

УЧРЕДИТЕЛИ:
ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
ВСЕРОССИЙСКОЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
ЭПИДЕМИОЛОГОВ, МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

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

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

5

сентябрь—октябрь

МОСКВА 2018

ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

БРУСИНА Е.Б. (Кемерово), ЗУЕВА Л.П. (Санкт-Петербург), КОРОЛЮК А.М. (Санкт-Петербург), МАМЕДОВ М.К. (Баку), ПРИСАКАРЬ В.И. (Кишинев), ТИТОВ Л.П. (Минск), ШАРКОВА В. (Владивосток), ШЕНДЕРОВ Б.А. (Москва), ШКАРИН В.В. (Н. Новгород)

Адрес редакции:

105064, Москва, М. Казенный пер., 5А, НИИВС им. И.И.Мечникова.

Статьи посылать: mech.inst@mail.ru

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 авторы и читатели, коллеги!

**Подписка на ЖМЭИ на I полугодие 2019 г. будет проходить ТОЛЬКО
по Объединенному каталогу «Пресса России». Индексы: 16729, 10277, 71436.**

Редакция

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

Формат 70x108 1/16. Печать офсетная.

Отпечатано в ООО «Буки Веди»
115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11
Тел.: (495)926-63-96
www.bukivedi.com
E-mail: info@bukivedi.com

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2018

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

С.В.Балахонов, В.В.Войткова, В.И.Дубровина, К.М.Корытов, А.В.Корнева, Т.Т.Шкаруба

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛЕТОК КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫМИ СТЕНКАМИ *FRANCISELLA TULARENSIS* РАЗНЫХ ПОДВИДОВ

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Изучить субпопуляционный состав клеток крови экспериментальных животных, привитых клеточным стенкам (КС) *Francisella tularensis* разных подвидов. **Материалы и методы.** 210 сертифицированных (НПО «Вектор», Новосибирск) беспородных мышей иммунизировали препаратами КС *F. tularensis* разных подвидов в дозе 95 мкг по белку. Животных выводили из эксперимента на 3, 7, 10, 14 и 21 сутки наблюдения и определяли фенотип (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD69) клеток крови. **Результаты.** Динамика клеточного баланса лейкоцитов крови у экспериментальных животных зависела от подвидовой принадлежности штамма туляремийного микроба, из которого был выделен препарат. Все исследуемые препараты способствуют развитию клеточного и гуморального иммунитета, что проявляется в увеличении содержания моноцитов и В-лимфоцитов, а также экспрессии маркера активации CD69. КС *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* А-61 способствуют активации клеточного звена иммунитета экспериментальных животных в большей степени, чем другие препараты. Возможно, что именно этот фактор обуславливает его высокую иммуногенную активность (выживаемость 83%). **Заключение.** На основании полученных данных существует необходимость дальнейшего детального исследования иммуногенных свойств КС *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* А-61 в качестве перспективного компонента при конструировании вакцины против туляремии.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 3—9

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, клеточные стенки, экспериментальные животные, кровь, проточная цитометрия

S.V.Balakhonov, V.V.Voitkova, V.I.Dubrovina, K.M.Korytov, A.V.Korneva, T.T.Shkaruba

IMMUNOPHENOTYPING OF BLOOD CELLS OF EXPERIMENTAL ANIMALS IMMUNIZED WITH CELLULAR WALLS OF *FRANCISELLA TULARENSIS* DIFFERENT SUBSPECIES

Irkutsk Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. To study the subpopulational structure of blood cells of the experimental animals immunized with cellular walls (CW) of *Francisella tularensis* different subspecies. **Materials and methods.** Total 210 certified («Vector», Novosibirsk) outbred mice were immunized with CW preparations of *F. tularensis* different subspecies in 95 µg protein dose. After 3, 7, 10, 14 and 21 days of observation the phenotypes (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD69) of blood cells were detected. **Results.** Dynamics of leukocyte balance in experimental animals depended on *F. tularensis* subspecies. All studied preparations promoted development of cellular and humoral immunity that confirmed by the increase of monocytes and B-lymphocyte, and also by the expression of CD69 activation marker. CW of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* А-61 promoted higher activation of cellular immunity in experimental animals in comparison with other preparations. Probably, exactly this factor causes its high immunogenic activity (83 % survival rate). **Conclusion.** On the basis of the results there is a necessity to further detailed research of CW immunogenic properties of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* А-61 as a perspective component in design of a tularemia vaccine.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 3—9

Key words: *Francisella tularensis*, cell wall, experimental animals, blood, flow cytometry

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель туляремии, *Francisella tularensis*, включен в список потенциальных агентов биотерроризма с высшей категорией опасности «А» [10], что, несомненно, говорит об актуальности широкого исследования механизмов вирулентности возбудителя туляремии и поиска путей создания вакцины нового поколения против этой болезни.

Антигенные детерминанты на поверхности клеток туляремийного микроба, в частности липополисахариды, обладают высокой протективной активностью [1], что обуславливает возможность использования поверхностных структур в качестве компонентов безопасных и эффективных профилактических и диагностических препаратов. Однако модификация структуры липополисахаридов [9] и состава белков наружной мембраны [11] между подвидами *F. tularensis* может оказывать значительное влияние на вирулентность бактерий и, как следствие, на иммуногенность субклеточных фракций.

Баланс показателей клеточного звена иммунитета является важнейшим условием поддержания эффективного иммунного ответа на внедрение патогена или его антигенов. Цель работы — изучение влияния препаратов клеточных стенок *F. tularensis* разных подвинов на функциональное состояние и субпопуляционный состав клеток крови мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 210 сертифицированных (НПО «Вектор», Новосибирск) беспородных мышах, стандартных по условиям содержания и массе (15—20 г).

В качестве объектов исследования использовали 5 препаратов клеточных стенок (КС) *F. tularensis*, полученных из штаммов живых культур *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ (группа 1), *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306 (группа 2), *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 (группа 3), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61 (группа 4), *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole (группа 5), находящихся в коллекции музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института. Обеззараженные препараты клеточных стенок получали лизисом живых клеток *F. tularensis* раствором мочевины [4]. В качестве положительного контроля служил коммерческий препарат липополисахарида (ЛПС) *E. coli* (Sigma, США) с известными свойствами (группа 6).

Подопытным животным подкожно вводили препараты клеточных стенок в ранее установленной иммунизирующей дозе 95 мкг по белку в 0,2 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР) pH 7,2 [8], которая защищала мышей при экспериментальной туляремийной инфекции. Для унификации эксперимента ЛПС *E. coli* вводили в той же дозировке. Контролем служили мыши, получившие ЗФР в объеме 0,2 мл — группа 7. Животных выводили из эксперимента в соответствии с Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (GLP). Учет результатов проводили на 3, 7, 10, 14 и 21 сутки.

Фенотип клеток крови мышей определяли методом фенотипирования с использованием реагентов фирмы Becton Dickinson (США): CD45-APC, CD3-FITC, CD4-Alexa-700, CD8-APC-Cy7, CD19-PE-Cy7, CD69-PE-Cy5 [2]. Анализ окрашенных образцов проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto™ II (Becton Dickinson, США) в программе BD Diva версии 6.0. В каждой пробе анализировалось 10 000 событий CD45⁺-клеток, которые выделяли на графике SSC/CD45. Оценивали абсолютное содержание лейкоцитов (10⁹ кл/л) и относительное содержание (%) основных популяций: гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов. В лимфоцитарном гейте определяли общее содержание Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺). Для оценки функционального состояния клеток крови оценивали уровень экспрессии CD69.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.1 с использованием непараметрических критериев. Данные представлены в виде медианы

и интерквартильного размаха — Ме ($Q_{25}\%$ — $Q_{75}\%$). Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе экспериментов установлено, что показатели абсолютного содержания лейкоцитов у экспериментальных животных, иммунизированных КС *F. tularensis*, находились в пределах физиологической нормы (от $5,1$ до $11,6 \cdot 10^9$ кл/л). Тем не менее, выявлена тенденция ($0,05 > P < 0,10$) к снижению лейкоцитов в крови у мышей, получивших КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306 ($5,5 (4,9—6,0) \cdot 10^9$ кл/л), КС *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 ($5,2 (4,6—6,0) \cdot 10^9$ кл/л), на 3 сутки в среднем в 1,4 раза по сравнению с контролем — $7,5 (5,1—8,9) \cdot 10^9$ кл/л.

Установлено, что исследуемые препараты КС *F. tularensis* не оказывали влияние на процентное содержание гранулоцитов и лимфоцитов. Показатели содержания этих клеток находились в пределах физиологической нормы 10 — 41% и 63 — 75% [6]. Вместе с тем, отмечено увеличение клеток моноцитарного ряда (рис. 1) на 3, 7 и 10 сутки у мышей, получивших КС *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61, в случае КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306 — на 3, 7, 10 и 14 сутки, а КС *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и ЛПС *E. coli* — во все сроки наблюдения в среднем в 1,6 раза по сравнению с контролем (1,8 (1,4—2,1)%, $P \leq 0,05$). При этом у животных 3 (4,7 (2,8—6,2)%) группы регистрировались наибольшие значения этого показателя на 3 сутки по сравнению с другими группами животных ($P \leq 0,01$).

У животных, иммунизированных КС *F. tularensis* разных подвидов, наблюдалось перераспределение клеточного баланса субпопуляций лимфоцитов (табл.) в сторону В-клеток на 10, 14 и 21 сутки наблюдения, за исключением КС *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 и ЛПС *E. coli* — увеличение процентного содержания $CD3^+ CD19^+$ -клеток регистрировалось только на 14 сутки наблюдения (32,7 (28,8–33,6), $P < 0,05$ и 28,2 (23,0—33,1), $P < 0,01$ соответственно). Тем не менее, статистически значимые изменения содержания Т-лимфоцитов ($CD3^+$) отмечены во 2 группе на 14 (54,4 (50,2—61,7)%, $P < 0,01$) и 21 (59,9 (54,6—63,3)%, $P < 0,05$), в 3 группе — на 10 (62,6 (60,8—65,0)%, $P < 0,05$) и 14 сутки (56,1 (54,8—56,8)%, $P < 0,01$), в 5 группе — на 3 (77,6 (70,1—80,7)%, $P < 0,05$), 14 (55,3 (51,1—64,9)%, $P < 0,05$) и 21 (54,4 (51,3—63,8)%, $P < 0,01$) сутки наблюдения по сравнению с интактными животными (67,5 (64,2—72,5)). Следует отметить, что на поздних сроках также имело место снижение процентного содержания Т-хелперов.

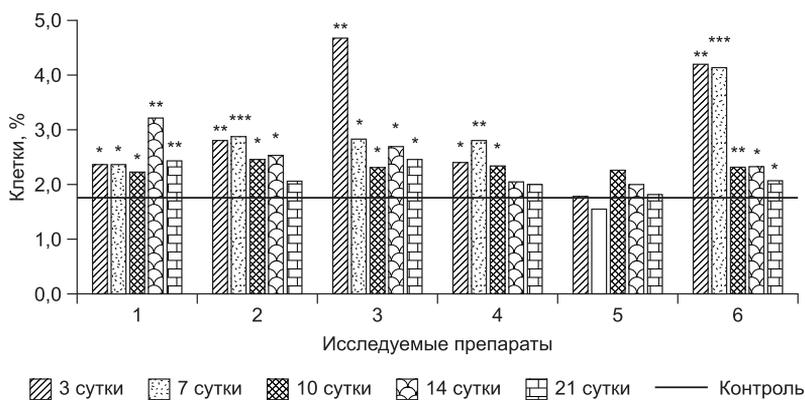


Рис. 1. Динамика содержания моноцитов в крови у экспериментальных животных, иммунизированных КС *F. tularensis* разных подвидов (Ме).

