплементарной ДНК ВГВ, что нарушает процесс репликации этого вируса [19]. Более того, малый и большой антигены ВГДельта нарушают синтез белков «усилителей» репликации ВГВ — Enh1 и Enh2, а большой НDAg еще и активирует промотор гена интерферона α , что также препятствует репликации вируса-помощника [35]. Одновременно с этим эффектом большой НDAg активирует экспрессию отдельных генов ВГВ, воздействуя на синтез pre-S, S белков конверта ВГВ. В результате в клетке накапливаются все три белка конверта ВГВ, которые вместе с липидами клетки через большой НDAg присоединяются к РНП и завершают формирование вириона гепатита дельта, который уже может покидать пораженный гепатоцит [24]. Функции белков ВГДельта обобщены в табл.

Механизм экспорта ВГДельта из клетки обеспечивается белками конверта ВГВ, которые имеют способность после их синтеза включаться в везикулы в аппарате Гольджи для дальнейшей секреции из клетки. Помимо экспорта РНП ВГДельта, белки конверта ВГВ предоставляют собой средство для доставки этого комплекса в неинфицированные клетки путем присоединения полиальбумина и взаимодействия с клеточными рецепторами для этого комплекса на поверхности гепатоцитов — hNTCP, обеспечивая тем самым распространение не только ВГВ, но еще и ВГДельта [12, 24].

Все это в совокупности приводит к тому, что одновременное инфицирование обоими вирусами оказывает довольно неблагоприятное воздействие на течение вирусного гепатита. Дело в том, что ВГВ рассматривается как вирус, который в большинстве случаев не оказывает прямого цитопатического эффекта на инфицированные гепатоциты. В то же время, данные, полученные в экспериментах на шимпанзе и в клинике при биопсии печени, предполагают прямое цитопатическое воздействие ВГДельта на клетки печени, при этом малый НDAg считается ответственным за прямой цитопатический эффект в отношении гепатоцитов, тогда как большой НDAg является нецитотоксичным, но способствует выживанию ВГДельта и может делать гепатоциты восприим-

Функциональное значение белков ВГдельта при коинфицировании ВГВ/ВГдельта

Белки ВГдельта	Объекты воздействия	Эффекты воздействия
Малый HDAg	РНК ВГдельта РНК ВГдельта + большой HDAg Гепатоцит	Репликация ВГдельта Формирование рибонуклеопротеида ВГдельта Цитопатическое действие
Большой HDAg	РНК ВГдельта + малый HDAg Рибонуклеазы гепатоцитов Промотор гена интерферона α Промоторы генов рге-S и S белков конверта ВГВ Белки HBSAg Гепатоциты	Формирование рибонуклеопротеида ВГдельта Подавление репликации ВГдельта Подавление репликации ВГВ Синтез интерферона α и ограничение репликации ВГВ Синтез белков HBSAg Формирование вириона гепатита дельта, способного к выходу из клетки и к проникновению в клетку Выживание ВГдельта в клетке, рост чувствительности гепатоцита иммунному повреждению
Малый HDAg + большой HDAg	STAT3 и NF- κ B сигнальные пути продукции цитокинов и активных форм кислорода Гистоны промоторов гена кластерина в гепатоцитах	Активация, приводящая к клеточному стрессу, некрозу, воспалению, канцерогенезу, снижению эффективности терапии интерфероном α H3 ацетилирование, гиперэкспрессия гена и рост риска гепатоклеточной карциномы
	Гены белков Ehf 1/2 в гепатоцитах Клетки адаптивного иммунного ответа Клетки врожденного иммунного ответа	Репрессия генов, подавление синтеза «усилителей» ВГВ, ограничение репликации ВГВ Слабый адаптивный иммунный ответ Преобладание цитотоксических реакций естественных киллеров
Большой HDAg + HBsAg	SRE-сывороточный фактор экспрессии генов клеточного роста, дифференцировки, канцерогенеза	Риск развития гепатоклеточной карциномы
HBsAg	Большой HDAg в составе рибонуклеопротеида ВГдельта Клетки адаптивного иммунного ответа	Включение ВГдельта в секреторные везикулы и выход его из клетки Присоединение полиальбумина, обеспечивающего взаимодействие ВГдельта с рецепторами гепатоцитов Преобладание CD4+ опосредованного адаптивного иммунного ответа в печени при выраженности цитотоксического эффекта этих клеток и активной секреции супрессорного цитокина ИЛ-10, относительно слабая индукция иммунологической памяти

чивыми к иммунному повреждению [8, 10]. По этой причине коинфекция ВГВ/ВГдельта обычно дает более тяжелое клиническое течение, чем моноинфекция ВГВ [15].

В тех случаях, когда вирус гепатита дельта попадает в организм уже инфицированный вирусом гепатита В, то есть развивается суперинфекция, события принимают еще более драматичный характер. Как уже упоминалось, при суперинфекции ВГВ/ВГдельта инфекция протекает как хроническое заболевание. При этом в печени неуклонно нарастают некротические и воспалительные изменения с интенсивным отложением коллагена, а кульминацией этих процессов является развитие цирроза печени и гепатоклеточной карциномы [27]. В настоящее время доказано, что суперинфекция ВГдельта и высокий

уровень его виремии значительно увеличивают риск быстрого прогрессирования цирроза и гепатоклеточной карциномы по сравнению с инфекцией только ВГВ [8, 10]. Особенно неблагоприятная ситуация отмечена при сочетании генотипа III ВГДельта и генотипа F ВГВ [10].

В этом случае срабатывает несколько механизмов, один из которых связан, например, со способностью большого HDAgs вируса гепатита дельта поднимать в гепатоцитах уровень p27-фактора, способствующего внутриклеточной активации STAT-3 и NFκB [36]. Возможным следствием этого явления служит усиление повреждение печени в целом, а также вирусиндуцированного канцерогенного эффекта, что частично объясняет более тяжелое течение ВГДельта-ассоциированных заболеваний печени и тот факт, почему у ВГВ/ВГДельта коинфицированных пациентов первичная гепатоклеточная карцинома развивается раньше, чем при моноинфекции ВГВ [22, 32].

Есть еще один механизм: гепатоклеточная карцинома часто ассоциируется с гиперэкспрессией кластерина — белка, расщепляющего клеточный «мусор», регулирующего апоптоз и вызывающего зависящую от гена src раковую трансформацию, а большой HDAg способствует такой гиперэкспрессии через увеличение H3 ацетилирования гистонов промоторов кластерина [8].

Не последнюю роль в патогенезе ВГВ/ВГДельта коинфекции играют иммунные процессы. Адаптивный иммунный ответ при ВГДельта-инфекции является довольно слабым [25], а основная роль в элиминации этого вируса принадлежит естественным киллерам (ЕК) как клеткам врожденного иммунного ответа, активация которых происходит в связи с экспрессией пораженными гепатоцитами лигандов для активирующих рецепторов этих клеток — молекул HLA-E [2, 11, 16]. Что касается адаптивного иммунного ответа, то у хронически коинфицированных ВГВ/ВГДельта больных ответ Т-хелперов сопряжен с высоким уровнем секреции интерлейкина-10 и трансформирующего фактора роста β, которые обладают иммуносупрессорными эффектами, подавляют сигнальные пути интерферона и способствуют не только хронизации процесса, но и развитию гепатоклеточной карциномы [33]. Кроме того, перфорин-позитивные CD4+ Т клетки, связанные с цитотоксическим повреждением гепатоцитов, накапливаются у хронически коинфицированных больных, что может объяснить более тяжелое течение ВГДельта-ассоциированных заболеваний печени [9]. Ответ CD8+ Т клеток (ЦТЛ) гораздо слабее и был обнаружен только у больных с ВГДельта-инфекцией в анамнезе, неактивной в настоящее время [20]. Эти нарушения Т-клеточного ответа наблюдаются в условиях хронической ВГВ/ВГДельта коинфекции, вероятнее всего, благодаря наличию ВГВ и его связи с дефектными реакциями Т-клетки [15].

Таким образом, полученные данные подтверждают существование очень сложных взаимоотношений между ВГВ, ВГДельта, зараженными гепатоцитами и клетками иммунной системы [17]. Как уже отмечалось, исследование молекулярных механизмов этих взаимодействий создает основу для разработки средств противовирусной терапии.

Оценивая существующее положение вещей, следует отметить следующее. Лечение пегилированным интерфероном α, долгие годы применявшееся при коинфекции ВГВ+Вгдельта, дает устойчивый вирусологический ответ (через шесть месяцев от начала противовирусной терапии) только у одной четверти пациентов. Нуклеозидные аналоги довольно широко протестированы при

гепатите дельта, но они, как представляется, оказались неэффективными. Разочаровало и сочетание нуклеозидных аналогов с интерфероном [6].

Особые надежды современные исследователи связывают с использованием ингибиторов проникновения вирусов в клетку [4, 5]. Выше отмечено, что для ВГдельта, как и ВГВ, рецептором для этих вирусов на гепатоцитах человека является полипептид, участвующий в транспорте таурохолата натрия — hNTCP. В настоящее время получен синтетический N-ацетилированный липопептид Myrcludex B, способный блокировать этот рецептор. Первая апробация этого препарата показала, что лучше его применять в комбинации с пегилированным ИФН α [1].

Существуют и другие препараты, влияющие на метаболическую функции hNTCP. К ним относятся некоторые лекарственные препараты, известные как фармацевтические средства, используемые для других лечебных целей. К ним относятся, в частности, ирбесартан, эзетимиб, ритонавир, циклоспорин А, подтверждение анти-дельта эффективности которых требует дальнейших испытаний [6].

Довольно значительная регуляторная роль в реализации инфекционных свойств ВГдельта принадлежит внутриклеточному большому HDAg и его взаимодействию HBsAg ВГВ. В связи с этим, особую группу составляют препараты, ингибирующие образование вирусных белков, в частности, HBsAg, с участием фарнезилтрансфераз. К этой категории относится, например, проходящий в настоящее время клинические испытания препарат Lonafarnib (Sarasar) [4]. Использование таких ингибиторов представляет интересный новый подход, поскольку выраженное снижение уровня HBsAg, как ожидается, будет влиять на количество циркулирующих дельта-вирионов [5].

В заключение необходимо подчеркнуть следующее. Несмотря на то, что в течение ВГВ в настоящее время может контролироваться у подавляющего большинства лиц с помощью нуклеозидных аналогов, лечение ВГдельта-инфекции долгое время проводилось интерфероном α , было сравнительно неэффективным и плохо переносимым. Фундаментальные исследования последних лет позволили добиться значительного прогресса в понимании биологии ВГдельта и создают основу для разработки и внедрения в клиническую практику высокоэффективных противовирусных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богомолов П.О., Воронкова Н.В., Буеверов А.О., Мациевич М.В., Alexandrov A., Wedermeyer H. Первый опыт применения препарата «Myrcludex B» при хроническом гепатите D (Предварительные результаты). Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. 2015, 2: 23-26.
2. Балмасова И.П., Сепиашвили Р.И., Малова Е.С. Молекулярная биология вируса гепатита В и иммунопатогенез хронического гепатита В. Журн. микробиол. 2016, 2: 119-126.
3. Кожанова Т.В., Ильченко Л.Ю., Михайлов М.И. Вирусный гепатит дельта. Существует ли в Российской Федерации проблема дельта-инфекции? Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2014, 12 (112): 4-12.
4. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Иммунные синапсы: от теории к клинической практике. Молекулярная медицина. 2008, 1: 14-22.
5. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И. Роль цитокинов в иммунопатологии. Аллергология и иммунология. 2005, 6 (2): 42.
6. Abbas Z., Abbas M. Management of hepatitis delta: Need for novel therapeutic options. World J. Gastroenterol. 2015, 21 (32): 9461-9465.

7. Alvarado-Mora M.V., Locarnini S., Rizzetto M., Pinho J.R. An update on HDV: virology, pathogenesis and treatment. *Antivir. Ther.* 2013, 18 (3 Pt. B): 541-548.
8. Abbas Z., Afzal R. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. *World J. Hepatol.* 2013, 5 (12): 666-675.
9. Aslan N., Yurdaydin C., Wiegand J. et al. Cytotoxic CD4 T cells in viral hepatitis. *J. Viral. Hepat.* 2006, 13 (8): 505-514.
10. Botelho-Souza L.F., Vasconcelos M.P.A. et al. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virology*. 2017, 14 (1): 177-191.
11. Balmasova I.P., Yushchuk N.D., Mynbaev O.A. et al. Immunopathogenesis of chronic hepatitis B. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20 (39): 14156-14171.
12. Fu L., Hu H., Liu Y. et al. Woodchuck sodium taurocholate cotransporting polypeptide supports low-level hepatitis B and D virus entry. *Virology*. 2017, 505: 1-11.
13. Goyal A., Murray J.M. Dynamics of in vivo hepatitis D virus infection. *J. Theor. Biol.* 2016, 398: 9-19.
14. Griffin B.L., Chasovskikh S., Dritschilo A., Casey J.L. Hepatitis delta antigen requires a flexible quasi-double-stranded RNA structure to bind and condense hepatitis delta virus RNA in a ribonucleoprotein complex. *J. Virol.* 2014, 88 (13): 7402-7411.
15. Giersch K., Dandri M. Hepatitis B and delta virus: advances on studies about interactions between the two viruses and the infected hepatocyte. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 2015, 3 (3): 220-229.
16. Giersch K., Allweiss L., Volz T. et al. Hepatitis Delta co-infection in humanized mice leads to pronounced induction of innate immune responses in comparison to HBV mono-infection. *J. Hepatol.* 2015, 63 (2): 346-353.
17. Huang C.-R., Lo S.J. Hepatitis D virus infection, replication and cross-talk with the hepatitis B virus. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20 (40): 14589-14597.
18. Higuchi Y., Kawai K., Yamazaki H. et al. The human hepatic cell line HepaRG as a possible cell source for the generation of humanized liver TK-NOG mice. *Xenobiotica.* 2014, 44 (2): 146-153.
19. Huang H.C., Lu H.F., Lai Y.H. et al. Tat-enhanced delivery of the C terminus of HDAG-L inhibits assembly and secretion of hepatitis D virus. *Antiviral. Res.* 2017, 150: 69-78.
20. Huang Y.H., Tao M.H., Hu C.P. et al. Identification of novel HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell epitopes on hepatitis delta virus. *J. Gen. Virol.* 2004, 85 (Pt 10): 3089-3098.
21. Jelen M.M., Hosnjak L., Stunf S. et al. Hepatitis D virus infection in Slovenian patients with chronic hepatitis B virus infection: a national prevalence study and literature review. *Acta Dermatovenerol Alp. Pannonica Adriat.* 2016, 25 (3): 49-53.
22. Jin Y., Chen J., Feng Z. et al. The expression of Survivin and NF- κ B associated with prognostically worse clinicopathologic variables in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 2014, 35 (10): 9905-9910.
23. Le Gal F., Brichler S., Drugan T. et al. Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains. *Hepatology.* 2017, 66 (6): 1826-1841.
24. Lempp F.A., Urban S. Hepatitis delta virus: replication strategy and upcoming therapeutic options for a neglected human pathogen. *Viruses.* 2017, 9 (7): 172-190.
25. Lunemann S., Malone D.F., Grabowski J. et al. Effects of HDV infection and pegylated interferon alpha treatment on the natural killer cell compartment in chronically infected individuals. *Gut.* 2015, 64 (3): 469-482.
26. Li W., Urban S. Entry of hepatitis B and hepatitis D virus into hepatocytes: Basic insights and clinical implications. *J. Hepatol.* 2016, 64 (1 Suppl.): 32-40.
27. Negro F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring. Harb. Perspect. Med.* 2014, 4 (11): a021550.
28. Rizzetto M. Hepatitis D virus: introduction and epidemiology. *Cold Spring. Harb. Perspect. Med.* 2015, 5 (7): a021576.
29. Rizzetto M. Epidemiology of hepatitis D. *Semin Liver Dis.* 2012, 32 (3): 211-219.
30. Rizzetto M., Ciancio A. The prenylation inhibitor, lonafarnib: a new therapeutic strategy against hepatitis delta. *Lancet Infect. Dis.* 2015, 15 (10): 1119-1120.
31. Sureau C., Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J. Hepatol.* 2016, 64 (1 Suppl): 102-116.

32. Sagnelli E., Sagnelli C., Pisaturo M. et al. Epidemiology of acute and chronic hepatitis B and delta over the last 5 decades in Italy. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20 (24): 7635-7643.
33. Sun X., Sui Q., Zhang C. et al. Targeting blockage of STAT3 in hepatocellular carcinoma cells augments NK cell functions via reverse hepatocellular carcinoma-induced immune suppression. *Mol. Cancer. Ther.* 2013, 12 (12): 2885-2896.
34. Taylor J.M. Virology of hepatitis D virus. *Semin Liver Dis.* 2012; 32 (3): 195-200.
35. Williams V., Brichler S., Radjef N. et al. Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *J. Gen. Virol.* 2009, 90 (Pt. 11): 2759-2767.
36. Williams V., Brichler S., Khan E. et al. Large hepatitis delta antigen activates STAT-3 and NF- κ B via oxidative stress. *J. Viral. Hepat.* 2012, 19 (10): 744-753.

Поступила 25.12.17

Контактная информация: Сепиашвили Реваз Исмаилович, д.м.н., проф.,
117513, Москва, ул. Островитянова, 4, р.т. (495)735-14-14

© Ю.В.ЗАХАРОВА, 2018

Ю.В.Захарова

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ МИКРОБИОМ КИШЕЧНИКА ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛЮДЕЙ

Кемеровский государственный медицинский университет

В обзоре представлены современные данные по состоянию микрофлоры ВИЧ-инфицированных людей и ее участию в прогрессировании заболевания. Описаны механизмы и маркеры бактериальной транслокации через слизистую кишечника в кровоток, их значение для ВИЧ-инфицированных. Исследования кишечного микробиома разных категорий лиц с ВИЧ-статусом демонстрируют противоречивые данные о филогенетическом разнообразии кишечной микрофлоры. Однако в большинстве работ показано, что при ВИЧ-инфекции происходит увеличение в кишечнике представителей рода *Prevotella*, снижение количественного уровня *Bacteroides spp.*, увеличение удельного веса протеобактерий по отношению к другим представителям кишечной флоры. Показано, что протеобактерии у ВИЧ-инфицированных пациентов являются более метаболически активными, чем у ВИЧ-негативных лиц. Представлены дальнейшие перспективы исследований кишечного микробиома при ВИЧ-инфекции.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 102—109

Ключевые слова: бактериальный микробиом, кишечник, ВИЧ-инфекция

Yu.V.Zakharova

GUT BACTERIAL MICROBIOME OF HIV-INFECTED PEOPLE

Kemerovo State Medical University, Russia

Data on the state of the microflora of HIV-infected people and its participation in the progression of the disease are presented. Mechanisms and markers of bacterial translocation through the intestinal mucosa into the bloodstream, their importance for HIV-infected people are described. Study of intestinal microbiome in different groups of HIV-status people controversial data on the phylogenetic diversity of the intestinal microflora are shown. However, in most studies in HIV-infected increase in the intestine of members of the genus *Prevotella*, reduction of the quantitative level of *Bacteroides spp.* increase in the proportion of *Proteobacteria* compared to the other mem-

bers of the intestinal flora are noted. It is shown that *Proteobacteria* in HIV-infected patients are more metabolically active than HIV-negative individuals. Further studies of the intestinal microbiome in HIV-infection are presented.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 102—109

Key words: bacterial microbiome, gut, HIV-infection

Эпителий кишечника является одним из локусов, в котором осуществляется первичная репликация вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Возникающие структурные нарушения слизистой кишечника не могут не отразиться на состоянии микробиоты, которая является частью неспецифической защиты макроорганизма. С изменениями кишечной микрофлоры в настоящее время связывают большое число разнообразных болезней человека [2, 4, 6, 15, 19]. И только относительно недавно стали проводиться исследования микрофлоры желудочно-кишечного тракта при ВИЧ-инфекции [11, 17, 21, 25, 27]. Данные работы немногочисленны, а также проведены они на группах ВИЧ-инфицированных пациентов небольшого объема. Между тем, исследования мукозальной и просветной кишечной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных пациентов является актуальными с точки зрения определения патофизиологических и иммунологических механизмов прогрессирования ВИЧ-инфекции.

Первоначально исследования микробиома кишечника у ВИЧ-инфицированных были посвящены определению механизмов и факторов возникновения бактериемий. Наиболее часто в крови у ВИЧ-позитивных пациентов обнаруживали *Streptococcus pneumoniae* и *Salmonella* spp. [24, 28]. Доказано, что возникновение инвазивных пневмококковых заболеваний зависит от количества CD4⁺ Т-клеток [24], однако факторы риска для инвазии сальмонелл в кровеносное русло не выявлены [28]. В настоящее время несколько исследований демонстрируют, что микроорганизмы кишечника, прежде всего резиденты, являются неотъемлемыми драйверами патологического воспаления, которое сохраняется у пациентов даже во время антиретровирусной терапии (АРТ) [8, 18, 23]. Дело в том, что ВИЧ вызывает быстрое и глубокое повреждение CD4⁺ Т-клеток собственной пластинки (*lamina propria*) слизистой кишечника, влияя в целом на гомеостаз кишечника. Структурные повреждения слизистой кишки во время первичной репликации ВИЧ-1 приводят к образованию «дырявого кишечника», поэтому микроорганизмы транслоцируются из кишечника в кровь и вызывают активацию иммунной системы и прогрессирование ВИЧ-инфекции [3, 23].

Определение уровня липополисахарида (ЛПС) грамотрицательных бактерий в кровотоке ВИЧ-1 инфицированных позволило установить, что микробная транслокация начинается в конце острой фазы инфекции — с 21 — 28 дня до 200 дня от момента инфицирования [10, 20]. В начале острой фазы инфекции большинство микробных продуктов, найденных в собственной пластинке слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, локализируются в макрофагах, которые ограничивают их циркуляцию [20]. Однако уже в конце острой фазы ВИЧ-инфекции идет преимущественная потеря слизистой Th 17, приводящая к повреждению эпителиального барьера [16]. Также ВИЧ-инфицированные пациенты имеют низкий уровень кишечных CD13⁺ миеломоноцитарных клеток, в том числе дендритных клеток, макрофагов и гранулоцитов, по сравнению с лицами без ВИЧ-статуса, что нарушает процесс

удаления микробных продуктов из кишечника и позволяет им попасть в кровоток [3, 7, 21, 29]. В норме ЛПС является модулятором врожденной и адаптивной иммунной системы. Кроме того, циркулирующий ЛПС, а также ДНК энтеробактерий вызывают Т-клеточную иммунологическую гиперактивацию, которую рассматривают как механизм защиты от патогенных микроорганизмов. Однако при ВИЧ-инфекции хроническая иммунная активация и воспаление являются предикторами исхода и основными признаками данного заболевания [8, 22, 23]. В дополнение к ЛПС у ВИЧ-инфицированных людей в качестве показателей системной микробной транслокации используют и другие маркеры, такие как sCD14, sCD163, белок, связывающий жирные кислоты кишечника, учитывают соотношение кинуренин/триптофан, уровень рецепторов к фактору некроза опухоли, С-реактивный белок, количество D-димеров. Повышение уровня данных показателей коррелирует с прогрессированием заболевания и смертностью у нелеченных ВИЧ-инфицированных пациентов [14, 31].

Исследования, посвященные изучению микробиома слизистой прямой кишки у ВИЧ-инфицированных пациентов, в настоящее время основаны на секвенировании у них содержимого дистального отдела кишечника. Полученные данные по кишечному бактериальному микробиому пациентов с ВИЧ-статусом противоречивы. Так, в большинстве случаев установлено, что при ВИЧ-инфекции отмечается уменьшение разнообразия фекальной микробиоты по сравнению со здоровыми людьми [7, 33, 34]. Кроме того, индекс филогенетического разнообразия микрофлоры снижается у пациентов, не получавших АРТ, по сравнению с группой, прошедших лечение, что позволило сделать заключение о положительном влиянии противовирусной терапии на восстановление видового богатства микрофлоры кишечника [33]. Однако в исследованиях Dinh D. et al. было показано снижение разнообразия микрофлоры у 21 пациента с ВИЧ-инфекцией, из которых 19 получали противовирусную терапию. В то же время, не было различий с когортой пролеченных больных [8]. Это вызвало сомнение в том, что АРТ является способом восстановления кишечного микробиома при ВИЧ-инфекции. Не согласуются с данными большинства исследователей результаты, полученные Lozupone C. A. et al. [17, 18]. При изучении микробиома у 25 ВИЧ-инфицированных было показано высокое разнообразие и богатство микрофлоры по сравнению с 13 ВИЧ-отрицательными людьми [17]. Причем у ВИЧ-инфицированных лиц даже после 6,7 — 8,5 месяцев АРТ микрофлора сильно отличалась от микрофлоры ВИЧ-отрицательных людей, и это указывало на то, что краткосрочные курсы АРТ недостаточны для восстановления микробиоценоза [18]. Вероятнее всего, противоречивость полученных данных связана с тем, что в исследованиях не были учтены факторы, которые могут повлиять на состояние микрофлоры, например, стадия, продолжительность болезни, наличие сопутствующих соматических заболеваний и многие другие. Действительно, несколько исследований свидетельствуют, что количество CD4⁺ Т-клеток является наиболее влиятельным фактором, определяющим структуру бактериального сообщества при ВИЧ-инфекции, чего не было учтено в предыдущих случаях [22]. Так, исследования, проведенные в Уганде, позволили охарактеризовать бактериальный микробиом у 37 ВИЧ-отрицательных людей и 73 ВИЧ-положительных пациентов (39 пациентов после АРТ и 34 ВИЧ-нелеченных пациентов). Сформированные группы были сходными по возрасту и полу. При этом в когорте ВИЧ-инфицированных учитывали влияние на микробиом таких факторов как продолжительность АРТ, величина вирусной нагрузки,

уровень CD4⁺ Т-клеток. Установлено, что у пациентов с ВИЧ-статусом и уровнем CD4⁺ <200 кл/мл отмечается значительное сокращение количественного уровня бактерий по сравнению с ВИЧ-инфицированными пациентами с уровнем CD4⁺ >200 кл/мл и незначительное снижение по сравнению с ВИЧ-отрицательными пациентами. Филогенетическое разнообразие бактерий значительно снижено также у ВИЧ-инфицированных с CD4⁺ <200 кл/мл по сравнению с ВИЧ-отрицательными пациентами и пациентами с ВИЧ статусом с содержанием CD4⁺ >200 кл/мл. Однако не установлено корреляционной связи между величиной вирусной нагрузки при ВИЧ-инфекции и филогенетическим разнообразием в группах леченных и нелеченных ВИЧ-инфицированных людей [22]. Уменьшение богатства и филогенетического разнообразия бактерий кишечного микробиома у больных в поздней стадии ВИЧ-инфекции были схожими с результатами, полученными при исследовании микробиома макак-резусов, инфицированных вирусом иммунодефицита обезьян (SIV) [13].

С помощью секвенирования определены конкретные таксоны, ассоциированные с дефицитом Т-лимфоцитов при ВИЧ-1 инфекции. Перечень включает 13 бактериальных семейств: Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae, Streptococcaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Planococcaceae, Actinomycetalaceae, Carnobacteriaceae, Micrococcaceae, Gemellaceae, Comamonadaceae, Leuconostocaceae и Leptotrichiaceae [22, 33]. В других работах отмечается, что особенностью фекальной микробиоты у лиц с хронической ВИЧ-инфекцией является значительно более высокий количественный уровень представителей семейств Prevotellaceae, Erysipelotrichaceae (*Catenibacterium* и *Bulleidia*), Veillonellaceae (*Dialister* и *Mitsuokella*) и рода *Desulfovibrio* по сравнению с ВИЧ-отрицательными людьми [17, 18].

Кроме влияния уровня Т-клеток на структуру бактериального сообщества у ВИЧ-инфицированных установлены корреляционные связи между бактериальным разнообразием и уровнем плазменного sCD14. Увеличение циркулирующего sCD14 при ВИЧ-инфекции ассоциируют с ростом смертности при данном заболевании, так как предполагают, что данный белок может быть посредником бактериальной транслокации из кишечника [7, 10, 22]. Корреляционный анализ выявил, что 144 бактериальных таксона существенно связаны с уровнем sCD14, в том числе 23 относящихся к семейству Vacteroidaceae и 23 к Ruminococcaceae [21].