1 — КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ; 2 — КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306; 3 — КС *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112; 4 — КС *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61; 5 — КС *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole; 6 — ЛПС *E. coli*; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Показатели относительного содержания субпопуляций лимфоцитов, Me (Q₂₅%—Q₇₅%)

Препарат	Сроки наблюдения, сутки	Субпопуляции лимфоцитов			
		CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	CD3 ⁺ CD19 ⁺	CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD69 ⁺
Контроль		55,4 (49,3-60,7)	0,57 (0,35-0,86)	20,8 (17,2-26,9)	0,15 (0,08-0,20)
КС F. tularensis	3	57,3 (54,0-59,9)	4,57 (4,03-5,11)**	18,5 (15,5-21,2)	0,14 (0,03-0,47)
subsp. holarctica	7	56,7 (54,9-60,4)	1,07 (0,91-1,51)*	17,4 (15,5-21,6)	0,20 (0,16-0,30)
15 НИИЭГ	10	42,3 (40,2-45,9)**	0,39 (0,35-0,42)	29,7 (26,3-32,4)*	0,46 (0,42-0,48)**
	14	48,8 (44,2-54,0)*	0,58 (0,13-0,79)	28,4 (27,7-31,9)*	0,20 (0,16-0,21)
	21	44,1 (42,5-46,3)**	3,08 (2,40-5,41)**	30,9 (27,5-35,5)*	0,77 (0,75-0,78)**
КС F. tularensis	3	58,9 (58,1-61,1)	3,02 (2,41-3,44)***	16,1 (11,9-16,4)*	0,19 (0,18-0,26)
subsp. holarctica	7	52,4 (49,7-53,7)	1,32 (0,57-1,80)*	22,1 (19,2-26,1)	0,36 (0,20-0,58)*
306	10	43,9 (35,5-47,9)**	0,40 (0,35-0,62)	28,1 (23,1-40,4)*	0,32 (0,17-0,52)*
	14	48,1 (43,6-52,4)*	0,24 (0,10-0,40)*	38,5 (31,0-39,3)**	0,18 (0,15-0,22)
	21	44,1 (40,6-46,6)**	0,11 (0,10-0,19)**	35,6 (31,1-37,7)**	0,33 (0,15-0,66)*
КС F. tularensis	3	48,1 (45,8-50,7)	1,51 (1,18-2,67)*	21,8 (19,4-22,9)	0,66 (0,51-0,83)**
subsp. novicida	7	52,0 (46,0-57,7)	1,97 (1,56-2,36)**	24,4 (19,8-28,6)	0,15 (0,11-0,20)
Utah 112	10	48,4 (45,7-49,9)*	1,70 (0,46-2,79)*	24,4 (22,1-28,2)	0,26 (0,19-0,35)*
	14	45,2 (43,1-46,2)**	0,30 (0,23-0,61)	32,7 (28,8-33,6)*	0,33 (0,28-0,40)**
	21	54,6 (47,2-59,4)	0,22 (0,14-0,29)*	21,4 (18,3-24,1)	0,30 (0,14-0,36)
КС F. tularensis	3	57,1 (50,8-62,8)	1,84 (1,21-2,94)*	16,7 (12,2-19,9)	0,22 (0,18-0,32)
subsp. mediasiatica	7	56,7 (53,3-58,8)	0,90 (0,58-0,94)	16,2 (15,4-21,8)	0,13 (0,08-0,19)
A-61	10	44,1 (43,1-48,4)**	0,44 (0,38-1,27)	29,8 (21,0-32,9)**	0,46 (0,33-0,48)**
	14	48,0 (44,9-56,3)	3,50 (1,01-3,60)**	25,4 (17,3-32,3)*	0,42 (0,29-0,61)***
	21	53,0 (49,5-54,3)	2,05 (0,95-3,56)*	27,5 (25,1-30,7)*	0,41 (0,21-0,81)*
КС F. tularensis	3	63,3 (53,3-70,8)	1,38 (1,09-1,93)*	12,0 (8,3-15,2)*	0,17 (0,13-0,25)
subsp. tularensis	7	50,2 (47,4-50,8)	0,97 (0,88-0,98)	30,7 (28,4-31,7)*	0,25 (0,24-0,27)*
B-399 A-Cole	10	46,9 (42,3-48,6)**	1,55 (0,62-2,48)	26,3 (25,7-26,8)*	0,41 (0,26-0,60)**
	14	41,0 (39,1-45,1)**	1,48 (1,32-2,45)**	31,2 (27,3-34,2)*	0,46 (0,37-0,52)**
	21	41,7 (40,4-47,8)**	4,08 (2,84-5,08)***	33,2 (31,7-35,6)**	0,96 (0,87-1,08)***
ЛПС E. coli	3	58,9 (47,6-63,2)	1,97 (1,18-2,71)*	18,5 (15,3-24,2)	0,20 (0,12-0,28)
	7	58,5 (55,2-58,9)*	0,43 (0,34-0,51)	19,2 (13,4-21,9)	0,14 (0,10-0,16)
	10	49,3 (47,8-53,4)	0,89 (0,70-1,45)	23,6 (16,7-31,7)	0,26 (0,22-0,32)*
	14	44,7 (40,8-50,5)*	0,82 (0,64-0,94)	28,2 (23,0-33,1)**	0,33 (0,29-0,68)**
	21	52,4 (50,7-54,9)	0,21 (0,11-0,25)*	22,4 (16,8-30,4)	0,38 (0,22-0,80)*

Примечание. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 по сравнению с контролем.

При оценке функционального состояния клеток крови изменения экспрессии маркера пролиферации CD69 было отмечено у моноцитов и гранулоцитов (рис. 2). Так, у мышей 1 группы на 3 и 7 сутки зарегистрировано увеличение CD69-положительных моноцитов, у мышей 4 группы — на 3, 7 и 10 сутки, а у 2, 3, 5 и 6 групп — на 3 сутки по сравнению с интактными животными. Аналогичное изменение наблюдалось во всех группах в отношении гранулоцитов на 3 сутки в среднем в 3,0 раза по сравнению с контролем. Причем у мышей, получивших КС F. tularensis subsp. novicida Utah 112, содержание CD69⁺-гранулоцитов было достоверно выше, чем в других экспериментальных группах (54,5 (41,4—53,3), P<0,01). Обращает на себя внимание тот факт, что в группе животных, иммунизированных КС F. tularensis subsp. mediasiatica A-61 и ЛПС E. coli, на 10 сутки отмечалось достоверное снижение CD69-положительных гранулоцитов.

Результаты статистического анализа CD69-позитивных клеточных субпопуляций лимфоцитов представлены в табл., из которой видно, что все исследуемые препараты оказывали влияние на экспрессию данного маркера Т- и В-клетками. Так, у экспериментальных животных всех групп наблюдалось увеличение содержания CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD8⁺CD69⁺ и CD3⁺CD4⁺CD69⁺ клеток на 3 и 7 сутки после им-

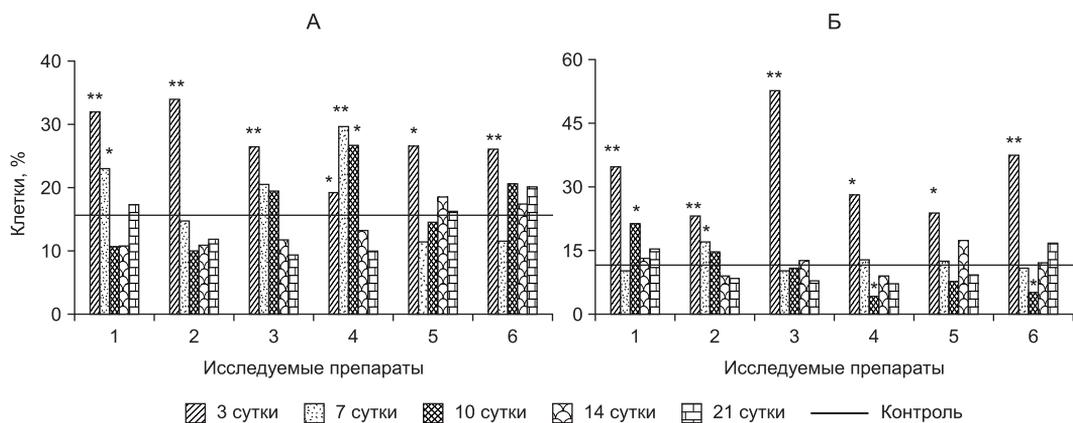


Рис. 2. Динамика содержания моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих CD69, в крови у экспериментальных животных (Ме).

А — моноциты; Б — гранулоциты; 1 — КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ; 2 — КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306; 3 — КС *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112; 4 — КС *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61; 5 — КС *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole; 6 — ЛПС *E. coli*; * P < 0,05; ** P < 0,01 по сравнению с контролем.

мунизации. При этом динамика экспрессии CD69⁺ лимфоцитами крови зависела от подвидовой принадлежности туляремийного микроба. У мышей, получивших КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306 и КС *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112, отмечалось снижение CD3⁺CD69⁺ клеток на 21 сутки наблюдения за счет CD3⁺CD4⁺CD69⁺ клеток, в то время как процентное содержание CD3⁺CD8⁺CD69⁺ клеток было статистически значимо выше по сравнению с контролем. Препараты КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и КС *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole приводили к увеличению Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD69 как за счет CD3⁺CD4⁺CD69⁺, так и CD3⁺CD8⁺CD69⁺ клеток. У мышей, получивших КС *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61, наблюдалась аналогичная картина на 14 сутки наблюдения, а на 21 сутки выявлено достоверное увеличение процента CD3⁺CD4⁺CD69⁺ клеток и тенденция к снижению CD3⁺CD8⁺CD69⁺ клеток. В случае ЛПС *E. coli* имело место увеличение CD3⁺CD69⁺ клеток за счет CD3⁺CD8⁺CD69⁺ на 14 сутки наблюдения с последующим снижением CD69⁺ Т-лимфоцитов.

Динамика изменения В-лимфоцитов, экспрессирующих CD69⁺, у мышей 1 группы носила фазный характер — увеличения этих клеток на 10 и 21 сутки наблюдения. В целом увеличение процентного содержания этих клеток во всех группах исследования наблюдалось на 10 сутки, за исключением КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306 и КС *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole, у которых повышение отмечалось уже на 7 сутки. У экспериментальных животных 3 группы (КС *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112) повышение содержания этих клеток отмечалось на 3, 10 и 14 сутки.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что динамика клеточного баланса лейкоцитов крови у экспериментальных животных зависела от подвидовой принадлежности штамма туляремийного микроба, из которого был выделен препарат КС.

Все исследуемые препараты способствуют формированию клеточного иммунного ответа за счет увеличения как общего процентного содержания моноцитов в крови, так и CD69-положительных клеток. Подтверждением тому является увеличение процента активированных гранулоцитов, экспрессирующих CD69. У мышей 3 группы, получивших КС *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112, наблюдались статистически значимо высокие показатели содержания моноцитов на протяжении всего срока эксперимента при незначительном увеличении процента CD69-положительных клеток. В то время как у мышей 4 группы (КС *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*

А-61) на фоне незначительного изменения содержания моноцитов отмечалось наиболее продолжительное повышение содержания активированных CD69⁺-клеток (с 3 по 10 сутки наблюдения), увеличение процента активированных клеток было более интенсивным. Возможно, вышеописанные изменения связаны с высоким синтезом ГМ-КСФ и ФНО- α у мышей, получивших КС F. tularensis subsp. novicida Utah 112, и ГМ-КСФ в случае — КС F. tularensis subsp. mediasiatica А-61 на 7 сутки исследования [5].

О формировании гуморального иммунного ответа экспериментальных животных на введение КС свидетельствует смещение клеточного баланса в сторону В-лимфоцитов и увеличение доли CD19⁺CD69⁺-клеток на поздних сроках наблюдения. Важно отметить, что наиболее высокие показатели их содержания отмечались у мышей, иммунизированных КС F. tularensis subsp. mediasiatica А-61. У животных, получивших КС F. tularensis subsp. novicida Utah 112, увеличение CD69-позитивных В-лимфоцитов отмечалось уже на 3 сутки наблюдения. Данное обстоятельство может свидетельствовать о различиях в механизмах активации иммунного ответа, поскольку В-лимфоциты могут выступать в качестве антиген-представляющих клеток и активироваться на ранних этапах развития иммунитета в случае тимуснезависимых антигенов [7].

Наблюдаемые различия субпопуляционного состава клеток крови у мышей, получивших препараты КС туляремийного микроба, можно объяснить различной протеолитической активностью и полипептидным составом изучаемых препаратов [3]. Показано, что КС F. tularensis subsp. novicida Utah 112 и КС F. tularensis subsp. tularensis В-399 А-Cole (высоковирулентные штаммы), обладающие наименьшей протеолитической активностью, имеют более широкий спектр протеаз по сравнению с другими препаратами. Выявленные особенности клеточного баланса у мышей экспериментальных групп могут быть обусловлены строением липополисахарида (ЛПС), входящего в состав препаратов. Например, в отличие от других представителей вида, липид АЛПС F. tularensis subsp. novicida Utah 112 модифицирован остатком маннозы [14] и более 90% его находится в свободном состоянии, то есть не связан с core олигосахаридом и О-антигеном [14, 15], а также к core ЛПС присоединен добавочный α -глюкозный остаток к β -Glc [13]. Структура липида А в 1 позиции редуцированного остатка глюкозамина у F. tularensis subsp. mediasiatica и novicida U112 присоединена фосфатная группа. Интересно то, что эта фосфатная группа замещена положительно заряженным сахаром, галактозамином [12], который у F. tularensis subsp. novicida соединен α -связью [14].

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что КС F. tularensis разных подвидов оказывают стимулирующее влияние на пролиферацию моноцитов и гранулоцитов мышей и формирование гуморального иммунитета. Важно отметить, что КС F. tularensis subsp. mediasiatica А-61 способствуют активации клеточного звена иммунитета экспериментальных животных в большей степени, чем другие препараты. Возможно, что именно этот фактор обуславливает его высокую иммуногенную активность (выживаемость 83%) [8].

На основании полученных данных существует необходимость дальнейшего детального исследования иммуногенных свойств КС F. tularensis subsp. mediasiatica А-61 в качестве перспективного компонента при конструировании вакцины против туляремии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балахонов С.В., Дубровина В.И., Татарников С.А., Войткова В.В., Марков Е.Ю., Мазепа А.В. Клеточные и гуморальные факторы иммунитета в патогенезе туляремии: монография. Иркутск: ИНЦХТ, 2017.
2. Войткова В.В., Дубровина В.И., Колесникова О.Б., Коновалова Ж.А., Лукьянова С.В., Бельков А.И. Методические рекомендации по выявлению фосфатидилсерина на лимфоцитах крои мышей с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto™ II. Иркутск, 2010.
3. Корнева А.В., Николаев В.Б., Козлов С.Н., Марков Е.Ю., Мазепа А.В., Попова Ю.О. Выявление мембрансвязанных протеаз Francisella tularensis. Acta Biomedica Scientifica. 2016, 1 (5): 155-159.

4. Корнева А.В., Николаев В.Б., Ястремская К.Ю., Марков Е.Ю., Войткова В.В., Соловьев С.Ю., Попова Ю.О., Мазепа А.В., Половинкина В.С. Результаты изучения иммуногенной активности клеточных оболочек *Francisella tularensis* разных подвидов (сообщение 1). Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 4: 73-77.
5. Корнева А.В., Николаев В.Б., Ястремская К.Ю., Марков Е.Ю., Войткова В.В., Соловьев С.Ю., Попова Ю.О., Мазепа А.В., Половинкина В.С. Результаты изучения иммуногенной активности клеточных оболочек *Francisella tularensis* разных подвидов (сообщение 2). Acta Biomedica Scientifica. 2015, 1: 63-66.
6. Линева А.П. Физиологические показатели нормы животных. Справочник. М., «Аквариум» ФГУИППВ, 2003.
7. Чирулов Л.П., Васильев А.Г. Патифизиология иммунной системы: Учебное пособие. СПб, Фолиант, 2014.
8. Balakhonov S.V., Dubrovina V.I., Voitkova V.V., Korytov K.M., Starovoitova T.P., Ivanova T.A., Korneva A.V., Nikolaev V.B., Shkaruba T.T. Cell envelopes of *Francisella tularensis*: immunogenic activity and toxicity. J. Cell. Biol. Cell. Metab. 2017, 4 (014): 1–3.
9. Gunn J. S., Ernst R. K. The Structure and Function of *Francisella* LPS. Annals New York Academy Sciences. 2007, 1105: 202-218.
10. Hepburn M.J., Friedlander A. M., Dembek Z.F. (ed.). Chapter 8: Tularemia. In: Textbooks of military medicine: medical aspects of biological warfare. Washington: Borden Institute. 2007: 167-184.
11. Huntley J.F., Conley P.G., Rasko D.A. et al. Native outer membrane proteins protect mice against pulmonary challenge with virulent type A *Francisella tularensis*. Infect. Immun. 2008, 8: 3664-3671.
12. Phillips N.J., Schilling B., McLendon M.K. et al. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. Infect. Immun. 2004, 72 (9): 5340-5348.
13. Vinogradov E., Perry M. B. Characterization of the core part of the lipopolysaccharide O-antigen of *Francisella novicida* (U112). Carbohydr. Res. 2004, 339 (9): 1643-1648.
14. Wang X., Ribeiro A.A., Guan Z. et al. Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. Biochemistry. 2006, 45 (48): 14427-14440.
15. Zhao J., Raetz C.R. A two-component Kdo hydrolase in the inner membrane of *Francisella novicida*. Mol. Microbiol. 2010, 78 (4): 820-836.

Поступила 28.02.18

Контактная информация: Дубровина Валентина Ивановна, д.б.н., 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р.т. (3952)22-01-39

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Л.И.Жукова^{1,3}, Г.К.Рафеенко^{1,2}, В.Н.Городин^{1,3}, А.А.Ванюков^{1,3}

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТЕРОВИРУСНЫХ НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ИНФЕКЦИЙ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

¹Кубанский государственный медицинский университет, ²Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае, ³Специализированная клиническая инфекционная больница, Краснодар

Цель. Характеристика эпидемической ситуации и клинического течения энтеровирусных (неполио) инфекций в Краснодарском крае. *Материалы и методы.* Ретроспективный анализ проявлений эпидемического процесса и клиническая характеристика неполиомиелитных энтеровирусных инфекций с 2002 по 2017 гг. на территории Краснодарского края. *Результаты.* Оценена заболеваемость энтеровирусными инфекциями, структура клинических форм, продемонстрирован пейзаж энтеровирусов, выделенных из внешней среды и биологического материала больных. Охарактеризовано клиническое течение энтеровирусной инфекции у 170 госпитализированных больных. *Заключение.* Энтеровирусная (неполио) инфекция в Краснодарском крае в многолетней динамике демонстрирует возрастающую актуальность. Сохраняется разнообразие циркулирующих

во внешней среде и в человеческой популяции серотипов энтеровирусов, спектр которых меняется. В структуре клинических форм энтеровирусных инфекций увеличивается число заболеваний без поражения центральной нервной системы, что свидетельствует об улучшении качества диагностики и повышении диагностической мотивации врачей. Целесообразны дальнейшие мероприятия по эпидемиологическому надзору, а также подготовка врачей различных специальностей, что будет способствовать повышению эффективности диагностики и лечения энтеровирусной (неполио) инфекции.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 9–15

Ключевые слова: неполиомиелитные энтеровирусы, эпидемиология, клиническая характеристика

L.I.Zhukova^{1,3}, *G.K.Rafeenko*^{1,2}, *V.N. Gorodin*^{1,3}, *A.A.Vanyukov*^{1,3}

CLINICAL-EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ENTEROVIRUS NONPOLIOMIELITIS INFECTIONS IN THE KRASNODAR TERRITORY

¹Kuban State Medical University, ²Centre of Hygiene and Epidemiology in Krasnodar Region, ³Specialized Clinical Infectious Diseases Hospital, Krasnodar, Russia

Aim. To characterize the epidemic situation and the clinical course of enterovirus (neolio) infections in the Krasnodar Territory. *Materials and methods.* Retrospective analysis of manifestations of the epidemic process and clinical characteristics of non-poliomyelitis enterovirus infections from 2002 to 2017 in the territory of the Krasnodar Territory. *Results.* The incidence of enterovirus infections, the structure of clinical forms, the landscape of enteroviruses isolated from the environment and the biological material of patients was demonstrated. The clinical course of enterovirus infection in 170 hospitalized patients was characterized. *Conclusion.* Enterovirus (neolio) infection in the Krasnodar Territory in many years of dynamics demonstrates growing relevance. A variety of enterovirus serotypes circulating in the environment and in the human population are preserved, the spectrum of which varies. In the structure of clinical forms of enterovirus infections, the number of diseases without affecting the central nervous system increases, which indicates an improvement in the quality of diagnosis and an increase in the diagnostic motivation of doctors. Further measures for epidemiological surveillance, as well as training of physicians of various specialties, are expedient, which will help to increase the effectiveness of diagnosis and treatment of enterovirus (neolio) infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 9–15

Key words: nonpoliomyelitis enteroviruses, epidemiology, clinical features

ВВЕДЕНИЕ

Энтеровирусная (неполио) инфекция сохраняет свою актуальность в течение последних десятилетий вследствие повсеместного распространения, периодических вспышек заболевания, разнообразия клинических проявлений, в том числе с тяжелыми последствиями вплоть до летальных исходов [1, 2, 4]. Ликвидация в большинстве регионов мира энтеровирусов полиомиелита из естественной природной циркуляции в постсертификационный период активизировало эпидемический процесс неполиомиелитных энтеровирусов, которые теперь представляют серьезную проблему для здравоохранения во всем мире [6–9]. Постоянно возникают новые штаммы энтеровирусов, зарождение которых происходит преимущественно в регионе Юго-Восточной Азии, в том числе в Китае и сопредельных государствах. Неблагополучная глобальная эпидемическая ситуация создает угрозу завоза энтеровирусов в нашу страну из-за рубежа [2–5, 7]. В этой связи, мониторинг циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов во внешней среде, изучение эпидемиологических и клинических особенностей энтеровирусных (неполио) инфекций приобретает все большую актуальность.

Целью исследования явилась характеристика эпидемической ситуации и клинического течения энтеровирусных (неполио) инфекций в Краснодарском крае.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный анализ проявлений эпидемического процесса неполиомиелитных энтеровирусных инфекций с 2002 по 2017 гг. на территории Краснодарского края. Используются базы данных Федерального бюджетного учреждения здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае».

Представлена клиническая характеристика энтеровирусной инфекции у взрослых больных, госпитализированных в городскую специализированную клиническую инфекционную больницу Краснодара в 2006 — 2016 гг.

Официальная регистрация заболеваемости энтеровирусными (неполио) инфекциями ведется в Краснодарском крае с 2006 года, а идентификация неполиомиелитных энтеровирусов из внешней среды и от больных — с 2002 года. Согласно нормативной документации Российской Федерации, в форме государственной статистической отчетности отражаются только лабораторно подтвержденные случаи заболевания энтеровирусной инфекции [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В указанный эпидемический период наблюдались преимущественно спорадические случаи энтеровирусных (неполио) инфекций. Заболеваемость составила в 2006 году — 5,42 на 100 тыс. населения (в том числе энтеровирусных менингитов 0,06 на 100 тыс. населения), в 2007 — 0,35 (0,02), в 2008 — 1,69 (1,69), в 2009 — 0,18 (0,08), в 2010 — 0,18 (0,18), в 2011 — 0,12 (0,12), в 2012 году — 0,67 (0,63), в 2013 — 8,38 (6,05), в 2014 — 3,57 (2,53), в 2015 — 1,05 (0,7), в 2016 — 4,36 (2,43) и в 2017 — 7,27 (1,53). Всего было зарегистрировано 1758 подтвержденных случаев неполиомиелитных энтеровирусных инфекций, из которых 845(48%) были представлены энтеровирусным менингитом, а остальные другими клиническими формами энтеровирусной инфекции. Наибольшее число случаев энтеровирусной (неполио) инфекции (224) было зарегистрировано в эпидемический сезон 2013 года.