Несколько исследований выявили у ВИЧ-инфицированных снижение числа представителей класса Clostridia, из которых многие члены участвуют в поддержании иммунного гомеостаза. McHardy I. H. et al. отметили значительное уменьшение представителей данного класса при АРТ, в основном из-за снижения числа микроорганизмов из семейств Ruminococcaceae и Lachnospiraceae [21]. Однако полностью роль этих семейств в поддержании гомеостаза слизистой кишечника еще не установлена, хотя о роли бактерий семейства Ruminococcaceae в функционировании кишечного барьера ранее уже упоминалось [19]. Интересно, что на состояние активации и созревание толстокишечных миелоидных дендритных клеток (МДК) у пациентов с ВИЧ-инфекцией влияет низкий уровень мукозальных видов бактерий слизистой оболочки, прежде всего штамма *Ruminococcus bromii* [7]. Особое внимание в последние годы было уделено *Faecalibacterium prausnitzii*, облигатному анаэробу, принадлежащего к семейству Lachnospiraceae. Снижение численности этих комменсальных бактерий часто связывают с воспалительным заболеванием кишечника, или болезнью Крона, основывая это на предположении

наличия у бактерий противовоспалительных свойств. Действительно, уменьшение уровня микроорганизмов семейства *Lachnospiraceae* было отмечено и у ВИЧ-инфицированных пациентов в нескольких исследованиях [8, 9, 12]. Однако полученные результаты не подтверждены статистически, поэтому необходима дальнейшая работа в данном направлении, чтобы определить, не является ли данное снижение представителей класса *Clostridia* артефактом.

Большинство исследователей указывают на увеличение у ВИЧ-инфицированных в составе микрофлоры кишечника представителей рода *Prevotella* [8, 9, 18, 21], несмотря на различия в способах забора материала (например, биопсия слизистой или фекалии), статусе пациента (после АРТ или не принимавший противовирусные препараты) и методов, используемых для исследования флоры [1, 8, 32, 33]. Nowak P. et al. в своих работах отмечает значительное снижение превотелл у ВИЧ-позитивных пациентов, перенесших АРТ по сравнению с нелечеными людьми [26]. Относительное увеличение количественного уровня превотелл коррелирует с уровнем CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в слизистой ткани [18]. Также у пациентов с ВИЧ статусом недавно установлена высокая частота обнаружения в кишечном микробиоценозе *Prevotella copri*, *Prevotella stercorae* [17]. Кроме того, количественный уровень превотелл связан с величиной вирусной нагрузки, с продукцией и уровнем цитокинов как в тканях, так и в кровотоке. Известно, что микробиота, богатая превотеллами, обуславливает высокий уровень в плазме крови триметиламин-N-оксида, который имеет проатерогенный эффект [30]. Учитывая высокие темпы и раннее начало атеросклероза и ишемической болезни сердца у ВИЧ-инфицированных лиц полученные данные по микробиоте позволяют предположить некоторые механизмы развития у них данной патологии.

Наряду с увеличением превотелл у ВИЧ-инфицированных пациентов отмечают снижение количественного уровня *Bacteroides* spp. [10, 21, 22, 33, 34]. Среди видов, принадлежащих к роду *Bacteroides*, у пациентов с ВИЧ-статусом значительно снижается титр *Bacteroides fragilis*, причем как в образцах муцина [33], так и в биоптатах толстой кишки [34]. Полагают, что данный вид микроорганизмов может играть ключевую роль в поддержании адаптивного иммунитета, индуцируя превращение CD4⁺ Т-клеток в Treg [7]. Другие бактериальные индукторы циркулирующих Treg, такие как *B. massiliensis*, *B. thetaiotaomicron*, *Parabacteroides distasonis* или *B. uniformis*, достигают очень низкого количественного уровня только при поздних стадиях ВИЧ-инфекции [22]. Следует отметить, что при ВИЧ-инфекции среди представителей типа *Bacteroides* также значительно снижено число микроорганизмов семейства *Rikenellaceae*. При этом в большей степени страдает род *Alistipes* [10, 21, 22], хотя механизмы угнетения количественного уровня данных микроорганизмов в микробиоме ВИЧ-инфицированных пациентов еще не определены. На сегодняшний день известно, что низкий количественный уровень *Alistipes* spp. наблюдается не только при ВИЧ-инфекции, но и при воспалительных заболеваниях кишечника. Однако этот факт требует дальнейшего исследования.

При ВИЧ-инфекции отмечается увеличение удельного веса протеобактерий по отношению к другим представителям кишечной флоры [12, 17, 21, 22]. Существенное увеличение энтеробактерий при АРТ связывают с уровнем sCD14, IL-1 β , интерферонов и хроническим воспалительным процессом у ВИЧ-инфицированных пациентов без АРТ [22]. Вследствие воспаления в кишечнике развиваются микрoэкологические нарушения, как при любом другом заболевании, поэтому увеличивается количество кислородных и/или азотных радикалов, что способствует активному росту и размножению факульт-

тативных анаэробов [12, 23, 32]. В экспериментах *in vitro* установлено, что *Escherichia coli* индуцируют увеличение репликации ВИЧ-1, которое оценивали по высокому уровню белка p24 ВИЧ-1, по сравнению с опытом, где вирус реплицировался самостоятельно [22]. В то же время, ЛПС как структурный компонент бактерий самостоятельно не вызывает повышения репликации вируса. Однако уровень ЛПС в кровотоке ВИЧ-инфицированных коррелирует со смертностью пациентов и с развитием у них гипертонии. При этом действие ЛПС не зависит от уровня Т-клеток CD4⁺ [8, 20, 23].

Изменение соотношения некоторых представителей кишечного микробиома по отношению к друг другу используют как маркеры стадий ВИЧ-инфекции. Так, о прогрессировании заболевания говорит увеличение числа представителей типа *Proteobacteria* вместе со снижением количества рода *Bacteroides* [18]. В других исследованиях о прогрессировании судят по увеличению представителей рода *Prevotella* и уменьшению микроорганизмов, относящихся к типу *Firmicutes* [22]. Интересными является исследования, которые продемонстрировали, что у SIV-инфицированных макаков-резусов увеличивается не только количественный уровень протеобактерий, но они проявляют большую метаболическую активность, по сравнению с другими представителями кишечного микробиома, а также являются основной группой бактерий, которая транслоцируется при лентивирусных инфекциях [5].

Для того, чтобы лучше понять влияние ВИЧ-1 на кишечный микробиом, будущие исследования должны проводиться в нескольких направлениях. Во-первых, необходимо проведение продольных исследований о влиянии АРТ и ее длительности на микробиом, необходим анализ микробиоты у ВИЧ-инфицированных пациентов с разным статусом по сравнению с ВИЧ-экспонированными серонегативными лицами. Во-вторых, хотя информация о кишечном микробиоме может быть получена при исследовании фекальных образцов, чтобы лучше понять прямое действие микробиома на состояние кишечника, необходимо проводить оценку мукозального микробного сообщества. Отбор проб из разных отделов желудочно-кишечного тракта, а не только из дистального отдела толстой кишки, может обеспечить дальнейшее понимание того, как возникают микрoэкологические нарушения и, в свою очередь, как дисбактериоз влияет на иммунный гомеостаз и на функцию кишечного барьера. Дополнительной задачей является дальнейшее изучение влияния дисбактериоза при ВИЧ-1 инфекции на изменения в ключевых путях метаболизма резидентных бактерий, а не просто сосредоточение на определении различий в качественном составе кишечной микрофлоры. Кроме того, в настоящее время опубликованные данные касаются только бактериальных сообществ у ВИЧ-инфицированных. Однако микробиом также включает в себя грибы (микобиом), археи, вирусы, в том числе и бактериофаги. Оценка вклада этих недооцененных компонентов микробной экосистемы в поддержании гомеостаза кишечника приведет к более глубокому пониманию патогенеза ВИЧ-1 инфекции и, возможно, позволит предложить новые подходы к ее лечению. Нерешенным является вопрос о коррекции микрофлоры у ВИЧ-инфицированных. Если дисбаланс микробов в кишечнике способен обострять течение ВИЧ-1 заболевания, то может ли восстановление «нормальной» структуры кишечного сообщества снизить темпы прогрессирования заболевания. Или, наоборот, может ли восстановление состояния слизистой кишечника при лечении противовирусными препаратами способствовать изменениям в кишечном микробиоме ВИЧ-инфицированных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Araujo-Perez F., McCoy AN., Okechukwu C et al. Differences in microbial signatures between rectal mucosal biopsies and rectal swabs. *Gut Microbes*. 2012, 3 (6): 530-535.
2. Beighton D., Al-Haboubi M., Mantzourani M et al. Oral bifidobacteria : Caries-associated bacteria in older adults. *J. Dental Research*. 2010, 9 (89): 970-974.
3. Burgener A., McGowan I., Klatt N.R. HIV and mucosal barrier interactions: consequences for transmission and pathogenesis. *Current Opinion in Immunology*. 2015, 36: 22-30.
4. Candela M., Guidotti M., Fabbri A. et al. Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer. *Critical Reviews in Microbiology*. 2010, 1: 1-14.
5. Cecchinato V., Trindade CJ., Laurens A. et al. Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal Immunology*. 2008, 1 (4): 279-288.
6. Core C., Munro K., Lay Ch. et al. Bifidobacterium pseudocatenulatum is associated with atopic eczema: a nested case-control study investigating the fecal microbiota of infants. *Journal Allergy Clinical Immunology*. 2008, 121: 135-140.
7. Dillona S.M., Daniel N. Franka D.N., Wilsona C.C. The gut microbiome and HIV-pathogenesis: a two-way street. *AIDS*. 2016, 30: 2737-2751.
8. Dinh D., Volpe G., Duffalo C. et al. Intestinal microbiota, microbial translocation and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J. Infection Diseases*. 2015, 211: 19-27.
9. Dubourg G. Impact of HIV on the human gut microbiota: challenges and perspectives. *Human Microbiome J*. 2016, 2: 3-9.
10. Dubourg G. Microbiome of HIV-infected people. *Microbial Pathogenesis*. 2017, 106: 85-93.
11. Eberhardt K. A., Sarfo F.S., Dompok A. Helicobacter pylori coinfection is associated with decreased markers of immune activation in ART-naive HIV-positive and in HIV-negative individuals in Ghana. *Clinical Infectious Diseases*. 2015, 10 (61):1615-1623.
12. Goedert. J.J. Effects of HIV, immune deficiency, and confounding on the distal gut microbiota. *EBioMedicine*. 2016, 5: 14-15.
13. Hensley-McBain T., Zevin A., Manuzak J. et al. Effects of fecal microbial transplantation on microbiome and immunity in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Virology*. 2016, 10 (90): 4981-4989.
14. Jenabian M., El-Far M., Vyboh K. et al. Immunosuppressive tryptophan catabolism and gut mucosal dysfunction following early HIV infection. *J. Infection Disease*. 2015, 3 (212): 355-366.
15. Kutikhin A.G., Yuzhalin A.E., Brusina E.B. Infectious agents and cancer. Germany: Springer, 2013.
16. Littman D.R., Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010, 6 (140): 845-858.
17. Lozupone C.A., Li M., Campbell T.B. et al. Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection. *Cell Host and Microbe*. 2013, 14: 329-339.
18. Lozupone C. A., Rhodes M., Neff C. et al. HIV-induced alteration in gut microbiota: driving factors, consequences and effects of antiretroviral therapy. *Gut Microbes*. 2014, 4 (5): 562-570.
19. Ma W., Zhang L., Zeng P. et al. An analysis of human microbe-disease associations. *Briefings in Bioinformatics*. 2017, 18 (1): 85-97.
20. Manner I., Baekken M., Klave D. et al. Markers of microbial translocation predict hypertension in HIV-infected individuals. *HIV Medicine*. 2013, 6 (14): 354-361.
21. McHardy I.H., Li X., Tong M. et al. HIV infection is associated with compositional and functional shifts in the rectal mucosal microbiota. *Microbiome*. 2013, 1 (1): 26.
22. Monaco C.L., Gootenberg D.B., Zhao G. et al. Altered virome and bacterial microbiome in Human immunodeficiency virus-associated acquired immunodeficiency syndrome. *Cell Host and Microbe*. 2016, 19: 311-322.
23. Mudd J.C., Brenchley J.M. Gut mucosal barrier dysfunction, microbial dysbiosis, and their role in HIV-1 disease progression. *J. Infectious Diseases*. 2016, 214 (suppl 2): 58-66.
24. Munier A., V.de Lastours, Porcher R. et al. Risk factors for invasive pneumococcal disease in HIV-infected adults in France in the highly active antiretroviral therapy era. *International J. Sexually-Transmitted Diseases and AIDS*. 2014, 14 (25): 1022-1028.

25. Noguera-Julian M., Rocafornt M., Guillén Y. et al. Gut microbiota linked to sexual preference and HIV infection. *EBioMedicine*. 2016, 5:135-146.
26. Nowak P., Troseid M., Avershina E. et al. Gut microbiota diversity predicts immune status in HIV-1 infection. *AIDS*. 2015, 18 (29): 2409-2418.
27. Perez-Santiago J., Gianella S., Massanella M. et al. Gut Lactobacillales are associated with higher CD4 and less microbial translocation during HIV infection. *AIDS*. 2013, 12 (27): 1921-1931.
28. Preziosi M.J., Kandel S.M., Guiney D.G. et al. Microbiological analysis of nontyphoidal *Salmonella* strains causing distinct syndromes of bacteremia or enteritidis in HIV/AIDS patients in San Diego, California. *J. Clinical Microbiology*. 2012, 11 (50): 3598-3603.
29. Sandler N.G., Douek D.C. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nature Reviews Microbiology*. 2012, 9 (10): 655-666.
30. Sinha A., Ma Y., Scherzer R. et al. Association of gut microbiota dependent metabolites and atherosclerosis in HIV. *J. American College of Cardiology*. 2016, 67 (13): 2240.
31. Stiksrud S., Nowak P., Nwosu F.C. et al. Reduced levels of D-dimer and changes in gut microbiota composition after probiotic intervention in HIV-infected individuals on stable ART. *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2015, 4 (70): 329-337.
32. Yang L., Poles M., Fisch G.S. et al. HIV-induced immunosuppression is associated with colonization of the proximal gut by environmental bacteria. *AIDS*. 2016, 1 (30): 19-29.
33. Yu G., Fadrosch D., Ma B. et al. Anal microbiota profiles in HIV-positive and HIV-negative MSM. *AIDS*. 2014, 5 (28): 753-760.
34. Zilberman-Schapira G., Zmora N., Itav N. S. et al. The gut microbiome in human immunodeficiency virus infection. *BMC Medicine*. 2016, 1 (14): 83.

Поступила 15.10.17

Контактная информация: Захарова Юлия Викторовна, к.м.н.,
650056, Кемерово, ул. Ворошилова, 22 А, р. т. (3842) 73-28-71

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

А.М.Земсков¹, В.М.Земсков², В.А.Земскова¹, Р.И.Сепиашвили³, В.И.Золоедов¹

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ У БОЛЬНЫХ ИЗ ГРУПП РИСКА

¹Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н.Бурденко; ²Институт хирургии им. А.В. Вишневского, Москва; ³Российский университет дружбы народов, Москва

Основанные на данных литературы и собственных исследований проанализированы особенности инфекционной заболеваемости, иммунных расстройств, принципов их направленной коррекции у больных из групп риска: беременных, родильниц, детей, родившихся при физиологической и патологической беременности, пожилых лиц.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 109—119

Ключевые слова: инфекционные заболевания у беременных, детей и пожилых, иммунные расстройства, иммунодефициты, иммунокоррекция

A.M.Zemskov¹, V.M.Zemskov², V.A.Zemskova¹, R.I.Sepiashvili³, V.I.Zolodov¹

INFECTION AND IMMUNITY IN PATIENTS WITH RISK GROUPS

¹Burdenko Voronezh State Medical University; ²Vishnevsky Institute of Surgery, Moscow; ³People's Friendship University, Moscow, Russia

Based on the data of the literature and their own studies, the features of infectious morbidity, immune disorders, the principles of their directed correction in patients at risk: pregnant women,

puerperas, children born at physiological and pathological pregnancy, elderly persons are analyzed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 109—119

Key words: infectious diseases in pregnant women, children and elderly, immune disorders, immunodeficiencies, immunocorrection

Объективной реальностью в современном мире является повышение риска развития, изменение спектра, этиологии, патогенеза, клинического течения, лабораторной диагностики, осложнения лечения и профилактики инфекционных заболеваний, в том числе, эмерджентных [7, 11].

Причинами указанной закономерности явились: изменчивость микроорганизмов, диагностическая и лечебная агрессия (>3000 вмешательств), скученность до 60 млн больных на площади 12 — 15 км² в медицинских учреждениях, протезирование функции иммунной системы вакцинами, сыворотками, гормонами, модуляторами, эволюционная неподготовленность населения к НТР, снижение качества жизни и здоровья, старение, неполноценное питание (ГМО), усиление миграционных процессов [6, 10]. Эти обстоятельства обусловили негативный эпидемический прогноз на XXI век, особенно для групп риска — беременных, родильниц, детей и стариков [8].

1. Инфекция и иммунитет у беременных. Установлено, что у беременных женщин частота цитомегаловирусной инфекции составляет от 13 до 91%, герпетической — от 7 до 47%, хламидиозной — от 25 до 40%, микоплазменной — от 17 до 50%, уреоплазменной — от 25 до 75%. Частота заражения плода составляет от 5 до 60% в зависимости от сроков беременности, характера возбудителя, состояния иммунной реактивности. При внутриутробном инфицировании почти 50% детей умерли в первые 6 месяцев и 88% — в возрасте до 1 года [4].

Инфекционно-воспалительные заболевания у беременных, с одной стороны, опасны для самой женщины, а с другой — являются угрозой для плода, особенно при скрытом инфицировании. Так, вирусные инфекции (полиомиелит, гепатиты А и В, грипп, генитальный герпес, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр) способны вызывать дистрофию печени, острый панкреатит, пиелонефриты, энцефалиты, анемию, миокардиты, образование аутоантител к антигенам яичников, труб, матки, способствуют индукции воспаления, аутоиммунных процессов, аллергизации; бактериальные — брюшной тиф, гонорея, листериоз, туберкулез, а также токсоплазмоз, амебиоз, лямблиоз, хламидиоз, микоплазмоз, гарднереллез возникают чаще и текут более тяжело с высокой хронизацией и резистентностью к лечению.

Формирующийся в периоде беременности дефицит местных и общих факторов иммунитета (sIgA), поглотительной, метаболической, хемотаксической способности фагоцитов, угнетение Т-зависимых реакций в последнем триместре способствуют развитию острых, подострых, хронических форм вагинитов, цервицитов, параметритов, пельвиоперитонитов, пиосальпингитов, вызванных стафилококковой, анаэробной бактериальной, грибковой инфекциями, условно патогенными возбудителями [5, 6].

2. Влияние инфекций беременных на плод. Грипп способен обуславливать в первом триместре 50% выкидышей с ростом вероятности врожденных уродств. Допустима вакцинация беременных женщин при эпидемиях инактивированной вакциной А и В. Герпетическая инфекция в первой половине беремен-

ности увеличивает частоту выкидышей, во второй — преждевременных родов. Вирус простого герпеса у женщин с привычным невынашиванием определяется в 55% без клинического проявления, в 10% возможны периодические обострения с высыпаниями и кожным зудом. Обычно возбудитель ассоциирован с цитомегаловирусом, хламидиями, микоплазмами с вероятным исходом в хронический эндометрит. Трансплантационный перенос нередок. Возможен врожденный синдром — с микроцефалией, внутричерепными кальцификатами, хориоретинитами. Ребенок обычно инфицируется в процессе родов при наличии высыпаний в родовых путях. Болезнь проявляется в диссеминированной или локализованной формах уже на 4 — 5 день. Поражаются печень, мозг, надпочечники, легкие, другие органы. Дети погибают от пневмонии, коагулопатии, энцефалита. Вирус полиомиелита в 25% внутриутробно передается плоду с развитием параличей, однако тератогенных свойств не имеет. Во время эпидемий беременных женщин можно прививать убитой вакциной. Вирус краснухи при первичном заболевании в первом триместре обуславливает высокий процент выкидышей и врожденных уродств: ретинопатию, катаракту, открытый артериальный проток, стеноз легочной артерии, глухоту, тромбоцитопению, поражения ЦНС. При отсутствии в крови женщины IgG против вируса вне беременности возможна прививка ослабленной живой вакциной. Во время беременности иммунизация противопоказана. Вирус кори тератогенных свойств не имеет, но вызывает состояние анергии, провоцирует развитие бактериальных осложнений с высоким риском прерывания беременности у серонегативных женщин. Для профилактики в первые 6 часов после контакта с больным желателен ввод гаммаглобулина человека нормального для внутривенного введения (октагама, сандоглобулина).

Острый вирусный гепатит А протекает относительно легко. Если мать перенесла заболевание во время беременности, проведение иммунизации новорожденного не требуется, поскольку IgG переходит через плаценту. Если беременная была серонегативна и находилась в контакте с больным разрешена пассивная иммунопрофилактика нормальным иммуноглобулином человека (в первые 14 суток).

Острый вирусный гепатит В вызывает гибель плода, выкидыши, преждевременные роды. В 60 — 80% новорожденные становятся хроническими носителями с отдаленным риском развития гепатоцеллюлярной карциномы. Поэтому всем детям, рожденным от HBS положительных матерей, сразу после рождения вводят внутривенно иммуноглобулин человека нормальный или специфический гипериммунный, а в первый день жизни ребенка реализуют активную вакцинацию. Острый вирусный гепатит С редко передается плоду, в комплексе с ВИЧ риск заболевания возрастает. Острый вирусный гепатит Е представляет опасность для женщин в III триместре беременности, этиотропное лечение и иммунная профилактика инфекции отсутствуют. Цитомегаловирусная инфекция опасна в плане внутриутробного инфицирования с частотой 1%. Вызывает прерывание беременности, врожденную патологию — умственную отсталость, менингоэнцефалиты, пневмонии, гепатиты, поражения сетчатки вплоть до слепоты, кальцификаты мозга, тромбоцитопении. При инфицировании возможна пассивная вакцинация беременных и новорожденных препаратом цитотект, содержащим повышенные титры IgG к ЦМВ.

Первичный уrogenитальный хламидиоз может вызывать преждевременные роды, послеродовой эндометрит. Внутриутробное инфицирование плода про-

исходит крайне редко, но в родах заражение составляет 40%. У новорожденных заболевание проявляется в виде конъюнктивитов, офтальмохламидиоза, пневмоний. Реже развиваются генерализованные инфекции с поражением легких, почек, сердца, пищеварительного тракта, печени, а также энцефалопатия с судорогами.

Паразитарные инфекции: врожденный токсоплазмоз может возникнуть, если женщина впервые заразилась во время беременности и у нее нет специфических IgG. В этом случае может произойти внутриутробное заражение плода. Различают несколько форм заболевания: неонатальный, клинически манифестный; манифестный, в первые месяцы жизни; резидуальные (остаточные) проявления у детей и подростков ранее недиагностированного токсоплазмоза; бессимптомный.

3. Общие принципы лечения инфекций у беременных. Предпочтительны антибиотики с иммуностимулирующими свойствами (макролиды), местные антисептики с десенсибилизирующим и модулирующим действием, витамины, микроэлементы, усиливающие регенерацию эпителия, цитокины с противовоспалительной направленностью, кортикостероиды, антигистаминные препараты. Антимикробная терапия во время беременности должна учитывать: вероятность токсического действия на плод; увеличенный объем циркулирующей крови, почечный кровоток и др., что требует увеличения доз лекарственных средств, исключения назначения женщинам фторхинолонов (ципрофлоксацина, офлоксацина, метронидазола), тетрациклинов. Противовирусное лечение интерферонами, интерферонгенами и др. назначается максимально рано. Для мягкой стимуляции иммунной реактивности допустимо применение нуклеината натрия, неовира, ликопида, миелопида, полиоксидония, суппозиториев кипферона, виферона, суперлимфа, адаптогенов, биостимуляторов, эубиотиков.

4. Инфекция и иммунитет у родильниц. Послеродовые инфекционно-воспалительные заболевания встречаются в 13,3 — 54,3% случаев и занимают 2 — 4 место среди причин материнской смертности. Большую часть составляет эндометрит с частотой после самопроизвольных родов от 6,3 до 49,5%, операция кесарева сечения увеличивает риск развития осложнения в 5 — 10 раз. Другим представителем инфекционно-воспалительных осложнений является раневая инфекция, на долю которой приходится от 3 до 20% всей послеродовой гнойно-септической заболеваемости. Риск возникновения тяжелых форм гнойно-септических заболеваний, перитонит и сепсис, составляет у родильниц 0,47 — 2% с летальностью 32,9% [6].

В этиологии послеродовых инфекционных заболеваний ведущую роль играют микробные ассоциации (более 80%), обладающие более патогенными свойствами, чем монокультуры. В последние годы происходит очевидная смена возбудителей акушерской инфекции за счет хламидий, вирусов цитомегалии, стрептококков группы В, неспорообразующих анаэробов.

Осложнения послеродового периода вызваны изменением характера микрофлоры в связи с нерациональным лечением. Так, под влиянием антибиотикотерапии нарушается эволюционно-экологическое равновесие между представителями конкурентной сапрофитной флоры и патогенными микроорганизмами, что влечет значительные изменения биологических свойств некоторых микробов и рост их вирулентности. При этом условно патогенная флора приобретает свойства патогенной, с синергичным действием бактерий в микробной ассоциации — микстинфекция, вызывающая тяжелые воспалительные процессы, трудно поддающиеся традиционному лечению. В связи с

этим, чаще стало обнаруживаться несоответствие между местными проявлениями нагноений и общим статусом больных, труднее стало диагностировать начальные этапы болезни.

Влагалище в норме колонизировано смешанной микрофлорой с низкой вирулентностью. Послеродовые инфекции обычно полиэтиологичны и связаны с попаданием микрофлоры кишечника на промежность и во влагалище. У женщин с эндометритом, развившимся в течение 48 часов после родов, более чем в 60% случаев обнаружилось ассоциация двух или более микроорганизмов. У более чем половины родильниц с послеоперационным эндометритом выделены одни и те же микроорганизмы из прямой кишки, влагалища и полости матки. Обычно высеваются кишечная палочка, условно патогенные грамположительные кокки (особенно стрептококки групп А и В), часто в сочетании с микоплазмами. К этому следует добавить то, что обнажившаяся после отделения плаценты стенка полости матки представляет собой обширную раневую поверхность, а оставшиеся в матке части плодного яйца и сгустки крови создают прекрасную питательную среду для роста бактерий. Кроме того, роды через естественные родовые пути сопровождаются разрывами мягких тканей (матки, шейки матки и влагалища), и хотя далеко не все из них нуждаются в ушивании, они, тем не менее, могут становиться воротами для инфекции. Такая же опасность угрожает и послеоперационным ранам (после кесарева сечения или эпизиотомии).

В родах возникают дополнительные факторы, способствующие развитию послеродовых инфекционных заболеваний: преждевременное излитие околоплодных вод, затяжные роды, необоснованная ранняя амниотомия, многократные влагалищные исследования, инвазивные методы исследования состояния плода в родах, нарушения санитарно-эпидемиологического режима в акушерском стационаре. В связи с отхождением слизистой пробки, являющейся механическим и иммунным препятствием для микроорганизмов, теряется один из физиологических противоиных барьеров женского полового тракта. Излитие околоплодных вод вызывает повышение рН (снижение кислотности) влагалищного содержимого — полное отсутствие секреторного IgA, что резко снижает местную секреторную защиту. Так, через 6 часов после излития околоплодных вод практически не остается ни одного противоиных барьера женского полового тракта, а степень обсемененности и характер микрофлоры зависят от длительности безводного промежутка [3].

Существенная роль в возникновении и течении инфекционного процесса в послеродовом периоде принадлежит системным защитным механизмам. Установлено, что у здоровых женщин во время беременности и в ранние сроки послеродового периода наблюдается транзиторный частичный иммунодефицит (уменьшение абсолютного числа В-лимфоцитов и «нулевых» клеток — больших гранулярных лимфоцитов, пролиферативной активности лимфоцитов, концентрации IgG в сыворотке крови). При развитии воспалительных осложнений после родов отмечаются лимфопения и достоверное снижение абсолютного числа Т- и В-лимфоцитов, дисбаланс регуляторных субпопуляций, дефицит концентрации IgG, IgM, IgA, комплемента, избыток циркулирующих иммунных комплексов, угнетение поглотительной способности фагоцитов, ЦИК.