Среди заболевших преобладали дети 1476 (85,2 %), возрастная структура которых была следующей: дети до 1 года — 104(7 %), 1—2 лет — 279(18,9 %), 3—6 лет — 599(40,5%); 7—14 лет — 76(5,1%). Большинство детей с энтеровирусными (неполио) инфекциями в возрасте 3—6 лет посещали детские дошкольные учреждения: 2006 г. — 69,7%, 2007 г. — 50,0%, 2008 г. — 82,1%, 2009 г. — 100,0%, 2010 г. — 100,0%, 2011 г. — 100,0%, 2012 г. — 90,0%, 2013 г. — 83,1%, 2014 г. — 83,7%, 2015 г. — 76,1%, 2016 г. — 72,3%, 2017 г. — 75,2%.

В круглогодичной динамике заболеваемости энтеровирусной инфекцией за период наблюдения прослеживалась четко выраженная летне-осенняя сезонность с подъемом заболеваемости в августе — октябре.

В период 2002 — 2017 гг. были проведены вирусологические исследования 3456 проб сточной воды на обнаружение (неполио) энтеровирусов. Положительными оказались 5,6% проб сточной воды в 2002 году, 8,2% — в 2003, 5,8% — в 2004, 2,7% — в 2005, 5,0% — в 2006, 1,4% — в 2007, 0% — в 2008, 1,4% — в 2009, 4,9% — в 2010, 0,5% — в 2011, 7,0% — в 2012, 0% — в 2013, 12,8% — в 2014, 3,6% — в 2015, 0,5% — в 2016 и 7,6% — в 2017 году. В общем было обнаружено 310 вирусологических культур (неполио) энтеровирусов, удельный вес которых из общего числа исследований составил 8,9%.

Структура идентифицированных в сточной воде энтеровирусов была такова: Коксаки В1 — 6,8%, Коксаки В2 — 0,96%, Коксаки В3 — 12,6%, Коксаки В4 — 2,9%, Коксаки В5 — 9,7%, Коксаки В6 — 0,6%, ЕСНО 5 — 0,6%, ЕСНО 6 — 3,2%, ЕСНО 7 — 1,3%, ЕСНО 8 — 0,3%, ЕСНО 11 — 5,1%, ЕСНО 19 — 0,6%, ЕСНО 20 — 0,3%, ЕСНО 25 — 0,3%, ЕСНО 30 — 5,5%, ЕСНО 33 — 0,3%, энтеровирус 70 — 0,96%, энтеровирус 71 — 0,3%. Таким образом, в сточной воде преобладали вирусы Коксаки В и вирусы ЕСНО (6, 11, 30 серотипы).

Биологический материал от 1410 больных с подозрением на энтеровирусную инфекцию был исследован в период с 2002 по 2017 год в испытательном лабораторном центре Центра гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае с помощью полимеразной цепной реакции. РНК энтеровирусов в зависимости от клинических проявлений болезни выявляли в спинномозговой жидкости, в отделяемом из носоглотки, в кишечном содержимом. В случае обнаружения РНК энтеровирусов методом ПЦР применяли вирусологический метод для выделения живого вируса на клеточной культуре Нер-2 и RD. Всего было идентифицировано 498 (35,3%) энтеровирусов. Для подтверждения и секвенирования выделенные штаммы энтеровирусов направлялись в Референс-центр по мониторингу за энтеровирусными инфекциями в Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной.

В структуре энтеровирусов (неполио) из биологического материала перманентно лидировал ЕСНО 30 — 272(54,6%), реже обнаруживали ЕСНО 6 — 57(11,4%), Коксаки В5 — 43(8,6%), Коксаки В3 — 35(7%), Коксаки В4 — 16(3,2%), энтеровирус 71 — 28(5%), ЕСНО 6 — 57(11,4%), ЕСНО 25 — 8(1,6%), ЕСНО 20 — 11(2,2%), Коксаки В1, ЕСНО 13, ЕСНО 7 — по 5(1%), Коксаки А10, ЕСНО 21, ЕСНО 33, ЕСНО 29, ЕСНО 16, ЕСНО 3 по 1(0,2 %).

Структура вирусов, выделенных от больных в разные годы наблюдения, менялась. Так, в 2009 — 2012 годы среди энтеровирусов преобладали ЕСНО 6 (2009 г. — 11%, 2011 г. — 20%, 2012 г. — 27,2%). С 2013 года начался рост заболеваний, обусловленных ЕСНО 30 (2013 г. — 24,5%, 2014 г. — 84,5%, 2015 г. — 8,3%, 2016 г. — 34,2%). В 2017 году пейзаж выделенных от больных вирусов изменился, лидирующие позиции занял энтеровирус 71 типа — 25(50%) и Коксаки В3 — 14(28%), удельный вес которых в период 2002 — 2016 гг. был невелик и составлял 5% и 7% соответственно.

Энтеровирусная инфекция представляет значительные диагностические трудности для врачей общей лечебной сети. Об этом свидетельствует невысокая частота правильных предварительных диагнозов энтеровирусной инфекции, выставленных 6,3% пациентам.

После верификации диагноза преобладающей клинической формой энтеровирусной инфекции был серозный менингит, удельный вес которого в 2008 — 2017 годы наблюдения колебался от 55,6% до 100,0%. Так, за период с 2009 по 2012 гг. было зарегистрировано 34 случая энтеровирусного менингита, а с 2013 по 2016 гг. — уже 536 случаев, то есть в 15,7 раза больше. В 2008 году все случаи энтеровирусной инфекции были представлены в форме энтеровирусного менингита. Сезон 2017 года отличался более разнообразным распределением клинических форм энтеровирусной инфекции. Помимо серозного менингита, который по-прежнему встречался наиболее часто (68 случаев — 62,0%), диагностировали острое респираторное заболевание — 16(14,5%), герпангину — 11(10,0%), менингоэнцефалит — 5(4,5%), полинейропатию — 3(2,7%).

Среди 170 госпитализированных взрослых пациентов с энтеровирусной инфекцией также, как и в общей структуре энтеровирусных (неполио) инфекций в Краснодарском крае, преобладали клинические формы с поражением центральной нервной системы, которые диагностировали у 125(73,5%) больных. В остальных 45(26,5%) случаях ведущими синдромами были поражение верхних дыхательных путей и/или желудочно-кишечного тракта без вовлечения нервной системы. В подавляющем числе случаев заболевание протекало в среднетяжелой форме (162 — 95,3%) и редко в тяжелой (8 — 4,7%).

Госпитализированная заболеваемость характеризовалась летне-осенней сезонностью: основная часть больных (125 — 73,5%) поступали в стационар в июле — октябре. Увеличение числа пациентов с энтеровирусной инфекцией, как правило, резко стартовало в июле месяце (24 — 14,1% больных) и достигало максимума в сентябре (46 — 27,1% больных) с последующим постепенным снижением к январю (в октябре — 17; 10,0%, в ноябре — 16; 9,4%, в декабре — 8; 4,7%). Единичные больные госпитализировались в июне, апреле и январе.

При сборе сведений эпидемиологического анамнеза контакт с инфекционными больными (детьми или другими родственниками с проявлениями острых респираторных заболеваний, ангины или менингита) отмечали 38(22,4%) обследованных, пребывание на море, других водохранилищах или в бассейнах — 20(11,8%).

Клиническое течение энтеровирусной (неполио) инфекции характеризовалось у большинства больных (97,1%) острым началом с внезапной фебрильной температурой, сопровождалось ознобом и общей слабостью (100,0%), болью при движении глазных яблок или светобоязнью (44,1%), артралгией (15,3%). Первая температурная волна продолжалась от 3 до 18 дней. В 21,2% случаев отмечалась вторая волна фебрилитета продолжительностью от 1 до 6 дней, а у 2,9% больных — третья волна субфебрилитета на протяжении 2 — 4 дней.

Признаками поражения нервной системы были головная боль, встречающаяся у 140(82,4%) больных, на высоте которой в подавляющем большинстве случаев появлялись тошнота и рвота. Примечательно, что головная боль имела и у трети пациентов с энтеровирусной инфекцией без поражения центральной нервной системы. Менингеальные знаки регистрировали у 137(80,6%) пациентов: из них ригидность мышц затылка — у 100% и симптом Кернига — у 34,1%.

Признаками поражения респираторного тракта имелись у большинства пациентов с энтеровирусной инфекцией (116 — 68,2%). В основном это были першение и боли в горле, сухой кашель, а при объективном исследовании — гиперемия и зернистость задней стенки глотки. Признаки тонзиллита с гнойными налетами или герпангину с везикулезными высыпаниями на миндалинах и небе диагностировали у 8(4,7%) больных, в одном случае (0,6%) тонзиллит сочетался с серозным менингитом.

Симптомы поражения пищеварительной системы отмечали у 22(12,9%) пациентов: послабление стула от одного до двух раз в сутки на протяжении не более двух дней. В то же время, у 6(27,3%) больных этой группы диарейный синдром был ведущим, определял клиническую симптоматику, поскольку частота стула достигала 10 — 15 раз в сутки продолжительностью 5 — 6 дней.

В общем анализе крови у 61(35,9%) пациента наблюдался лейкоцитоз, а у 58(34,1%) — палочкоядерный сдвиг лейкоцитарной формулы. В 17(10,0%) случаях регистрировали повышение активности фермента аланинаминотрансферазы (максимум до 5 норм), у 22(12,9%) — повышение активности аспартатаминотрансферазы (максимум до 9 норм), у 45(26,5%) повышение активности креатинфосфокиназы (максимум до 110 норм).

При исследовании спинномозговой жидкости во всех 125 случаях обнаруживали прозрачный бесцветный ликвор, вытекающий под давлением, с умеренным цитозом (до $200,0 \times 10^6$ /л). В 26(15,3%) исследованиях спинномозговая жидкость содержала более $200,0 \times 10^6$ /л лейкоцитов. Следует отметить, что у 35(28,0%) больных цитоз был нейтрофильного характера., у остальных (90 — 72,0%) — лимфоцитарным. В 42(33,6%) случаях отмечалось незначительное повышение белка (максимум до 1,5 г/л). Остальные показатели биохимического исследования спинномозговой жидкости (содержание глюкозы, хлоридов) не отличались от нормальных. Изменения ликворологических показателей у больных энтеровирусной нейроинфекцией сохранялось от 9 до 40 дней.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный клинико-эпидемиологический анализ продемонстрировал, что на территории Краснодарского края в период с 2002 по 2017 годы установлено присутствие энтеровирусов (неполио) в окружающей среде и у больных с различными клиническими синдромами. Заболеваемость верифицированной энтеровирусной инфекции является спорадической с четко выраженной летне-осенней сезонностью, болеют преимущественно дети в возрасте от трех до шести лет.

Периодическое увеличение положительных вирусологических проб на энтеровирусы из внешней среды свидетельствует об интенсификации циркуляции вирусов и возможном усилении эпидемического потенциала данной инфекции. Так, например, скачкообразное увеличения частоты выделения (неполио) энтеровирусов из внешней среды с 0,5% в 2011 году до 7,0% в 2012 году соотносилось с ростом заболеваемости от 0,67 на 100 тысяч населения в 2012 году до 8,38 на 100 тысяч населения в 2013 году.

Спектр серотипов энтеровирусов, выделенных из внешней среды и из биологического материала больных людей, в многолетней динамике существенно различается и меняется. Так, в сточных водах доминируют энтеровирусы Коксаки, а при

заболеваниях людей энтеровирусы ЕСНО. В последние годы из внешней среды и от пациентов стали выделять миксты энтеровирусов. С 2017 года место лидирующих много лет в этиологической структуре заболеваний вирусов ЕСНО (6, 30) стали занимать энтеровирус 71 и Коксаки В3. Это отразилось на структуре клинических форм энтеровирусной (неполио) инфекции, в которой постепенно растет удельный вес ненейроинвазивных форм (без поражения центральной нервной системы).

Различия в частоте обнаружения одних и тех же серотипов (неполио) энтеровирусов в сточных водах и в биологическом материале от больных позволяет предполагать незначительный вклад водного пути передачи в эпидемический процесс энтеровирусных (неполио) инфекций в Краснодарском крае. Роль пищевого пути передачи также несущественна, о чем свидетельствует отсутствие в регионе «пищевых вспышек» данной инфекции. Более вероятно заражение людей происходит контактным путем при прямом или опосредованном контакте с источником инфекции.