5. Принципы лечения гнойно-воспалительных заболеваний у родильниц. Кроме адекватной антибактериальной, противовоспалительной, детоксифицирующей, антигистаминовой, симптоматической терапии пациенткам рекомендовано:

введение нормальных, донорских и специфических иммуноглобулинов человека; активаторов гуморального иммунитета — миелопептидов, диуцифона; при наличии вирусных поражений — тимомиметиков (имунофана), интерферонов, интерферогенов, в том числе региональных — суперлимфа, виферона, кипферона; стимуляторов фагоцитоза — полиоксидония, ликопида, гепона, тамерида; метаболитов и антиоксидантов — гипоксена, лимонтара, милайфа; эубиотиков.

6. *Инфекции и иммунитет у детей.* Несмотря на создание новых антибактериальных, противовирусных препаратов, эффективных вакцин, современных диагностических приемов инфекционная заболеваемость детей составляет не менее 60 — 70% всей патологии человека. Существенно меняется возрастная структура инфекционной патологии. Более 600 тыс. детей в РФ — инвалиды, и более чем у 30% из них инвалидность развилась на фоне инфекционных заболеваний. При этом в стране снижается заболеваемость корью, эпидемическим паротитом, краснухой, гепатитами за счет прививок, соответствующих программ ВОЗ, практически нет паралитических форм полиомиелита [3, 4].

В то же время, отмечается некоторое «взросление» кори, замедление снижения частоты коклюша и развитие этой инфекции у привитых контингентов. Тревожен факт роста неуправляемых инфекций: острых кишечных инфекций, вызванные установленными возбудителями — на 11,4%, геморрагическими лихорадками — в 1,8 раза, трихинеллезом — в 2 раза. Наиболее высока заболеваемость респираторными инфекциями и гриппом. При этом риск гриппа снижается, а ОРВИ — растет. Частота цитомегаловирусной, герпесвирусной, хламидийной, микоплазменной инфекций составляет до 24%, в основном у детей 2 — 5 лет.

Преобладающей патогенной флорой в зеве является золотистый стафилококк и β -гемолитический стрептококк группы А. Условно патогенные микроорганизмы с обильным ростом без учета грибов и ассоциаций с патогенами обнаруживаются у 24,7%: из них *Streptococcus viridans* — 52,2%, *Staphylococcus epidermidis* — 30,4%, грибы рода *Candida* — у 9,7% дошкольников.

7. *Заболеваемость детей при осложненной беременности и родах.* При проведении корреляционного анализа у детей обнаружена прямая корреляционная связь между фагоцитарным числом в пуповинной крови и длительным безводным промежутком у матери. Обратная зависимость выявлена между гестозом и уровнем CD95+ лимфоцитов, НСТакт, положительная — с CD8+ лимфоцитами. Разнонаправленные связи определялись на 5 сутки между концентрацией IgG, расстройством дыхания, длительностью проведения искусственной вентиляции легких и острой почечной недостаточностью, продолжительностью желтухи у новорожденных. Также отмечалась однонаправленная прямая взаимозависимость между уровнем CD95+ лимфоцитов и многоводием, CD56+ лимфоцитами и перинатальным поражением ЦНС. В свою очередь, у детей, рожденных женщинами с вагинальным кандидозом, эндометритом во время беременности, выявлена отрицательная связь НСТакт с маловодием, CD4+ лимфоцитов — с многоводием. Также обнаружена отрицательная корреляционная ассоциация между уровнем IgG в пуповинной крови и герпесвирусной инфекцией у матери во время беременности.

Есть данные влияния иммунного статуса на степень резистентности у детей, перенесших тяжелую асфиксию. Так, установлена статистически значимая отрицательная связь уровня CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ лимфоидных клеток и степени антиинфекционной резистентности новорожденных. Уровень IgA

в пуповинной крови коррелировал с атопическим дерматитом и анемией, а CD56+ лимфоцитов — с дисбиозом кишечника, инфекцией мочевыводящих путей, вульвовагинитом.

Таким образом, соматическая и гинекологическая патология матери, осложненное течение беременности, асфиксия и реанимационные мероприятия у новорожденных оказывают негативное влияние на формирование иммунного статуса новорожденного, антиинфекционную резистентность, что является основанием для проведения иммунотерапии [1].

8. *Иммунология детства.* Здоровый доношенный ребенок, рожденный здоровой матерью с физиологическим течением беременности, имеет определенный иммунный статус и уровень факторов неспецифической антиинфекционной резистентности. Период новорожденности, особенно ранний период адаптации, является определяющим с точки зрения выживания и качества последующей жизни. Развитию инфекционно-воспалительных заболеваний бактериальной, вирусной и грибковой этиологии у новорожденных и особенно недоношенных детей способствуют: малая трансплацентарная передача материнских АТ класса G до 35 — 36 недели гестации; неспособность В-лимфоцитов плода и новорожденного к переключению синтеза IgM на IgG; повышенное потребление Ig в раннем периоде адаптации при колонизации кожи и слизистых оболочек микрофлорой окружающей среды; апоптоз незрелых В-клеток новорожденных при массивной микробной инвазии (2, 13).

В настоящее время в жизни ребенка выделяют шесть критических периодов (КП), которые характеризуются наибольшей ранимостью организма. Первый КП. Во внутриутробном периоде критическим следует считать возраст 8 — 12 недель, когда происходит дифференцировка органов и клеток иммунной системы. Вторым КП после рождения является период новорожденности, когда организм подвергается действию огромного числа антигенов, а иммунная система — сильным супрессорным влиянием. Пассивный гуморальный иммунитет обусловлен материнскими антителами. Отмечается функциональный дисбаланс Т-лимфоцитов, супрессорную функцию реализуют не только цитотоксические CD8+ клетки, но и незрелые тимоциты, другие клетки. Третий КП (3 — 6 мес.) характеризуется ослаблением пассивного гуморального иммунитета в связи с катаболизмом материнских антител. При этом супрессорная направленность иммунных реакций сохраняется при наличии выраженного лимфоцитоза. На большинство антигенов развивается первичный иммунный ответ с преимущественным синтезом IgM без формирования иммунной памяти. Такой тип реакции наступает при вакцинации против столбняка, дифтерии, коклюша, полиомиелита, кори, и только после 2 — 3 ревакцинации развивается вторичный иммунный ответ с образованием IgG и стойкая иммунная память. Четвертый КП — 2 год жизни. В это время сохраняется первичный характер иммунного ответа на многие антигены, но со способностью переключения на образование IgG. При этом синтез субклассов IgG2 и IgG4 запаздывает. Супрессорная направленность иммунных механизмов начинает сменяться хелперной. Система местного иммунитета не развита, дети чувствительны к респираторным вирусным инфекциям. Пятый КП — 4 — 6 годы жизни. В этом возрасте средняя концентрация IgG и IgM в крови соответствует уровню таковой у взрослых, концентрация IgA в плазме еще не достигает окончательных значений, содержание IgE в крови достигает максимальной величины. Данный период характеризуется высокой частотой атопических, паразитарных, иммунокомплексных заболеваний. Шестой КП

— подростковый возраст (у девочек с 12 — 13 лет, у мальчиков с 14 — 15 лет). Пубертатный скачок роста сочетается с уменьшением массы лимфоидных органов, повышением секреции половых гормонов (прежде всего андрогенов), что ведет к подавлению клеточного и стимуляции гуморального звена иммунитета.

Также существуют клинические группы высокого риска развития ОРВИ: первая — новорожденные и дети раннего возраста (несколько месяцев — 2 года) с физиологическим иммунодефицитом; вторая — дети с поздним стартом иммунобиологической реактивности; третья — дети с низкой массой тела, несбалансированным кормлением, гипотрофией; четвертая — дети от больных беременных женщин (вирусные инфекции, пиелонефриты, уретриты, пиодермии и др.); пятая — дети старшего возраста с хроническими заболеваниями сердца, легких, почек и др.

9. Принципы иммунотерапии детей. В настоящее время в неонатологии разрешено использовать препараты иммуноглобулинов для внутривенного введения, стандартные (интраглобин, октагам, габриглобин, иммуновенин), обогащенный IgM (пентаглобин), гипериммунные (цитотект, гепатект), а также модуляторы ликопад, виферон, пентоксифиллин. У более старших детей, часто болеющих, страдающих менингитами, средними отитами, увеопатиями, бронхолегочной патологией, пиело- и гломерулонефритами, гепатитом А показано применение тактивина, тималина, тимомодулина, имунофана, лейкинферона, неовира, виферона, суперлимфа, миелопида, нуклеината натрия, эсберитокса, метиндола, димефосфана, полисорба, низкоинтенсивного лазерного излучения, кварцитина, пангамовой кислоты, пентоксила, метилурацила др. [2, 4].

10. Инфекционная заболеваемость в пожилом и старческом возрасте. Старение является следствием взаимодействия различных эндогенных и экзогенных повреждающих агентов с генетическим материалом клетки, приводящих к постепенному накоплению случайных мутаций в геноме соматических клеток.

Возрастной иммунодефицит характеризуется особенностью формирования клинических синдромов — чаще инфекционного и аутоиммунного, реже — аллергического и иммунопролиферативного. Как правило, в пожилом и старческом возрасте развиваются хронические рецидивирующие бактериальные, вирусные, грибковые инфекции кожи и слизистых оболочек (пиодермии, фурункулезы, абсцессы, герпес, кандидоз, конъюнктивит, стоматит), хронические бронхиты, пневмонии, урогенитальные поражения (хронические вульвиты, циститы, пиелонефриты), гастроэнтеропатии с длительной диареей, дисбактериозами, длительным субфебрилитетом и лихорадкой неясной этиологии, генерализованные инфекции [4].

В силу возрастного повреждения механических барьеров (кожи и слизистых) увеличивается их проницаемость, что сопровождается проникновением во внутреннюю среду организма аллергенов, индуцирующих формирование отягощающего аллергического синдрома.

Низкоэффективный ответ организма на вакцинации, антигены, с высокой чувствительностью к патогенным, условно патогенным, сапрофитным микроорганизмам в старческом возрасте вызывает повышение частоты инфекционной патологии с неблагоприятным исходом. При этом атеросклероз, сердечно-сосудистая, цереброваскулярная патология являются отягощающими факторами.

11. Иммунология пожилого и старческого возраста. Показана несомненная

связь процессов старения с состоянием иммунной системы: 1. Прогрессирующая атрофия тимуса, значительное торможение продукции тимических гормонов (полипептидов), всей лимфоидной системы (селезенки, лимфатических узлов). 2. Снижение количества «зрелых» Т-лимфоцитов в тимусе и периферической крови с увеличением числа незрелых и активированных лимфоцитов (маркеров воспалительного процесса). 3. Уменьшение разнообразия антигенного репертуара лимфоцитов и вообще числа «наивных» клеток. 4. Угнетение противоопухолевой устойчивости организма. 5. Выявлено сходство «старческих изменений» и процессов, наблюдаемых при ранней тимэктомии и иммунодефицитных состояниях. 6. Недостаточная способность лимфоцитов активироваться собственными клетками организма свидетельствует об ослаблении контролирующей, «надзорной» функции иммунной системы. 7. Повышение чувствительности к оппортунистическим вирусным и бактериальным инфекциям обусловлено дисбалансом Т-клеток памяти и «наивных» Т-лимфоцитов со снижением пролиферативного ответа; отсутствием существенной реакции В-лимфоцитов, фагоцитоза, естественных киллеров; повышением продукции провоспалительных цитокинов [5, 9, 12 — 15].

Темп старения организма в целом зависит от состояния центрального органа иммунитета — тимуса, который достигает максимального развития к 1 году жизни. Среднегодовой темп инволюции составляет 1 — 3%, что обеспечивает резервные возможности органа до глубокой старости. Вилочковая железа к 10 — 15 годам достигает массы 30 — 40 г, затем постепенно уменьшается, достигая 10 — 13 г в 70 — 90-летнем возрасте.

Общее содержание лимфоцитов в периферической крови резко падает с 5 млрд/л в раннем возрасте до 2 млрд/л к 20 годам. Затем эти количественные параметры сохраняются в течение последующих 30 лет жизни. С конца четвертого десятилетия число лимфоидных клеток снижается, составляя до 1,5 млрд/л у стариков старше 80 лет. При этом максимальный иммунный ответ регистрируется в периоде полового созревания, а в старости он составляет всего лишь 1 — 2% от уровня у молодых.

Т-звено иммунитета страдает более всего, что связано с уменьшением количества и дефектностью функционирования стволовых клеток. Одновременно затормаживается вступление старых клеток в митотический цикл, изменяется соотношение регуляторных субпопуляций лимфоцитов на фоне общей лимфопении.

В-звено. Наблюдается перестройка этой популяции — снижение циркулирующего пула, изменения спектра антител, его специфичности, изотипа, аффинитета и idiotипа, уменьшение образования IgG с протективными свойствами против патогенных возбудителей, концентрация нормальных антител. Особенно страдает первичный иммунный ответ. На вакцинацию вырабатываются низкоavidные IgM, и лишь вторичная иммунная реакция в старости оказывается более сохраненной.

Аллергия. Исследование реакции ГЗТ пожилых и старых людей свидетельствует о сниженной реактивности на антигены, с которыми они контактировали в молодости. К этому надо добавить угнетение аллергических реакций третьего типа (иммунокомплексных) и ингибицию синтеза IgE (аллергия первого типа). Вместе с тем, снижение барьерной функции кожи и слизистых оболочек способствует более легкой сенсibilизации организма химическими веществами, возбудителями, их токсинами и т. п. Все это увеличивает риск развития в старости бронхиальной астмы.

Факторы неспецифической антиинфекционной резистентности ингибируются меньше. Падает функциональная активность макрофагов, сегментоядерных нейтрофилов, с сохранением общего количества. Дыхательный взрыв в вспомогательных клетках пожилых и старых людей снижается на 45 — 70%. Уменьшается активность лизоцима, общая бактерицидность сыворотки крови, образование интерферона, менее выражена воспалительная реакция. Содержание комплемента увеличивается у мужчин на шестом десятке жизни, у женщин — на 10 лет позже, далее происходит его снижение. Большая чувствительность пациентов пожилого и старческого возраста к бактериям и грибам обусловлена популяционными изменениями этих клеток за счет снижения пролиферативного ответа на раздражители. С возрастом угнетение фагоцитарного индекса оказывается большим, чем общая фагоцитарная активность. Особенно страдает интенсивность внутриклеточного киллинга бактерий активными формами кислорода.