Клинической проблемой энтеровирусных инфекций является сложность постановки предварительного диагноза в связи с отсутствием патогномичных симптомов и разнообразием клинических форм заболевания. В то же время, появление в структуре диагнозов энтеровирусной инфекции с 2013 года весомой доли форм без поражения центральной нервной системы свидетельствует о появившейся настороженности врачей в отношении данной инфекции и, конечно, о расширении возможностей лабораторной диагностики. Напомним также, что (неполио) энтеровирусы могут быть этиологическими факторами не только острых респираторных, диарейных заболеваний и серозного менингита, но и остро го геморрагического конъюнктивита, миокардиопатии, полиомиелитоподобных заболеваний и других, в алгоритмы обследования которых диагностика энтеровирусной этиологии в большинстве случаев не включается, несмотря на рекомендации, содержащиеся в нормативных документах [4].

В заключение отметим, что клинико-эпидемиологическая характеристика энтеровирусной (неполио) инфекции в Краснодарском крае в многолетней динамике демонстрирует возрастающую актуальность данной инфекции в этом регионе, определяющуюся стойкой циркуляцией разнообразных серотипов энтеровирусов во внешней среде и в человеческой популяции с меняющимся спектром возбудителей, приводящим к изменению структуры клинических форм заболевания. Расширяющиеся возможности лабораторной диагностики энтеровирусных заболеваний диктуют необходимость подготовки врачей разных специальностей по вопросам этой инфекции, что может значительно улучшить терапевтическую эффективность, а также оптимизировать профилактические и противоэпидемические мероприятия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев Н.Н., Рустамова Л.И., Азаев М.Ш. и др. Изучение молекулярно-биологических и вирусологических маркеров как важный компонент организации эпидемиологического надзора за энтеровирусными инфекциями. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2009, 1:8-11.
2. Жукова Л.И., Рафеенко Г.К., Ларин Ф.И., Шербина Л.И., Шуть И.Н., Давыдова М.А., Ванюков А.А. Энтеровирусные неполиомиелитные инфекции в Краснодарском крае. *Журн. микробиол.* 2014, 4:13-17.
3. Новикова Н.А., Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Ефимов Е.И. Молекулярный мониторинг неполиомиелитных энтеровирусов на европейской территории России в 2008 — 2011 гг. *Журн. микробиол.* 2013, 1:75-78.
4. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.2950-11. Профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции.
5. Сергевнин В.И., Трясолобова М.А., Кудреватых Е.В., Кузовникова Е.Ж. Проявления эпидемического процесса и пути передачи возбудителя энтеровирусного менингита. *Журн. микробиол.* 2015, 6:87-90.
6. Троценко О.Е., Лукашев А.Н., Каравианская Т.Н. и др. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг циркуляции энтеровирусов в регионе Забайкалья. *Журн. микробиол.* 2013, 1:70-75.
7. Фисенко Е.Г., Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Безручко А.А. Особенности проявления эпидемического процесса энтеровирусной инфекции в Минске. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2007, 2:12-14.

8. Abzug M.J. Neonatal enterovirus infection: Virology, serology, and effects of intravenous immune globulin. Clin. Infect. Dis. 1995, 20:1201.
9. Cochi S.L. Global poliomyelitis eradication initiative; status report. J. Infect. Dis. 1997, 1:292.

Поступила 25.03.18

Контактная информация: Жукова Лариса Ивановна, д.м.н., проф.,
350015, Краснодар, ул. Митрофана Седина 4, р.т. (861)255-26-40

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

П.А.Мочалкин¹, А.П.Мочалкин¹, Е.Г.Степанов², Л.А.Фарвазова², Н.В.Попов³

ФАКТОРЫ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЕ ГРУППОВУЮ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ГЛПС В ЗИМНИЙ ПЕРИОД НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

¹Республиканский центр дезинфекции МЗ Республики Башкортостан, Уфа; ²Управление Роспотребнадзора по Республике Башкортостан, Уфа; ³Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Цель. Основной целью работы является установление факторов, обусловливающих вспышки бытовой групповой заболеваемости ГЛПС в зимний период на территории Республики Башкортостан как основы для обоснования профилактических мероприятий. *Материалы и методы.* Проанализированы данные Управления Роспотребнадзора по Республике Башкортостан (РБ) по заболеваемости ГЛПС в 54 административных районах РБ в зимний период 2016–2017 гг. Обобщены результаты ликвидации эпидемических очагов с бытовой групповой заболеваемостью ГЛПС в зимний период на территории РБ в 2010–2017 гг. *Результаты.* Зимняя спорадическая заболеваемость ГЛПС ежегодно регистрируется среди сельского и городского населения степной, лесостепной и лесной зон РБ. Отмечено, что эпидемические очаги с бытовой групповой заболеваемостью ГЛПС наиболее часто возникают на территории лесостепной зоны. Установлено, что заражения ГЛПС бытового типа имеют место в населенных пунктах, в той или иной степени примыкающих к лесным массивам, а также при посещениях городским населением загородных объектов, расположенных на территории активных природных очагов ГЛПС. При этом риск бытового заражения ГЛПС целиком определяются санитарно-гигиеническим состоянием жилых и производственных объектов. *Заключение.* Основным тактическим приемом предупреждения возникновения эпидемических очагов с бытовой групповой заболеваемостью ГЛПС среди сельского и городского населения РБ является одновременное применение барьерной, поселковой дератизации и дезинфекции на участках высокого риска заражения.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 15–20

Ключевые слова: эпидемические очаги, бытовая групповая заболеваемость ГЛПС, территории риска, риск бытового заражения ГЛПС, противоэпидемические мероприятия

P.A.Mochalkin¹, A.P.Mochalkin¹, E.G.Stepanov², L.A.Farvazova², N.V.Popov³

FACTORS RESPONSIBLE FOR CLUSTER HFRS MORBIDITY DURING WINTER SEASON IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN

¹Republican Centre for Disinfection, Ufa; ²Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Bashkortostan, Ufa; ³Russian Research Institute for Plague Control «Microb», Saratov, Russia

Aim. Of the study was to specify the factors responsible for outbreaks of domestic cluster HFRS morbidity during winter period in the Republic of Bashkortostan as the basis for preventive measures substantiation. *Materials and methods.* Analyzed have been the data from the Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Bashkortostan (RB) on the HFRS incidence in 54 administrative districts of RB during winter season 2016–2017. Summarized have been the results of epidemic

foci eradication with domestic HFERS morbidity during winter months of 2010-2017 in the territory of RB. *Results.* Winter sporadic HFERS incidence is registered annually among the rural and urban population residing in steppe, forest-steppe and forest zones of RB. It is outlined that epidemic foci with domestic cluster HFERS morbidity emerge more frequently in the territory of forest-steppe zone. It is established that HFERS infections of domestic type take place in residential areas adjacent to some forestry to one extent or another, as well as on visiting country, out-of-town objects situated in the territory of active natural HFERS foci. Thereat, the risks of domestic HFERS infection are entirely defined by the sanitary-hygienic state of accommodation and manufacturing facilities. *Conclusion.* The main tactical option for the prevention of epidemic foci emergence with domestic cluster HFERS morbidity among rural and urban population of RB is simultaneous barrier and semi-rural deratization and disinfection in areas of high risk of infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 15—20

Key words: epidemic foci, domestic cluster HFERS morbidity, risk areas, risk of domestic HFERS infection, anti-epidemic measures

ВВЕДЕНИЕ

Природные очаги ГЛПС на территории Республики Башкортостан (РБ) характеризуются постоянной эпидемической активностью с 1957 г. [1,4,5]. Первые зарегистрированные групповые вспышки заражения ГЛПС зарегистрированы в декабре 1959 г. и феврале-марте 1964 г. среди персонала и детей санаторно-лесной школы [10]. В 1970-2009 гг. вспышки с групповой заболеваемостью ГЛПС, в том числе и в зимний период, неоднократно регистрировали в лесостепной и лесной ландшафтно-географических зонах Республики Башкортостан [2, 8]. Причем наиболее значительная вспышка была зарегистрирована здесь в 1997 г., когда заболеваемость достигала 224 случая на 100 тыс. населения [12]. В 2010-2015 гг., вследствие усиления эпидемиологического надзора за природными очагами ГЛПС, общий уровень заболеваемости, по сравнению с периодом 1980—2009 гг., несколько снизился [9]. В сезонном аспекте подъем заболеваемости отмечен в период с августа по декабрь с выраженными пиками в июле-сентябре и ноябре — декабре [6, 12]. Отмечаемый осенне-зимний рост заболеваемости ГЛПС связан с усилением контактов населения с мышевидными грызунами, вследствие их сезонных миграций в постройки человека [2, 7]. На фоне роста случаев бытовых заражений нередко возникают вспышки с групповой заболеваемостью ГЛПС среди сельского и городского населения [5, 9]. Последнее связано с рядом причин, в первую очередь, с недостаточным объемом проводимых неспецифических профилактических мероприятий на участках высокого риска заражения и с использованием малоэффективных дезинфектологических технологий, а также низкого уровня контроля качества выполненных профилактических работ [11, 13]. Вплоть до настоящего времени для снижения риска заражения ГЛПС используют методы и средства поселковой и барьерной дератизации [6]. Очаговая и камерная дезинфекция применяется, в основном, только при ликвидации эпидемических очагов групповой заболеваемости ГЛПС, а как мера превентивной защиты населения в осенне-зимний период практически не используется. Также в недостаточном объеме для защиты населения применяют средства индивидуальной защиты [11]. Цель работы — совершенствование тактики неспецифической профилактики ГЛПС на территории РБ в зимний период, в первую очередь, за счет снижения риска возникновения эпидемических очагов с бытовой групповой заболеваемостью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы данные Управления Роспотребнадзора по РБ по заболеваемости ГЛПС в 54 административных районах РБ в зимний период 2016-2017 гг. Обобщены результаты ликвидации эпидемических очагов с бытовой групповой заболеваемостью ГЛПС в зимний период на территории РБ в 2010-2017 гг. Статистическая обработка данных и полученных результатов проводилась с использованием пакета стандартных приложений Microsoft Office и Statistica 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2010-2017 гг. случаи заражения ГЛПС постоянно регистрируют в 50 районах из 54 и в 12 городах из 14 РБ [9]. При этом отмечено, что на территории РБ в зимний период заражения ГЛПС бытового типа наиболее часто имеют место в населенных пунктах, в той или иной степени примыкающих к лесным массивам, а также при посещениях городским населением загородных объектов, расположенных на территории активных природных очагов ГЛПС. При этом риск бытового заражения ГЛПС целиком определяется санитарно-гигиеническим состоянием жилых и производственных объектов.

Зимняя спорадическая заболеваемость ГЛПС ежегодно регистрируется среди сельского и городского населения степной, лесостепной и лесной зон РБ. Однако эпидемические очаги с бытовой групповой заболеваемостью ГЛПС наиболее часто возникают на территории лесостепной зоны, характеризующейся наиболее высоким риском заражения, в первую очередь, на территории городского округа Уфа, Аскинского, Чишминского и Уфимского административных районов [3]. Среди сельского населения характерная вспышка с бытовой групповой заболеваемостью ГЛПС имела место в декабре 2011 г. на территории Аскинского района в населенном пункте, расположенном в лесном массиве. Случаев заболевания ГЛПС здесь не регистрировали с января 2001 года. Общая численность населения составляет 68 человек. В период с 26 ноября по 12 декабря 2011 года с диагнозом ГЛПС госпитализированы в лечебные учреждения республики 11 человек, сообщивших как о месте инфицирования, о пребывании в данном пункте. При проведении эпидемиологического расследования установлено, что 4-5 ноября члены одной семье — восемь взрослых и трое детей принимали участие в уборке жилых помещений. Вследствие применения при уборке дома пылесоса произошло инфицирование всех участников уборки. Из числа людей, принимавших участие в уборке, первой заболела С., поступившая в Аскинскую УРБ 22.11.2011 г. с диагнозом ГЛПС, 10 человек госпитализированы в лечебные учреждения Уфы по месту жительства в период с 23.11 по 12.12.2011 г. с диагнозом ГЛПС. Диагноз ГЛПС подтвержден у всех больных результатами лабораторных исследований. Из 11 больных у 5 болезнь протекала в тяжелой форме и у 6 была средней тяжести.