Иммунотерапия лиц пожилого и старческого возраста включает гормональную компенсаторную коррекцию половыми гормонами, назначение тимомиметиков — тактивина, тималина, имунофана, тимогена и др.; цитокиновую терапию — ронколейкином, лейкоцитарными интерферонами α и γ , комплексом цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-4, α -ФНО). Назначается суперлимф, миелопептиды, осуществляется моноклональная супрессия провоспалительных и супрессорных цитокинов антителами, компенсация нуклеиновыми препаратами дефицита пула низкомолекулярных нуклеиновых кислот. В целом в геронтологической практике отдается предпочтение сывороточным препаратам, корректорам нуклеинового происхождения, комбинированной, комплексной, иммунометаболической терапии с увеличением разовых, курсовых дозировок, кратности, продолжительности введения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бугрым Н.В. Особенности клеточного и гуморального иммунитета у новорожденных, перенесших тяжелую асфиксию. Дис. канд. мед. наук. Воронеж, 2011.
2. Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Дмитриева С.В. и др. Справочник по иммунотерапии. М., Диалог, 2002.
3. Земсков А.М., Земсков В.М., Коротких И.Н. и др. Иммунные расстройства и их коррекция при гнойно-воспалительных процессах. Москва, Триада-Х, 2007.
4. Земсков А.М., Земсков В.М., Черешнев В.А. (ред.). Энциклопедия иммунологии. М., Триада-Х, 2013.
5. Земсков А.М., Земсков В.М., Земскова В.А., Золоедов В.И. Настольная книга клинического иммунолога. Теоретические, практические и прикладные аспекты клинической иммунологии на современном этапе. М., Триада-Х, 2015.
6. Земсков А.М., Есауленко И.Э., Черешнев В.А. и др. Курс лекций по клинической иммунофизиологии. Учебник для студентов медицинских вузов и факультетов. Воронеж, Ритм, 2017.
7. Покровский В.И. (ред.). Руководство по клинической иммунологии, аллергологии, иммуногенетике и иммунофармакологии (для врачей общеклинической практики). М., 2005.
8. Покровский В.И. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи и информационный материал по ее положениям. Н. Новгород., Ремедиум Приволжье, 2012.
9. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И. Инфекционные болезни и эпидемиология. М., ГЭОТАР-Медиа, 2013.
10. Потапов А.И. (ред.). Иммuno-агрессивное действие эколого-гигиенических факторов. М., Медицина, 2011.
11. Лабинская А.С., Волина Е.Г. (ред.). Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. М., БИНОМ, 2008.

12. Семенков В.Ф., Карандашов В.И., Ковальчук Л.В. Иммуногеронтология. М., Медицина, 2006.
13. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Иммунные синапсы: от теории к клинической практике. Молекулярная медицина. 2008, 1:14-22.
14. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И. Роль цитокинов в иммунопатологии. Аллергология и иммунология. 2005, 6(1):42.
15. Сепиашвили Р.И. Физиология иммунной системы. М., Медицина-Здоровье, 2015.

Поступила 25.12.17

Контактная информация: Сепиашвили Реваз Исмаилович, д.м.н., проф.,
117513, Москва, ул. Островитянова, 4, р.т. (495)735-14-14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Т.Е.Сизикова, В.Н.Лебедев, Н.В.Карулина,
О.В.Чухралья, С.И.Сыромятникова, С.В.Борисевич*

НЕКОТОРЫЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИРУСА ЭБОЛА В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ

48 Центральный НИИ МО РФ, Сергиев Посад, Московская обл.

Вирус Эбола, являющийся представителем рода *Ebolavirus* семейства *Filoviridae*, вызывает у человека геморрагическую лихорадку с летальностью до 90 %. Род *Ebolavirus* включает вирусы Эбола-Заир, Эбола-Судан, вирус Эбола-Рестон, Эбола-Tai Forest и Эбола-Bundibugyo. В обзоре приведены сведения об эпидемических вспышках заболевания, резервуаре инфекции, животных, являющихся «случайными» хозяевами вируса. Данные о природных хозяевах есть только для вирусов Эбола-Заир и Эбола-Рестон. Для вирусов Эбола-Судан, Эбола-Bundibugyo и Эбола-Tai Forest подобная информация отсутствует. Природным резервуаром вирусов Эбола-Заир и Эбола-Рестон являются представители отряда рукокрылых (летучие мыши и крыланы). Процесс формирования природного резервуара филонированных вирусов допускает возможность существования нескольких хозяев. Взаимоотношения возбудителя и хозяев, а также динамика инфекционного процесса соответствуют классической схеме: «чувствительный хозяин — инфицирование — иммунитет». Предложена возможная схема возникновения эпидемических вспышек заболевания, вызываемых вирусом Эбола-Заир.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 119—126

Ключевые слова: вирус Эбола, геморрагическая лихорадка, экологические характеристики, природный очаг, эпидемическая вспышка, резервуар инфекции, случайные хозяева, летучие мыши

*Т.Е.Сизикова, В.Н.Лебедев, Н.В.Карулина,
О.В.Чухралья, С.И.Сыромятникова, С.В.Борисевич*

A SOME ECOLOGICAL CHARACTERISTICS OF EBOLA VIRUS IN NATURAL FOCIES

48 Central Research Institute of the Ministry of the Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Moscow Region, Russia

Ebola virus that composed *Ebolavirus* genus of *Filoviridae* Family causes severe hemorrhagic fever in humans with high case-fatality rates (up to 90%). The *Ebolavirus* genus includes Ebola-Zaire, Ebola-Sudan, Ebola-Reston, Ebola-Tai Forest and Ebola-Bundibugyo viruses. The date about epidemic outbreaks of disease, reservoirs of infection, accidental hosts of Ebola virus are presented in this review. The date about natural reservoirs of infection are accessed only for Ebola-Zaire and Ebola-Reston viruses. For Ebola-Sudan, Ebola-Tai Forest and Ebola-Bundibugyo vi-

ruses such information is absence. The bats are natural reservoirs for Ebola-Zaire and Ebola-Reston viruses. The formation of natural reservoirs of filoviruses assumes possibilities of existence of several hosts. The interrelation of Ebola virus and their hosts, dynamics of infection are the classical «susceptible-infected-immune» (recovered) cycle. The likely schemes of rises of epidemic outbreaks, caused by Ebola-Zaire virus are suggested.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 119—126

Key words: Ebola virus, haemorrhagic fever, ecological characteristics, natural foci, epidemic outbreak, reservoirs of infection, accidental hosts, bats

Геморрагическая лихорадка, вызываемая вирусом Эбола (представитель рода *Ebolavirus* семейства *Filoviridae*), является особо опасным вирусным заболеванием, характеризующимся шоком, геморрагиями, мультиорганной недостаточностью и заканчивающейся летальным исходом в 50 — 90% случаев [12, 45].

Род *Ebolavirus* включает вирусы Эбола-Заир, Эбола-Судан, Эбола-Рестон, Эбола-Tai Forest и Эбола-Bundibugyo [24].

В настоящее время считают, что вирус Эбола-Заир дивергировал от общего для филовирусов предка достаточно давно [8, 16]. Все представители семейства *Filoviridae* произошли около 10 000 лет назад. Число нуклеотидных замен за год для различных представителей рода *Ebolavirus*, определенное при анализе 97 полноразмерных геномных последовательностей, с применением методологии *Bagesian* колеблется от $0,46 \cdot 10^{-4}$ (для вируса Эбола-Судан) до $8,21 \cdot 10^{-4}$ (для вируса Эбола-Рестон) [9].

Целью настоящего обзора является анализ некоторых экологических характеристик вируса Эбола в природных очагах.

Первые эпидемические вспышки заболевания, вызванного вирусом Эбола, были зарегистрированы в 1976 г. в Судане и Заире. В ходе этих вспышек уровень летальности среди заболевших составил 53 и 89% соответственно. Общее количество заболевших в каждой из указанных вспышек составило несколько сотен человек. В 1977 г. был отмечен один случай заболевания в Демократической Республике Конго, 34 случая заболевания были зарегистрированы в восточном Судане в 1979 г. [42]. Упомянутые вспышки заболевания были вызваны вирусами Эбола-Заир и Эбола-Судан.

В 1989 году от яванских макаков, поступивших в США из Филиппин, был выделен вирус Эбола-Рестон [31, 32]. Повторные случаи выделения данного вируса от обезьян отмечены в 1992 и 1996 гг. [33]. Заболевание, вызванное вирусом Эбола-Рестон, у людей протекало бессимптомно, и лишь только у 1% из 458 инфицированных были выявлены IgG к вирусу Рестон.

Вплоть до 1994 г. новых случаев заболевания геморрагической лихорадкой Эбола отмечено не было. Однако в период между 1994 — 1997 гг. и 2000 — 2004 гг. произошел ряд новых вспышек заболевания [42], крупнейшая из которых, вызванная вирусом Эбола-Заир, зарегистрирована в 1994 — 1995 г. в г. Киквит (Заир). В ходе данной эпидемической вспышки вновь погибли несколько сотен человек.

В 1994 г. впервые был отмечен случай инфицирования человека вирусом Эбола-Tai Forest. Заболевшим был ветеринар, вскрывавший погибшего шимпанзе [25]. Вирус Эбола-Bundibugyo был выделен во время случая заболевания человека геморрагической лихорадкой в Западной Уганде в 2007 г.

В 2007 г. в Демократической Республике Конго была зарегистрирована крупная вспышка лихорадки Эбола, в ходе которой выявлено 260 заболевших, 186 из которых погибли (летальность 71,5%) [16].

Крупнейшая за все время наблюдения эпидемическая вспышка лихорадки Эбола началась в декабре 2013 г. в Гвинее и продолжается до сих пор. По данным ВОЗ к середине мая 2015 г. от заболевания умерли уже более 11 298 человек, свыше 28 504 человек являются инфицированными. Установлено, что этиологическим агентом данной вспышки является вирус Эбола-Заир. В ходе вспышки были впервые зарегистрированы случаи распространения вируса Эбола за пределы Африканского континента.

Данные выявления РНК вирусов Эбола-Заир и Эбола-Рестон и антител к ним в пробах от рукокрылых мышей

Вирус	Вид рукокрылых	Метод детекции	Литература
Вирус Эбола-Заир	<i>Eidolon helvum</i>	ИФА	[17, 19,
	<i>Eromops franqueti</i>	ИФА, ОТ-ПЦР	38, 42—44]
	<i>Epomorhorus gambianus</i>	РН, ИФА	
	<i>Hypsignathus monstrosus</i>	ИФА, ОТ-ПЦР	
	<i>Micropteropus pusillus</i>	РН, ИФА	
	<i>Tadarida condylura</i>	РН, ИФА	
	<i>Myonycteris torquata</i>	РН, ИФА, ОТ-ПЦР	
	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	РН, ИФА	
	<i>Rousettus leschenaultii</i>	РН, ИФА	
Вирус Эбола-Рестон	<i>Cynopterus sphinx</i>	ИФА	[56]
	<i>Hyposideros Pomona</i>	ИФА	
	<i>Miniopterus schreibersii</i>	ИФА	
	<i>Myotis pilosus</i>	ИФА	
	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	ИФА	

Источником распространения вируса Эбола в неэндемичных регионах (в том числе в Западную Европу и США) стали медицинские работники и обслуживающий больных персонал [4].

Поскольку до самого последнего времени в арсенале здравоохранения отсутствовали средства специфической профилактики и лечения, весьма актуальными являются исследования по изучению природных очагов заболевания, вызванного представителями рода *Ebolavirus*. В этой связи следует упомянуть, что именно выявление природного резервуара возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома (циветты) позволило принять эффективные меры по борьбе с пандемией заболевания [15].

При проведении эпидемиологических исследований идентификация возможного резервуара инфекции среди животных проводится с помощью установления специфичных видов животных — хозяев, которые собственно и являются резервуаром инфекции, а также животных, являющихся «случайными» хозяевами вируса [37, 39].

В качестве возможных природных резервуаров вируса Эбола рассматривали летучих мышей, грызунов, насекомых и даже растения [13].

Во время вспышки 1995 г. в г. Киквит (Заир) были проведены полевые исследования, в ходе которых были изучены пробы от более чем 3000 животных (78 видов млекопитающих, 51 вид птиц, 22 вида рептилий и амфибий), отловленных в лесах, окружающих район эпидемической вспышки; 18 видов из всех изученных являлись представителями отряда рукокрылых. Ни в одной из проб вирус Эбола выявлен не был [26]. Установили, что растения, рептилии, беспозвоночные и некоторые виды позвоночных не могут быть резервуарами инфекции, т.к. в экспериментах они были нечувствительными к инфицированию вирусом Эбола. В то же время, у представителей отряда рукокрылых (летучих мышей и крыланов) зарегистрирована репродукция вируса Эбола с последующим формированием иммунного ответа. Заболевание протекало бессимптомно. Таким образом, представители отряда рукокрылых были идентифицированы как первичный природный резервуар вируса Эбола-Заир [48].

Антитела к вирусу Эбола-Рестон и Эбола-Заир были обнаружены у нескольких видов летучих мышей (*Rousettus gpp.*, *Rousettus amplexicaudatus*, *Rousettus leschenaultii*) на Филиппинах, в Китае и Бангладеш. Указанные виды летучих мышей рассматриваются как возможный резервуар вируса Эбола-Рестон на Филиппинах [11].

Опубликованы сообщения об обнаружении антител к вирусу Эбола и его РНК у трех видов плодоядных летучих мышей: *Hypsignathus monstrosus* (24%, 4/17), *Eromops franqueti* (7%, 8/117), *Myonycteris torquata* (7%, 4/58) после изучения образцов от 1030 животных, включая 679 летучих мышей, 222 птицы и 129 мелких позвоночных [28].

Вирусная РНК была обнаружена в образцах печени и селезенки (но не в других тканях) *H. monstrosus* (19%, 4/21), *E. franqueti* (4%, 5/117), *M. torquata* (7%, 3/141).

Виды рукокрылых, являющиеся естественными хозяевами вируса Эбола, прямые и косвенные методы идентификации возбудителя в резервуаре инфекции представлены в табл. Выявление РНК вируса Эбола в пробах от здоровых летучих мышей является прямым доказательством того, что они могут служить в качестве природного резервуара вируса Эбола.

Как следует из данных, представленных в табл., обнаружение антител к вирусу Эбола у многих видов рукокрылых свидетельствует о том, что данный возбудитель не вызывает гибель этих животных, а циркулирует среди них. В то же время, обнаружение РНК вируса Эбола в ОТ-ПЦР у летучих мышей видов *Eromops franqueti*, *Hypsignathus monstrosus*, *Myonycteris torquata* свидетельствует о том, что уровень накопления возбудителя в исследуемых органах, по крайней мере, превышает величину $1 \cdot 10^2$ БОЕ·г⁻¹. С учетом того, что представители отряда приматов весьма чувствительны к инфицированию вирусом Эбола, включение рукокрылых в состав соответствующих «пищевых цепей» может являться фактором, способствующим возникновению эпидемических вспышек заболевания у консументов второго и третьего порядков.

Другим таким фактором может являться относительно высокая устойчивость вируса Эбола во внешней среде [20].

Получение в последние годы культур клеток летучих мышей [10], в том числе и клеток летучей мыши *Rousettus aegyptiacus* (одного из наиболее вероятных кандидатов в природные резервуары филовирусов) [22] сделало возможным изучение молекулярных механизмов внедрения вирусов в клетки хозяев и размножения в них. Данные изучения экспрессии гликопротеина различных филовирусов в составе вектора на основе вируса везикулярного стоматита установили, что гликопротеин недавно выделенного нового филовируса *Lloviu* связывается с клетками рукокрылых более интенсивно, чем гликопротеины других филовирусов, что может свидетельствовать о том, что вирус *Lloviu* наиболее адаптирован к этим животным [30].

Различные процессы жизнедеятельности в популяциях летучих мышей, (спаривание, рождение потомства, миграции) связаны с сезонностью [2, 17, 18, 34]. При этом особую роль играют увеличение числа чувствительных хозяев и частота контактов во время рождения потомства [3].

Данные о распространении и персистенции вируса Эбола среди летучих мышей свидетельствуют о том, что взаимоотношения возбудителя и хозяев, а также динамика инфекционного процесса соответствуют классической схеме: чувствительный хозяин — инфицирование — иммунитет [3, 28, 40, 47]. В ходе исследований зарубежные специалисты установили, что в процессе экспериментальной инфекции вирус Эбола реплицируется в трех видах летучих мышей (*Tadarida condylura*, *Tadarida pumila*, *Eromorphus wahlbergi*) и выделили вирус из фекалий животных через 21 день после инфицирования. У этих животных развивался адаптивный иммунный ответ [47]. Согласно другим данным, у серопозитивных по IgG к вирусу Эбола летучих мышей в ОТ-ПЦР вирусная РНК не выявляется. Интересно отметить, что выявляемые в ОТ-ПЦР короткие геномные фрагменты РНК вируса Эбола-Заир отличаются друг от друга в зависимости от видов животных и времени отбора проб от них [28].

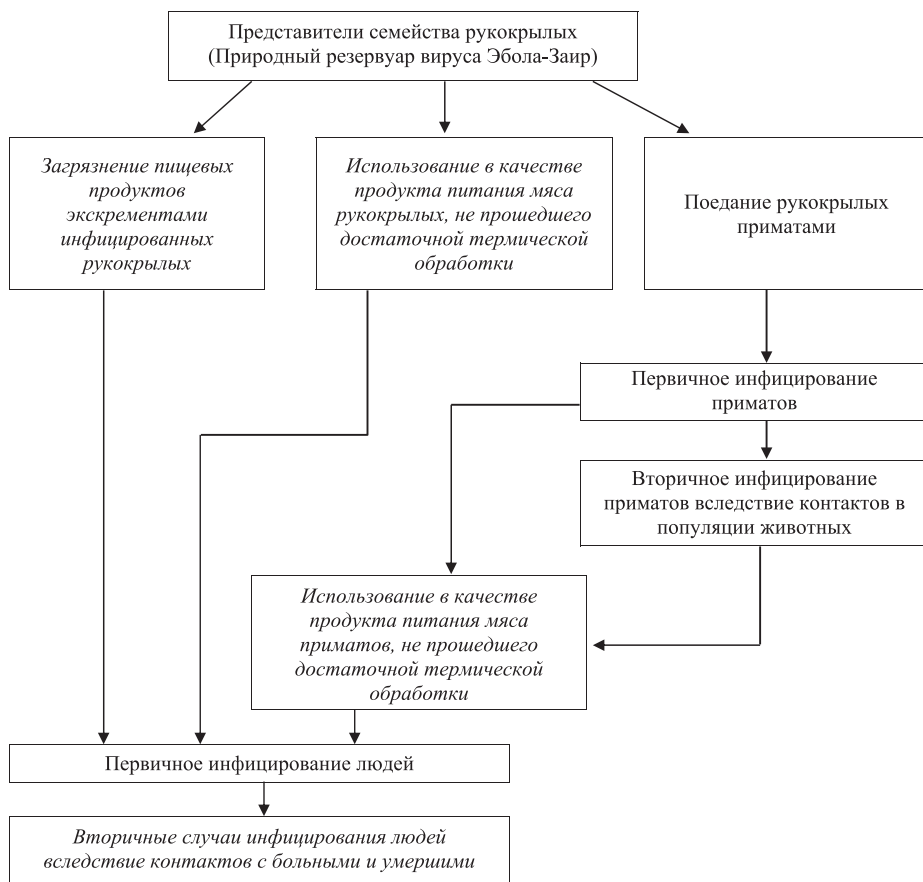
Вероятно, что основным резервуаром инфекции во время эпидемической вспышки геморрагической лихорадки Эбола в 2013 г. являлись крыланы [4]. Крылановые представляют подотряд *Megachiroptera* отряда *Chiroptera* (рукокрылые). Представителей данного подотряда иногда называют «летучими собаками» или «летучими лисицами». В отличие от летучих мышей, распространенных повсеместно, крыланы обитают только в тропической и субтропической зонах Восточного полушария. Крыланы питаются в основном тропическими плодами, некоторые виды крыланов поедают насекомых. Крыланы, по сравнению с летучими мышами, характеризуются значительно более крупными размерами, длина тела животного может достигать 40 см, масса тела до 1,5 кг, размах крыльев 170 см [41]. Именно масса тела крыланов и определяет возможность их употребления в качестве пищи. Следует отметить, что

крупную вспышку лихорадки Эбола в 2007 году в Демократической Республике Конго связывали с поеданием мяса летучих мышей, не прошедшего достаточную для инактивации возбудителя термическую обработку [29].

При рассмотрении возможных экологических ниш вируса Эбола в природе необходимо, кроме рукокрылых, рассмотреть также представителей других отрядов семейства млекопитающих, и в первую очередь приматов.

Приматы занимают существенное место в изучении филовирусов. Первые случаи филовирусной инфекции у человека (геморрагическая лихорадка Марбург, 1967 г.) связаны именно с лабораторными контактами с обезьянами. Однако, несмотря на то, что представители рода *Ebolavirus* и были выделены из инфицированных обезьян [21, 23, 46], роль приматов в природной экологии вируса Эбола мало изучена, а их значение как составной части резервуара инфекции не известно. Ввиду высокой чувствительности обезьян, особенно человекообразных (популяции горилл *Gorilla gorilla gorilla* и шимпанзе *Pan troglodytes* распространены на 80% территории Центральной Африки), к вирусу Эбола-Заир, высока вероятность того, что приматы являются тупиковыми хозяевами вируса. Для персистенции в популяции высших приматов вирус должен быть менее патогенным. Однако даже при низком уровне трансмиссии передача вируса от обезьяны к обезьяне может способствовать возникновению вспышек заболевания в популяции приматов [7, 27].

Вирус Эбола-Рестон был выделен от пойманных в Индонезии обезьян вида *Macaca fascicularis* [31, 32]. Антитела к вирусу Эбола обнаружены у орангутангов (*Pongo pygmaeus*) [14, 36]. Это может говорить либо о том, что филовирусы, циркулирующие в



Возможная схема формирования эпидемических вспышек заболевания, вызываемых вирусом Эбола-Заир.

Азии, менее вирулентны для высших приматов или о том, что инфекция у орангутангов может протекать бессимптомно, и животные данного вида могут быть резервуаром для филовирусов. В 1998 г. на Филиппинах в популяции свиней была отмечена циркуляция вируса Эбола-Рестон [5].

Следует отметить, что из представителей рода *Ebolavirus* данные о природных хозяевах есть только для вирусов Эбола-Заир и Эбола-Рестон. Для вирусов Эбола-Судан, Эбола-Bundibugyo и Эбола-Tai Forest подобная информация отсутствует. Следовательно, процесс формирования природного резервуара филовирусов допускает возможность существования нескольких хозяев [38, 49].

Особенностью филовирусных эпидемий является то, что вспышка заболевания может быть результатом единичного проникновения вируса в популяцию людей с последующей передачей от человека человеку или в результате множественного проникновения вируса в популяцию людей при минимальной передаче от человека человеку. В последнем случае отмечено большое генетическое разнообразие выделяемого от заболевших вируса Эбола [6, 9, 35]. Проведение генотипирования при вспышках среди людей или низших приматов может быть определяющим фактором для более глубокого понимания возникновения эпидемий филовирусных заболеваний [1].

С учетом некоторых особенностей менталитета населения, проживающего в эндемичных по отношению к вирусу Эбола-Заир регионах, можно предположить вероятную схему возникновения эпидемических вспышек заболевания, вызываемых данным возбудителем (рис.).

Таким образом, проведение санитарно-эпидемических мероприятий, направленных на отдельные (выделенные на рис. курсивом) звенья развития эпидемической вспышки даст, по крайней мере, не менее эффективный и, во всяком случае, менее дорогостоящий эффект (по сравнению с разработкой средств специфической профилактики и лечения) при борьбе с распространением геморрагической лихорадки Эбола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Albarino C.G., Shoemaker T., Khristova M.L. et al. Genomic analysis of filoviruses associated with four viral hemorrhagic fever outbreaks in Uganda and the Democratic Republic of the Congo in 2012. *Virology*. 2013, 442: 97-100.
2. Amman B.R., Carroll S.A., Reed Z.D. et al. Seasonal pulses of Marburg virus circulation in Juvenile *Rousettus aegyptiacus* Bats Coincide with Periods of increased risk of human infection. *PLoS Pathog.* 2012, 8 (10): 1-11.
3. Anderson R.M., May R.M. Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature*. 1979, 280: 361-367.
4. Baize S., Pannetier D., Oestereich L. et al. Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea — Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* 2014, 371 (15): 1418-1425.
5. Barrette R.W., Metwally S.A., Rowland J.M. et al. Discovery of Swine as a Host for the Reston ebolavirus. *Science*. 2009, 325 (5937): 204-206.
6. Bausch D.G., Nichol S.T., Muyembe-Tamfum J.J. et al. Marburg hemorrhagic fever associated with multiple genetic lineages of virus. *N. Engl. J. Med.* 2006, 355 (9): 909-919.
7. Bermejo M., Rodriguez-Teijeiro J.D., Illera G. et al. Ebola outbreak killed 5000 gorillas. *Science*. 2006, 314 (5805): 1564.
8. Biek R., Walsh P.D., Leroy E.M., Real L.A. Recent common ancestry of Ebola Zaire virus found in a bat reservoir. *PLoS Pathog.* 2006, 2 (10): 0885-0886.
9. Carroll S.A., Towner J.S., Sealy T.K. et al. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences. *J. Virol.* 2013, 87 (5): 2608-2616.
10. Cramer G., Todd S., Grimley S. et al. Establishment, Immortalisation and Characterisation of Pteropid Bat Cell Lines. *PLoS One* 2009, 4 (12): 1-9.
11. De Jong C., Field H., Tagtag A. et al. Foraging Behaviour and Landscape Utilisation by the Endangered Golden-Crowned Flying Fox (*Acerodon jubatus*), The Philippines. *PLoS One*. 2013, 8 (11): 1-8.
12. Feldmann H., Geisbert T.W. Ebola hemorrhagic fever. *Lancet*. 2011, 377 (9768): 849-862.
13. Germain M. Collection of mammals and arthropods during the epidemic of hemorrhagic fever