В октябре 2011 г. с учетом высокого риска заражения на территории Аскинского района РБ в окрестностях данного пункта была проведена защитная барьерная дератизация на площади 3 га. Для ликвидации возникшего эпидочага 14.12.2011 г. проведена заключительная дезинфекция и дератизация жилых помещений. После проведения противоэпидемических мероприятий больных ГЛПС не зарегистрировано. Представленные материалы позволяют заключить, что основными причинами возникновения вспышки с групповой заболеваемостью послужили недостаточные объемы и низкая эффективность поселковой и барьерной дератизации, высокая проникаемость грызунов в жилые помещения, а также неиспользование средств дезинфекции и индивидуальной защиты. В 2010-2011 гг. показатели численности мышевидных грызунов в окрестностях данного пункта до начала барьерной дератизации достигали в среднем от 9 до 12% в орудия лова; через 2 недели после обработки — 3-4% попадания в орудия лова. Вследствие низкой эффективности барьерной дератизации здесь сохранились условия для миграций мышевидных грызунов в жилье человека.

Крупная вспышка с бытовой групповой заболеваемостью ГЛПС имела место в январе-феврале 2017 г. в Демском районе г. Уфа. Особо подчеркнем, что возникновение вспышки в г. Уфа имело место на фоне низкой эпизоотической активности природных очагов ГЛПС на территории РБ. Показатель заболеваемости ГЛПС по РБ составил 34,3 на 100 тыс. населения, что значительно ниже среднесулетних значений в период 2010-2015 гг. (40,7 на 100 тыс. населения). В осенний период 2016 г. в лесостепной зоне Республики Башкортостан средние показатели численность мышевидных грызунов в открытых станциях не превышали 8,5% ; в горно-лесной зоне — 5,6% попадания в орудия лова; в степной зоне — 7,3% попадания в орудия лова. Показатели численности рыжей полевки не превышали 2,2% попадания в орудия

лова. Общая инфицированность грызунов составила 5,9% (2015 г. — 4,8 %; среднемноголетний показатель — 8,1%).

В зимний период 2016-2017 гг. на территории РБ зарегистрировано 324 случая заражения ГЛПС. В степной зоне РБ спорадические случаи заражения ГЛПС среди сельского населения имели место в 9 из 14 расположенных здесь административных районов. Всего зарегистрировано 24 случая заражения, т.е. 7,4% от общего числа заболеваний в РБ. В сельских населенных пунктах, расположенных в лесной зоне РБ, в зимний период 2016 — 2017 гг. зарегистрировано 26 случаев заражения ГЛПС, т.е. 8,0% от общего числа заболеваний в РБ. Спорадические случаи заражения ГЛПС отмечены в 9 из 10 административных районов. В лесостепной зоне в зимний период 2016 — 2017 гг. среди сельского населения зарегистрировано 80 случаев заражения ГЛПС, т.е. 24,7% от общего числа заболеваний в РБ. Спорадическая заболеваемость ГЛПС отмечена на территории 16 из 30 административных районов. Среди городского населения в этот же период было зарегистрировано 194 случая заражения ГЛПС, т.е. 59,8% от общего их числа на территории РБ. Спорадическая заболеваемость ГЛПС отмечена в г. Уфа (171 случай), Кумертау (1), Нефтекамск (1), Октябрьский (4), Салават (1), Стерлитамак (1).

Для снижения риска заражения ГЛПС в 2016 г. проведена барьерная дератизация вокруг городов и населенных пунктов, детских оздоровительных учреждений и образовательных учреждений, коллективных садов, мест массового отдыха населения (парки, скверы и др.) на общей площади 62 777 га (2015 г. — 50,8 тыс. га). На территории г. Уфа в 2016 г. двукратно обработано 12,4 тыс. га, в том числе лесных массивов на общей площади около 4,0 тыс. га. В результате выполненных профилактических мероприятий снижение уровня заболеваемости ГЛПС в 2016 г., по сравнению со средними значениями за период 2010-2015 гг., составило около 16%. При этом случаев инфицирования в производственных условиях, а также групповой заболеваемости ГЛПС в 2016 г. не зарегистрировано.

Несмотря на большой объем выполненных профилактических мероприятий эпидемиологическая обстановка по ГЛПС на территории Уфы в январе — феврале 2017 г. резко обострилась, в первую очередь, за счет групповой заболеваемости ГЛПС среди организованной группы работников объектов железнодорожной инфраструктуры Башкирского региона Куйбышевской железной дороги, дислоцированной на территории Демского района Уфы, в пределах одного инкубационного периода. По состоянию на 17 марта 2017 г. общее число больных ГЛПС составило 60 человек, у 53 больных диагноз ГЛПС подтвержден лабораторно. По результатам ретроспективного анализа заболеваемости среди работников Башкирского отделения Куйбышевской железной дороги филиала АОА «РЖД» установлено, что 33 случая заражения произошли на территории Южного и Зареченского парков, 27 — на территории ст. Дема. Все случаи заражения ГЛПС (60) среди работников Башкирского отделения Куйбышевской железной дороги филиала АОА «РЖД» имели место в январе — марте, т.е. в период, когда для природных очагов ГЛПС на территории Республики Башкортостан, в том числе в г. Уфа, характерна низкая эпидемическая активность [9]. Также отмечено, что наиболее вероятным путем инфицирования людей вирусом ГЛПС в данном эпидемическом очаге являлся воздушно-полевой. Данный путь реализовался при уборке помещений, в которых обитали мелкие млекопитающие — резервуары вирусов ГЛПС и имелись их сухие экскременты, сухим методом без применения средств индивидуальной защиты. Не исключается также контактный путь при контакте с экскрементами инфицированных грызунов и пищевой — через загрязненные экскрементами грызунов продукты, хранящиеся на рабочих местах. В весенний период 2017 г. на прилегающей территории лесного массива к производственным зданиям железной дороги (Южный парк, Заречный парк, ст. Дема) зарегистрирована высокая численность (16 % попадания в орудия лова) и инфицированность грызунов; подтверждено наличие их подснежного размножения. В целях ликвидации эпидемического очага с групповой заболеваемостью ГЛПС в период с 19 января по 14 марта 2017 г. проведена дезинфекция и дератизация на общей площади 11 092 м². Приняты меры по повышению защищенности производственных помещений от проникновения грызунов с прилегающих территорий. Регистрация

этой вспышки с групповой заболеваемостью еще раз показывает, что мероприятия по ГЛПС на энзоотичных территориях РБ должны проводиться систематически в течение всего года. При этом комплекс профилактических мероприятий в соответствии с требованиями санитарных правил СП 3.1.7.2614-10 «Профилактика ГЛПС» и СП 3.5.3.3223-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации и проведению дератизационных мероприятий» должен включать поселковую дезинфекцию наряду с барьерной и объектовой дератизацией.

Для снижения риска заражения ГЛПС разработан «План комплексных мероприятий по стабилизации заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС) населения Республики Башкортостан в 2017 г.» (утвержден Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 31.03.2017 г.). Внесены коррективы в «План комплексных мероприятий по профилактике заболевания геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС) среди населения Республики Башкортостан на 2017-2021 годы», направленные на оздоровление природного очага ГЛПС на территории РБ. При этом отмечено, что основным тактическим приемом предупреждения возникновения эпидемических очагов с групповой заболеваемостью ГЛПС среди сельского и городского населения РБ является одновременное применение барьерной, поселковой дератизации и дезинфекции на участках высокого риска заражения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вишняков С.В., Мясников Ю.А., Панина Т.В., Жукова Л.Д. К разработке системы дератизационных мероприятий в лесных очагах геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Журн. микробиол. 1966, 8:12-17.
2. Горбунов М.А. Особенности эпидемиологии и профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Уфе. Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 1968.
3. Иванова А.В., Сафронов В.А., Степанов Е.Г., Мочалкин П.А., Попов Н.В. Выявление участков высокого риска заражения ГЛПС на территории Республики Башкортостан с применением ГИС-технологий. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 2: 40-44.
4. Мясников Ю.А., Ретина Т.Н., Марценкевич Ч.И., Горбунов М.А. Эпидемиологические типы заболеваемости ГЛПС в Башкирской АССР. Вирусные геморрагические лихорадки. 1971, 19: 359-370.
5. Магазов Р.Ш., Минин Г.Д., Коробов Л.И., Кулагин В.Ф. Вопросы профилактики ГЛПС. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: актуальные проблемы эпидемиологии, патогенеза, диагностики, лечения и профилактики. Под ред. Р.Ш. Магазова. Уфа, Гилем, 2006.
6. Минин Г.Д., Коробов Л.И., Валеев В.Т., Рожкова Е.В. Организация неспецифической профилактики геморрагической лихорадкой с почечным синдромом на эндемичной территории — в Республике Башкортостан. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013, 2:50-53.
7. Мочалкин А.П., Аминов Д.Г., Баязитов У.Ш. Статистическая оценка связей между солнечной активностью, эпидемическим, эпизоотическим процессами при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в природном очаге. Дезинфекционное дело. 2004, 4: 63-6.
8. Мочалкин П.А., Мочалкин А.П., Степанов Е.Г., Фарвазова Л.А., Попов Н.В. Эпидемиологическая дифференциация природных очагов ГЛПС Республики Башкортостан. Журн. микробиол. 2016, 3:24—31.
9. Мочалкин П.А., Мочалкин А.П., Степанов Е.Г., Фарвазова Л.А., Попов Н.В. Пространственные особенности распределения показателей заболеваемости ГЛПС на территории Республики Башкортостан в 2010—2015 гг. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017, 4 (95): 81-86.
10. Мусина С.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в Башкирии по материалам диагностического отделения 4 инфекционной клинической больницы. Эпидемические вирусные инфекции. Тр. ин-та полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. 1965, 7:115-122.
11. Рябов С.В., Попов Н.В., Мочалкин П.А., Мочалкин А.П., Нечаев С.А. Неспецифическая профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Эпидемиология и санитария. 2010, 3:18-21.

12. Хунафина Д.Х., Галиева А.Т., Шайхуллина Л.Р., Бурганова А.Н., Шамсиева А.М., Кутуев О.И., Сартланова Г.Р. ГЛПС. Современная эпидемиология. Медицинский альманах. 2000, 2: 154-156.
13. Ткаченко Е.А., Бернштейн А.Д., Окулова Н.М., Иванов А.П., Ишыхаметов А.А., Пиликова О.М., Транквилевский Д.В., Бахтина В.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (история, проблемы и перспективы изучения). Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 3 (88): 23-33.

Поступила 05.03.18

Контактная информация: Мочалкин Павел Александрович, к.м.н., 450005, Республика Башкортостан, Уфа, ул. Мингажева, 127/1, р.т. (347)273-83-27

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

А.А.Марцев¹, В.М.Рудакова², А.В.Ильина¹

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ И ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ЗООНОЗНЫМ ИНФЕКЦИЯМ ВО ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТИ

¹Владимирский государственный университет, ²Центр гигиены и эпидемиологии во Владимирской области, Владимир

Цель. Оценка эпидемиологической и эпизоотической обстановки на территории Владимирской области по природно-очаговым зоонозным инфекциям. *Материалы и методы.* В работе был проведен ретроспективный анализ статистических данных по заболеваемости населения зооантропонозами, полученных из отчетных форм №2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» Центра гигиены и эпидемиологии во Владимирской области за период 1958 — 2016 гг. Исследования биологического материала на наличие возбудителей природно-очаговых инфекций проводились в лаборатории природно-очаговых и особо опасных инфекций Центра гигиены и эпидемиологии во Владимирской области. Построение и редактирование карт проводилось с помощью ГИС программы ArcView 3.1 и стандартной компьютерной программы Paint. Статистическую обработку данных, корреляционный анализ проводили в программе Statistica. *Результаты.* Установлено, что на территории Владимирской области регистрируются следующие природно-очаговые заболевания: бешенство, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), клещевой боррелиоз (КБ), лептоспироз, псевдотуберкулез и туляремия. Наибольший удельный вес в структуре заболеваемости приходится на ГЛПС и КБ. Ежегодные лабораторные исследования биологического материала на наличие возбудителей природно-очаговых инфекций свидетельствуют о наличии эпизоотий среди мышевидных грызунов, доминирующим видом среди которых является рыжая полевка. Соотношение заболевших ГЛПС мужчин и женщин составляет примерно 3:1, основными факторами риска в передаче инфекции являются уборочные работы на дачных участках и посещение лесных зон. В области существуют стойкие природные очаги КБ. Установлено, что отсутствует территориальная зависимость между показателями заболеваемости и «заклещеванности» территории, а основное эпидемиологическое значение имеют иксодовые клещи *Ixodes ricinus* и *Ixodes persulcatus*. *Заключение.* Картирование регистрируемой заболеваемости позволило показать территории с различной степенью эпидемического проявления по отдельным природно-очаговым заболеваниям и по комплексу заболеваемости в целом. Положительные результаты лабораторных исследований свидетельствуют об эпизоотической активности и постоянном риске обострения эпидемической ситуации по зооантропонозным инфекциям, а отсутствие заболеваемости людей в течение ряда лет не является свидетельством затухания природного очага инфекции и основанием для свертывания профилактических мероприятий.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 20—26

Ключевые слова: Владимирская область, клещевой боррелиоз, ГЛПС, туляремия, лептоспироз, бешенство, природный очаг, эпизоотия

EPIDEMIC AND EPIZOOTIC SITUATION OF NATURAL-FOCAL ZOOBOTIC INFECTIONS IN VLADIMIR REGION

¹Vladimir State University, ²Center of Hygiene and Epidemiology in Vladimir Region, Vladimir, Russia

Aim. Assessment of the epidemiological and epizootic situation and the degree of danger of the territory of Vladimir region in terms of a complex of natural focal zoonotic infections. *Materials and methods.* In the work, a retrospective analysis of statistical data on the incidence of zoonoses in the population, obtained from Reporting Form No. 2 «Information on Infectious and Parasitic Diseases» of Center for Hygiene and Epidemiology in the Vladimir Region for the period 1958 — 2016 was conducted. Studies of biological material for the presence of pathogens of natural focal infections were conducted in the laboratory of natural focal and especially dangerous infections of Center of Hygiene and Epidemiology in the Vladimir Region. *Results.* It is established that the following natural focal diseases are registered in the territory of the Vladimir region: rabies, haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), tick-borne borreliosis (TBB), leptospirosis, pseudotuberculosis and tularemia. The largest share in the structure of morbidity falls on HFRS and TBB. Annual laboratory studies of biological material for the presence of pathogens of natural focal infections indicate the presence of epizootics among rodent mice, the dominant species among which is the red vole. The ratio of men to women with HFRS is about 3 to 1, the main risk factors for transmission are harvesting in summer cottages and visiting forest areas. As for the TBB, in the region there are persistent natural foci of this infection. It was established that there is no territorial dependence between the incidence and «riches» of the territory, and the main epidemiological significance is the ixodid mites *I. ricinus* and *I. persulcatus*. *Conclusion.* The cartographic mapping of the registered incidence allowed to show the territories with different degree of epidemic manifestation for individual natural-focal diseases and for a complex of morbidity in general. Positive laboratory results indicate epizootic activity and a constant risk of exacerbation of the epidemic situation of zoonoses infections, and the absence of human morbidity over a number of years is not evidence of the attenuation of the natural focus of infection and the basis for the curtailment of preventive measures.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 20—26

Key words: Vladimir region, tick borreliosis, HFRS, tularemia, leptospirosis, rabies, natural focus, epizootic

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время весьма актуальным является изучение закономерностей территориального распространения природно-очаговых заболеваний и циркуляции в природе их возбудителей. Пишутся монографии, создаются атласы, посвященные данной проблеме [7-10]. В первую очередь, данное обстоятельство связано с современным антропогенным преобразованием территорий, а также с глобальными изменениями климата. Кроме того, современная актуальность мониторинга природно-очаговых инфекций определяется довольно активными в некоторых регионах миграционными процессами и переселением в различные зоны природных очагов людей без соответствующего иммунитета. Аналогичным образом возрастает риск заражения населения в связи с практикой садоводства, огородничества и активного отдыха на природе [5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе был проведен ретроспективный анализ статистических данных по заболеваемости населения зооантропонозами, полученных из отчетных форм №2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» Центра гигиены и эпидемиологии (ЦГиЭ) во Владимирской области за период 1958 — 2016 гг. Исследования биологического материала на наличие возбудителей природно-очаговых инфекций

проводилось в лаборатории природно-очаговых и особо опасных инфекций Центра гигиены и эпидемиологии во Владимирской области. Построение и редактирование карт проводилось с помощью ГИС программы ArcView 3.1 и стандартной компьютерной программы Paint. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Природные условия Владимирской области определяют возможность циркуляции возбудителей ряда природно-очаговых инфекций, что подтверждает собранная статистическая информация. Согласно официальным статистическим данным, территория региона является эндемичной по следующим природно-очаговым инфекционным заболеваниям: бешенство, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), клещевой боррелиоз (КБ), лептоспироз, псевдотуберкулез и туляремия.

В течение последних двух десятилетий на территории России отмечалось ухудшение эпизоотической обстановки по бешенству. Сложившаяся ситуация была обусловлена социально-экономическими факторами, возникшими в основном в начале 1990-х гг., когда не проводились комплексные профилактические мероприятия, следствием чего явилось неконтролируемое увеличение количества основных носителей рабического вируса — лисиц, а также увеличение популяции бродячих собак и кошек, поддерживающих эпизоотии в антропоургических очагах инфекции [2]. Организационные и профилактические мероприятия, направленные на борьбу с бешенством, пока не привели к существенному снижению заболеваемости животных и людей этой инфекцией, наносящей большой экономической ущерб. Повышению эффективности таких мероприятий могут служить более четкие представления об эпизоотической ситуации по бешенству на отдельных административных территориях. Во Владимирской области за последние шесть лет (2011 — 2016 гг.) было зарегистрировано три случая заболевания бешенством (по одному случаю в 2013, 2014 и 2015 гг. в разных административных районах). Эпизоотическая ситуация в регионе достаточно напряженная. Основным резервуаром возбудителя данной нозологии в природе являются лисы, на них приходится около 50% выявленных больных животных. Главная же опасность для человека исходит, в первую очередь, от бродячих собак и кошек (около 97% всех укусов, ослюнений и т.п.), инфицирование которых происходит мигрирующими через городские окраины дикими животными (в первую очередь, лисами). От укусов животными за данный период пострадали 24 556 человек, и стоит отметить, что динамика укусов не имеет тенденции к снижению, а наоборот, число укусов увеличилось на 13,6% (с 3860 до 4386 случаев). При этом в области наблюдается значительная дифференциация по укусам животными. Так, наиболее неблагоприятными районами являются Гусь-Хрустальный и Кольчугинский районы, наиболее благополучными — Петушинский и Суздальский (среднемноголетние показатели укусов: 471, 412, 160 и 184 на 100 тысяч населения соответственно). Прогноз по заболеваемости остается неблагоприятный: во-первых, эпизоотическая ситуация по бешенству остается напряженной в ряде соседних областей (Московской, Нижегородской, Ивановской, Рязанской); во-вторых, увеличивается удельный вес лис, больных бешенством. В профилактике городского бешенства основными нерешенными вопросами остаются: наличие бродячих собак и кошек, неполноценная иммунизация домашних животных, неудовлетворительная работа бригад по отлову животных и приютов по их содержанию.

В последние десятилетия произошла активация природных очагов ряда зоонозов, в частности геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС). Этот вирусный нетрансмиссивный зооноз в России занимает ведущее место среди зоонозных вирусных инфекций и одно из первых мест среди всех природно-очаговых болезней человека, число зарегистрированных случаев в отдельные годы достигает 20 000 и более [6]. Источником инфекции при ГЛПС являются грызуны, причем вирус не обладает выраженной моногостальностью, поэтому многие разновидности местной фауны грызунов могут оказаться опасными. Остается нерешенной проблема восприимчи-

вости людей в отношении возбудителей ГЛПС. Предполагают, что для заболевания требуется достаточно большая доза. Многие люди, живущие в пределах природного очага, за редким исключением, ГЛПС не болеют. По-видимому, еще в детском возрасте местные жители постепено, возможно при заражении сначала не очень большими дозами, подвергаются «проэпидемичиванию» [4]. За период 2013 — 2015 гг. с целью диагностики эпизоотического процесса в регионе серологически был исследован материал от 367 мелких млекопитающих (грызунов), из них с положительным результатом оказались 15. Доминирующим видом среди попадающих в давилки Геро мышевидных грызунов является рыжая полевка. Помимо нее среди отавливаемых грызунов встречаются следующие (в порядке убывания): малая лесная мышь, серые полевки, водная полевка, полевая мышь и бурозубки. Недостаточная дифференцированная диагностика не позволяет судить о типе возбудителя (Поумала, Доброва или другие) и, следовательно, основной резервуар возбудителя в природе остается неизвестным. Стоит отметить на территории области тенденцию к росту числа заболеваний ГЛПС. За исследуемый период (1978 — 2016 гг.) было зарегистрировано 354 случая заболеваемости, которая увеличилась с 1 случая в 1978 году до 31 в 2016 году. Чаще всего заболеваемость регистрируется в Гороховецком, Камешковском и Селивановском районах. За весь анализируемый период единичный случай заболеваемости данной инфекцией был зарегистрирован в Александровском районе. Анализ причин и условий заражения свидетельствует о том, что основными факторами риска в передаче инфекции являются уборочные работы на дачных участках и посещение лесных зон, в единичных случаях — рыбалка. Инфицирование в основном происходит воздушно-пылевым путем (две трети случаев). Соотношение заболевших мужчин и женщин составляет примерно 3:1, городских и сельских жителей практически равное.

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) выявлен в нашей стране сравнительно недавно. Это исторически новая группа инфекционных заболеваний, возбудители которых являются генетическими разновидностями боррелий, идентифицированных в начале 1980-х гг. в США. В нашей стране боррелии впервые были серологически верифицированы в 1985 г. в Северо-Западном регионе. В 1991 г. болезнь Лайма была включена в официальный перечень нозологических форм, имеющих в России. В природных очагах возбудители циркулируют между иксодовыми клещами и дикими животными — источниками инфекции.

Во Владимирской области мониторинг за заболеваемостью ИКБ проводится с 2005 года. За период с 2005 по 2016 гг. в регионе было зарегистрировано 1507 случаев заболеваемости, которая снизилась на 48% (150 случаев в 2005 году, 78 в 2016 году). Самая высокая заболеваемость отмечается в Ковровском, Кольчугинском и Петушинском районах. В Меленковском районе за весь период наблюдений зафиксирован один случай заражения данной инфекцией. Фауна иксодовых клещей в области представлена тремя видами: *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus* и *Dermacentor reticulatus*, основное эпидемиологическое значение имеет два первых. За период с 2012 по 2015 гг. в лаборатории природно-очаговых и особо опасных инфекций ЦГиЭ на зараженность боррелиями было исследовано 68 иксодовых клещей, из них 46 оказались «положительными». Стоит отметить, что между показателями заболеваемости ИКБ и «заклещеванностью» территории (показателями, которые на первый взгляд должны положительно коррелировать друг с другом) никакой территориальной зависимости нет ($r = -0,18$, $P = 0,48$). Чаще всего клещи нападают на людей на юго-востоке области (Меленковский, Муромский и Гусь-Хрустальный районы), но данные территории являются наиболее благополучными по заболеваемости ИКБ. Данное обстоятельство в очередной раз доказывает необходимость поиска факторов, обуславливающих циркуляцию возбудителя в природе, и такие исследования в регионе уже проводятся [11]. Основными направлениями в работе по профилактике клещевого боррелиоза в регионе являются санитарно-просветительская работа среди населения и повышение знаний медработников ЛПУ по клещевому боррелиозу, а также акарицидные обработки территорий детских оздоровительных учреждений.