- in Zaire. In *Ebola Virus Haemorrhagic Fever*. Pattyn S.R. (Ed). Elsevier: New York, NY, USA, 1978, p. 185-189.
14. Gilbert A.T., Fooks A.R., Hayman D.T. et al. Deciphering serology to understand the ecology of infectious diseases in wildlife. *Ecohealth*. 2013, 10 (3): 298-313.
 15. Guan Y., Zheng B.J., He Y.Q. et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS Coronavirus from animals in Southern China. *Science*. 2003, 302 (5643): 276-278.
 16. Grard G., Biek R., Tamfum J.J. et al. Emergence of divergent Zaire ebola virus strains in Democratic Republic of the Congo in 2007 and 2008. *J. Infect. Dis.* 2011, 204 (3): 776-784.
 17. Hayman D.T.S., Emmerich P., Yu M. et al. Long-Term Survival of an Urban Fruit Bat Seropositive for Ebola and Lagos Bat Viruses. *PLoS One*. 2010, 5 (8): 1-3.
 18. Hayman D.T.S., McCrea R., Restif O. et al. Demography of straw-colored fruit bats in Ghana. *J. Mammal.* 2012, 93 (5): 1393-1404.
 19. Hayman D.T.S., Yu M., Crameri G. et al. Ebola Virus Antibodies in Fruit Bats, Ghana, West Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18 (7): 1207-1209.
 20. Interim guidance for environmental infection control in hospital for Ebola virus. [http://www.cdc.gov/vhf/ebola/hcp/environmental infection control html](http://www.cdc.gov/vhf/ebola/hcp/environmental%20infection%20control.html) 20.11.2014.
 21. Jahrling P.B., Geisbert T.W., Dalgard D.W. et al. Preliminary report: Isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet*. 1990, 335: 502-505.
 22. Jordan I., Munster V.J., Sandig V. Authentication of the R06E Fruit Bat Cell Line. *Viruses*. 2012, 4: 889-900.
 23. Kissling R.E., Robinson R.Q., Murphy F.A., Whitfield S. Green monkey agent of disease. *Science*. 1968, 161 (3848): 1364.
 24. Kuhn J.H., Bao Y., Bavari S. et al. Virus nomenclature below the species level: A standardized nomenclature for filovirus strains and variants rescued from cDNA. *Arch. Virol.* 2014, 159 (5): 1229-1237.
 25. Le Guenno B., Formenty P., Wyers M. et al. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet*. 1995, 345: 1271-1274.
 26. Leirs H., Mills J.N., Krebs J.W. et al. Search for the Ebola virus reservoir in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: Reflections on a vertebrate collection. *J. Infect. Dis.* 1999, 179 (1): 155-163.
 27. Leroy E.M., Rouquet P., Formenty P. et al. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science*. 2004, 303 (5656): 387-390.
 28. Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X. et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*. 2005, 438 (7068): 575-576.
 29. Leroy E.M., Epelboin A., Mondonge V. et al. Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2009, 9 (6): 723-728.
 30. Maruyama J., Miyamoto H., Kajihara M. et al. Characterization of the envelope glycoprotein of a novel filovirus, Iloviu virus. *J. Virol.* 2014, 88 (1): 99-109.
 31. Miranda M.E., Ksiazek T.G., Retuya T.J. et al. Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *J. Infect. Dis.* 1999, 179 (1): 115-119.
 32. Miranda M.E., Yoshikawa Y., Manalo D.L. et al. Chronological and spatial analysis of the 1996 Ebola Reston virus outbreak in a monkey breeding facility in the Philippines. *Exp. Anim.* 2002, 51 (2): 173-179.
 33. Miranda M.E., Miranda N.L. Reston ebolavirus in Humans and Animals in the Philippines: a review. *J. Infect. Dis.* 2011, 204 (3): 757-760.
 34. Mutere F.A. Breeding cycles in tropical bats in Uganda. *J. Anim. Ecol.* 1968; 37: 8-9.
 35. Negredo A., Palacios G., Vazquez-Moron S. et al. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in Europe. *PLoS Pathog.* 2011, 7 (10): 1-8.
 36. Nidom C.A., Nakayama E., Nidom R.V. et al. Serological evidence of Ebola virus infection in Indonesian orangutans. *PLoS One*. 2012, 7 (7): 1-7.
 37. Olival K.J., Epstein J.H., Wang L.F. et al. Are bats unique viral reservoirs? In *New Directions in Conservation Medicine: Applied Cases of Ecological Health*. Aguirre A.A., Ostfeld R.S., Daszak P. (Ed.). Oxford University Press: Oxford, UK, 2012, p. 195-212.
 38. Olival K.J., Islam A., Yu M. et al. Ebola virus antibodies in fruit bats, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19(2): 270-273.
 39. Olival K.J., Hayman D.T.S. Filoviruses in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Viruses*. 2014, 6 (4): 1759-1788.

40. Paweska J.T., Jansen van Vuren P., Masumu J. et al. Virological and serological findings in *Rousettus aegyptiacus* experimentally inoculated with vero cells-adapted hogan strain of Marburg virus. *PLoS One*. 2012, 7 (9): 1-11.
41. Peterson A.T., Carroll D.S., Mills J.N., Johnson K.M. Potential mammalian filovirus reservoirs. *Emerg. Infect. Dis.* 2004, 10: 2073-2081.
42. Pourrut X., Kumulungui B., Wittmann T. et al. The natural history of Ebola virus in Africa. *Microbes Infect.* 2005, 7 (7-8): 1005-1014.
43. Pourrut X., Delicat A., Rollin P.E. et al. Spatial and temporal patterns of Zaire ebolavirus antibody prevalence in the possible reservoir bat species. *J. Infect. Dis.* 2007, 196 (2): 176-183.
44. Pourrut X., Souris M., Towner J.S. et al. Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus*. *BMC Infect. Dis.* 2009, 9 (159): 1-10.
45. Sanchez A., Geisbert T.W., Feldmann H. *Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses*. Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D.E. et al. (Ed.). *Fields virology*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: PA, USA, 2006, p. 1409-1448.
46. Smith C.E., Simpson D.I., Bowen E.T., Zlotnik I. Fatal human disease from vervet monkeys. *Lancet*. 1967, 2: 1119-1121.
47. Swanepoel R., Leman P.A., Burt F.J. et al. Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg. Infect. Dis.* 1996, 2 (4): 321-325.
48. Swanepoel R., Smit S.B., Rollin P.E., Formenty P. et al. Studies of reservoir hosts for Marburg virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2007, 13 (12): 1847-1851.
49. Taniguchi S., Watanabe S., Masangkay J.S. et al. Reston ebolavirus antibodies in bats, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, 17 (8): 1559-1560.
50. Yuan J.F., Zhang Y.J., Li J.L. et al. Serological evidence of ebolavirus infection in bats, China. *Virology*. 2012, 439: 236.

Поступила 27.07.17

Контактная информация: Борисевич Сергей Владимирович, д.б.н., проф.,
141306, Московская обл., Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11

НЕКРОЛОГ

ПАМЯТИ ИРИНЫ ВЛАДИМИРОВНЫ ТАРАСЕВИЧ (1928—2017)

11 декабря 2017 г. на 90 году ушла из жизни Ирина Владимировна Тарасевич — академик РАН, профессор, доктор биологических наук.

Всю свою трудовую жизнь Ирина Владимировна Тарасевич посвятила НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, где проработала с 1953 г. до последних дней. Ирина Владимировна — создатель и руководитель лаборатории экологии риккетсий, главный научный сотрудник. С 1982 г. по 2009 г. — директор Сотрудничающего центра ВОЗ по риккетсиозам и член Совета ВОЗ по зоонозам, с 1990 г. — руководитель Центра по риккетсиозам МЗ РФ.

И.В.Тарасевич — крупный специалист в области микробиологии, риккетсиологии и эпидемиологии. Ириной Владимировной и ее учениками в результате многочисленных научных экспедиций в СССР и России, а также за рубежом были установлены и изучены природные очаги кокциеллеза, сыпного тифа, лихорадки цуцугамуши, сибирского тифа, дальневосточного клещевого риккетсиоза, эрлихиоза; определена этиология новой для науки инфекции — Астраханской пятнистой лихорадки.

И.В.Тарасевич — автор более 400 научных трудов, 8 монографий, под ее руководством защищены 23 кандидатские и 9 докторских диссертаций.

Память об Ирине Владимировне Тарасевич навсегда сохранится в наших сердцах.

СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Кисиль С.В., Сарычева М.А., Востров А.В.* Механизмы бактерицидного действия в реализации общих антибактериальных эффектов катионов металлов в культуре *Streptococcus pyogenes*..... 3
Cheknev, S.B., Vostrova, E.I., Kisil, S.V., Sarycheva, M.A., Vostrov, A.V. The mechanisms of bactericidal action impact in common antibacterial effects of metal cations in culture of *Streptococcus pyogenes*
- Калиниченко Е.О., Сходова С.А., Ахматова Н.К., Михайлова Н.А.* Иммунизация белками *Pseudomonas aeruginosa* OprF и aTox усиливает фагоцитарную и бактерицидную активность лейкоцитов у мышей..... 10
Kalinichenko, E.O., Skhodova, S.A., Akhmatova, N.K., Mikhailova, N.A. Immunization with proteins of *Pseudomonas aeruginosa* OprF and aTox enhances the phagocytic and bactericidal activity of leukocytes in mice
- Ахматова Н.К., Калиниченко Е.О., Макаренкова И.Д., Ахматова Э.А., Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю., Михайлова Н.А.* Цитокиновый профиль дендритных клеток мышей под воздействием белков *Pseudomonas aeruginosa* OprF и aTox 15
Akhmatova, N.K., Kalinichenko, E.O., Makarenkova, I.D., Akhmatova, E.A., Tukhvatulin, A.I., Logunov, D.Yu., Mikhailova, N.A. The cytokine profile of mice dendritic cells under the influence of OprF and aTox proteins of *Pseudomonas aeruginosa*
- Киреева А.Г., Калинина О.В., Киселев А.М., Брико Н.И., Глушкова Е.В., Дмитриев А.В.* Распространенность генетического элемента ICE-erm12, содержащего гены устойчивости tetM и ermB, среди российских и вьетнамских штаммов стрептококков группы А 23
Kireeva, A.G., Kalinina, O.V., Kiselev, A.M., Briko, N.I., Glushkova, E.V., Dmitriev, A.V. An occurrence of ICE-erm12 genetic element containing tetM and ermB resistance genes among Russian and Vietnamese group A streptococcal strains
- Платонов А.Е., Koetsveld J., Колясникова Н.М., Стуколова О.А., Долгова А.С., Топоркова М.Г., Сарксян Д.С.* Взаимодействие нейтрофилов человека с *Borrelia miyamotoi*, возбудителем иксодового клещевого боррелиоза 30
Platonov, A.E., Koetsveld, J., Kolyasnikova, N.M., Stukolova, O.A., Dolgova, A.S., Toporkova, M.G., Sarksyian, D.S. Bactericidal effect of human serum on *Borrelia miyamotoi*, causative agent of Ixodes tick-borne borreliosis
- Прокорева Е.А., Шаршов К.А., Романовская А.А., Соболев И.А., Курская О.Г., Соловьева Е.И., Шестопалова Л.В., Зайковская А.В., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М.* Сравнительный анализ патогенности вирусов гриппа А(Н5N1) и А(Н1N1)pdm09 у лабораторных мышей..... 38
Prokoreva, E.A., Sharshov, K.A., Romanovskaya, A.A., Sobolev, I.A., Kurskaya, O.G., Soloveva, E.I., Shestopalova, L.V., Zaykovskaya, A.V., Alekseev, A.Yu., Shestopalov, A.M. Comparative analysis of pathogenicity of influenza A(Н5N1) and A(Н1N1)pdm09 viruses in mice
- Сухина М.А., Образцов И.В., Михалева В.И., Ачкасов С.И., Сафин А.Л., Шелыгин Ю.А.* Алгоритм лабораторной диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи 45
Sukhina, M.A., Obraztsov, I.V., Mikhalevskaya, V.I., Achkasov, S.I., Safin, A.L., Shelygin, Yu.A. Algorithm for laboratory diagnostics of *Clostridium difficile* associated diarrhea
- Зорина В.Н., Воробьева О.Н., Зорин Н.А.* Активность лактоферрина различного происхождения в отношении грамположительных кокков и *Candida albicans* 54
Zorina, V.N., Vorobeva, O.N., Zorin, N.A. Antimicrobial activity of the human and bovine lactoferrin against gram-positive bacteria and *Candida albicans*
- Отрашевская Е.В., Винокурова В.Н., Шитиков Е.А., Сотникова Е.А., Перевышина Т.А., Колченко С.А., Бутусова Т.Б., Кострюкова Е.С., Ильина Е.Н., Игнатъев Г.М.* Изучение

- генетической стабильности суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) в процессе производства вакцины БЦЖ 58
Otrashevskaya, E.V., Vinokurova, V.N., Shitikov, E.A., Sotnikova, E.A., Perevyshina, T.A., Kolchenko, S.A., Butusova, T.B., Kostyukova, E.S., Ilina, E.N., Ignatev, G.M. *M. bovis* BCG-1 (Russia) sub-strain genome stability investigation within the entire production process
- Фельдблюм И.В., Романенко В.В., Николаева А.М., Субботина К.А., Соснина О.Ю., Перминова О.А., Белякова О.В., Данилина Т.В., Ершов А.Е., Трофимов Д.М., Быкова Е.А., Мартиросян С.В., Анкудинова А.В. Результаты многоцентрового клинического исследования новой комбинированной вакцины АКДС-ГепВ+Ніb производства НПО «Микроген» при иммунизации детей 6 месяцев 68
Feldblyum, I.V., Romanenko, V.V., Nikolaeva, A.M., Subbotina, K.A., Sosnina, O.Yu., Perminova, O.A., Belyakova, O.V., Danilina, T.V., Ershov, A.E., Trofimov, D.M., Bykova, E.A., Martirosyan, S.V., Ankudinova, A.V. Results of a multicenter clinical study of a new combination vaccine DTaP-HepB+Hib production of the CPA «Microgen» for immunization of children 6 months
- Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Воронова Г.А., Балахонов С.В. Влияние плазмидного состава *Yersinia pestis* на образование биопленки в организме блох с разной векторной активностью 76
Bazanova, L.P., Tokmakova, E.G., Voronova, G.A., Balakhonov, S.V. Influence of *Yersinia pestis* plasmid content on biofilm formation in fleas with different vector activity

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ (SHORT COMMUNICATION)

- Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Титова С.В., Корнеева Л.А. Действие N-ацетил-L-цистеина на биопленки холерного вибриона 83
Duvanova, O.V., Mishankin, B.N., Titova, S.V., Korneeva, L.A. The effect of N-acetyl-L-cysteine on biofilm of *Vibrio cholerae*

ОБЗОРЫ (REVIEWS)

- Семененко Т.А., Акимкин В.Г. Сероэпидемиологические исследования в системе надзора за вакциноуправляемыми инфекциями 87
Semenenko, T.A., Akimkin, V.G. Seroepidemiology in the surveillance of vaccine-preventable diseases
- Балмасова И.П., Сепиашвили Р.И., Славянская Т.А., Малова Е.С., Сепиашвили Я.Р. Коинфекция вирусами гепатитов В и дельта: молекулярная биология возбудителей и перспективы фармакотерапии 95
Balmasova, I.P., Sepiashvili, R.I., Slavyanskaya, T.A., Malova, E.S., Sepiashvili, Ya.R. Coinfection by hepatitis B and hepatitis delta viruses: molecular biology of pathogens and prospects of pharmacotherapy
- Захарова Ю.В. Бактериальный микробиом кишечника ВИЧ-инфицированных людей 102
Zakharova, Yu.V. Gut bacterial microbiome of HIV-infected people
- Земсков А.М., Земсков В.М., Земскова В.А., Сепиашвили Р.И., Золоедов В.И. Инфекция и иммунитет у больных из групп риска 109
Zemskov, A.M., Zemskov, V.M., Zemskova, V.A., Sepiashvili, R.I., Zoloedov, V.I. Infection and immunity in patients with risk groups
- Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Карулина Н.В., Чухраля О.В., Сыромятникова С.И., Борисевич С.В. Некоторые экологические характеристики вируса Эбола в природных очагах 119
Sizikova, T.E., Lebedev, V.N., Karulina, N.V., Chukhralya, O.V., Syromyatnikova, S.I., Borisevich, S.V. A some ecological characteristics of Ebola virus in natural foci

НЕКРОЛОГ (OBITUARY)