Лептоспироз — одно из самых распространенных зоонозных заболеваний, регистрируемых более чем в 80 государствах, в том числе и в России. Резервуарами инфек-

ции в природе служат разнообразные животные, обитающие в различных климатогеографических зонах. На большей части территории России отмечается выраженная и устойчивая тенденция к росту заболеваемости людей лептоспирозом. Сохраняется повышенная эпидемическая активность лептоспирозных очагов в населенных пунктах, в том числе в крупных городах. В 2005—2007 гг. в России регистрировали 600—800 случаев лептоспироза в год, преимущественно в Южном, Центральном и Северо-Западном федеральных округах, в которых заболеваемость составляла от 0,3 до 1,2 случая на 100 тыс. человек в год при средней летальности 3,3% [1]. Высокая распространенность данной инфекции обусловлена особенностями природно-климатических условий, приведших к формированию и длительному существованию природного очага лептоспироза. Динамика заболеваемости имеет циклический характер, при этом можно сделать предположение, что чем дольше продолжается ремиссия, тем значительней последующая вспышка. Чаще всего заболеваемость лептоспирозом регистрируется у жителей северо-востока области (Вязниковский и Гороховецкий районы). В Меленковском и Селивановском районах отмечены единичные случаи заболеваемости за весь анализируемый период). За период 2013 — 2015 гг. в лаборатории природно-очаговых и особо опасных инфекций ЦГиЭ с помощью реакции микроагглютинации и лизиса лептоспир было исследовано 480 мышевидных грызунов, с положительным результатом оказались 3.

На территории Российской Федерации возбудителем туляремии является голарктический подвид *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, который обнаруживает значительную устойчивость во внешней среде, особенно при низкой температуре, хорошо сохраняется в воде, выдерживает высушивание (сохраняется в выделениях восприимчивых животных при полном высыхании и превращении их в пыль). Спонтанная инфицированность возбудителем туляремии пока обнаружена у 145 животных, в России — у 82. Реальное эпизоотическое значение имеют мелкие мышевидные грызуны, ондатры и зайцы, однако при заражении они редко живут более 5-10 дней, поэтому каждое отдельное животное имеет эпизоотическое и эпидемическое значение короткое время. Основным резервуаром, обеспечивающим циркуляцию возбудителя туляремии в природе, являются иксодовые клещи, в теле которых возбудитель может сохраняться неопределенно долгое время. При этом важно отметить, что туляремия встречается только на тех территориях, на которых обитают иксодовые клещи. Человек может заразиться при нападении иксодовых клещей, водным, пищевым, воздушно-пылевым, а также контактным путем. Восприимчивость человека к возбудителю очень высокая. При перенесении инфекции вырабатывается стойкий иммунитет и отмечается алергизация в отношении возбудителя и его антигенов. С 1958 по 2016 годы на территории Владимирской области регистрировались в основном единичные случаи заболеваемости туляремией (всего 118 случаев). Отмечена вспышка в 2005 году в Гусь-Хрустальном районе: было зафиксировано 28 случаев. Интересным фактом является то обстоятельство, что в этом же году эпидемическая вспышка туляремии была зарегистрирована и в соседней Московской области [3]. Очевидно, что отсутствие заболеваемости людей туляремией в течение ряда лет не является свидетельством затухания природного очага инфекции и основанием для свертывания противотуляремийных мероприятий. Также стоит отметить, что в Киржачском, Петушинском, Селивановском и Меленковском районах случаев заболеваемости туляремией за данный период выявлено не было. За период 2013 — 2015 гг. в лаборатории природно-очаговых и особо опасных инфекций ЦГиЭ биопробным методом было исследовано 417 грызунов, возбудитель туляремии выделен не был. Бактериологически было обследовано 1185 проб из объектов внешней среды, в том числе 429 проб воды, возбудитель не выявлен. Серологически исследовано 949 проб из объектов внешней среды, в том числе от мелких млекопитающих, погрызы, содержание нор и т.п., положительный результат получен в 107 случаях.

Что касается заболеваемости псевдотуберкулезом, то данная нозология за последние годы была зарегистрирована лишь единожды, в 2014 году. В 2014 — 2015 гг. было проведено 2538 исследований объектов внешней среды, положительных результатов не было.

В связи с тем, что активность природных очагов зоонозных инфекций в регионе не одинакова, весьма целесообразным является иметь представление о степени опасности той или иной территории по риску заражения комплексом природно-очаговых инфекций (например, при проведении рекреационных мероприятий). Для проведения оценки территории области по данному показателю был использован метод, при котором случай заболевания одной инфекцией приравнивается к другому по степени опасности для здоровья населения. Другими словами, заражение, например, возбудителем туляремии представляет ту же опасность для здоровья, что и заражение возбудителем иксодового клещевого боррелиоза. Расчет показателей заболеваемости ведется на 100 тысяч населения. Многолетние показатели заболеваемости отдельными нозологиями для каждого административного района складывались и на основе итоговой суммы районам присваивался ранг, соответствующий степени опасности: 1 (низкая степень опасности), 2 (средняя степень опасности) или 3 (высокая степень опасности). На основе ранжирования значений многолетней заболеваемости населения Владимирской области зооантропонозами была построена итоговая карта, отражающая степень опасности по данному показателю.

Картографическое отображение регистрируемой заболеваемости позволило определить территории с различной степенью эпидемического проявления по отдельным природно-очаговым заболеваниям и по комплексу в целом. Установлено, что наиболее неблагоприятными территориями по комплексу зооантропонозов являются Вязниковский, Гороховецкий, Ковровский, Кольчугинский и Петушинский районы.

Основными причинами, способствующими циркуляции природно-очаговых инфекций в регионе, являются следующие: снижение объемов всех видов дератизационных мероприятий и как следствие этого увеличение популяции мышевидных грызунов, которые при ряде природно-очаговых инфекций являются источником (резервуаром) возбудителей инфекций (ГЛПС, лептоспироз, туляремия), при других являются и кормовой базой для источников инфекции (бешенство), увеличение кормовой базы, в свою очередь, приводит к росту популяции хищников (в данном случае лис); снижение объемов иммунизации населения в последние годы (против туляремии); предоставление земельных участков на территории природных очагов инфекционных заболеваний жителям других областей без согласования с органами санэпиднадзора и предварительного проведения профилактических мероприятий; недостаточный уровень информированности населения по профилактике природно-очаговых инфекций.

Положительные результаты лабораторных исследований свидетельствуют об эпизоотической активности и постоянном риске обострения эпидемической ситуации по зооантропонозным инфекциям, а отсутствие заболеваемости людей в течение ряда лет не является свидетельством затухания природного очага инфекции и основанием для свертывания профилактических мероприятий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Владимирской области в рамках научных проектов № 16-45-330572 р_а «Разработка методологических подходов и оценка медико-экологической ситуации во Владимирской области»; № 17-45-330946 р_а «Разработка методологических подходов к оценке и прогнозированию эпидемиологической ситуации по комплексу природно-очаговых и паразитарных заболеваний во Владимирской области».

ЛИТЕРАТУРА

1. Андаев Е.И. и др. Результаты иммунологического скрининга на природно-очаговые и «экзотические» инфекционные болезни отдельных групп населения Хабаровского края, Амурской области и Еврейской автономной области. Проблемы особо опасных инфекций. 2014, 1: 112-115.
2. Бельчихина А.В., Караулов А.К. Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных на территории Российской Федерации. Ветеринария сегодня. 2016, 1: 64-70.
3. Демидова Т.Н. и др. Эпизоотическое и эпидемическое проявление природных очагов туляремии на территории Московской области (1965-2013 гг.). Журн. микробиол. 2015, 2: 24-62.

4. Зуева Л.П., Яфаев Р.Х. Эпидемиология. СПб, Фолиант, 2005.
5. Истомина А.В. Региональный мониторинг природно-очаговых инфекций. Псковский региональный журнал. 2006, 1: 122-135.
6. Коломинов С.И. Эпизоотологические и экологические аспекты распространения и прогнозирования заболеваемости в природных очагах геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Автореф. дис. канд. мед. наук. Нижний Новгород, 2012.
7. Малхазова С.М., Семенов В.Ю., Шартова Н.В. и др. Здоровье населения Московской области: медико-географические аспекты. М., ГЕОС, 2010.
8. Медико-географический атлас Смоленской области. Евдокимов С.П., Каманин Е.И., Малхазова С. М. (ред.). Смоленск, 2012.
9. Медико-экологический атлас Воронежской области. Куролап С.А. и др. (ред.). Воронеж, Истоки, 2010.
10. Природноочаговые болезни: медико-географический атлас России. Ватлина Т.В., Котова Т.В., Малхазова С.М. и др. (ред.). М., Географический фак. МГУ им. М.В. Ломоносова, 2017.
11. Трифонова Т.А., Марцев А.А. Оценка и прогнозирование эпидемиологической обстановки по иксодовому клещевому боррелиозу во Владимирской области. Журн. микробиол. 2016, 1: 58-62.

Поступила 01.03.18

Контактная информация: Марцев Антон Андреевич, к.б.н.,
600000, Владимир, ул. Горького, 87

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*И.В.Яковлева¹, Е.А.Курбатова¹, Э.А.Ахматова², Е.В.Сухова², Д.В.Яцунский²,
Ю.Е.Цветков², Н.Э.Нифантьев², В.В.Свиридов¹*

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ТЕТРАСАХАРИДУ — СИНТЕТИЧЕСКОМУ АНАЛОГУ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE СЕРОТИПА 14 И ИХ ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Институт биоорганической химии им. Н.Д.Зелинского, Москва

Цель. Получение моноклональных антител (МкАт) к синтетическому тетрасахариду — повторяющемуся звену капсульного полисахарида (КП) *Streptococcus pneumoniae* серотипа 14 и их иммунохимическая характеристика. *Материалы и методы.* Для получения гибридомы, продуцирующей МкАт, мышей иммунизировали синтетическим тетрасахаридом, конъюгированным с бычьим сывороточным альбумином (БСА) с последующей гибридизацией В-лимфоцитов с клетками мышинной миеломы. Антитела получали *in vitro* и *in vivo*. Иммунохимическую характеристику МкАт к тетрасахариду проводили в реакции иммунопреципитации и с помощью различных вариантов постановки ИФА. *Результаты.* Впервые получена мышинная гибридома, продуцирующая IgM к тетрасахариду. Титр IgM к тетрасахариду в супернатантах клонов и в асцитической жидкости мышей в ИФА, выявленных с помощью биотинилированного тетрасахарида и синтетического КП, адсорбированных на твердой фазе, был выше по сравнению с использованием твердофазного бактериального КП. В реакции ингибирования ИФА МкАт распознавали соответствующие углеводные эпитопы растворенного в жидкой фазе бактериального КП *S. pneumoniae* серотипа 14 лучше, чем лиганд тетрасахарида и синтетический КП. *Заключение.* Для выявления МкАт к тетрасахариду в ИФА в качестве твердофазных антигенов предпочтительно использовать синтетические аналоги КП. Полученные МкАт к тетрасахариду могут быть использованы для определения представленности протективного тетрасахаридного эпитопа в КП при разработке пневмококковых вакцин.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 26—31

Ключевые слова: моноклональные антитела, изотип, синтетический тетрасахарид, *Streptococcus pneumoniae* серотипа 14, капсульный полисахарид

I.V.Yakovleva¹, E.A.Kurbatova¹, E.A.Akhmatova², E.V.Sukhova², D.V.Yashunsky²,
Yu.E.Tsvetkov², N.E.Nifantiev², V.V.Sviridov¹

THE PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO TETRASACCHARIDE — SYNTHETIC ANALOGUE OF THE CAPSULAR POLYSACCHARIDE OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* OF SEROTYPE 14 AND THEIR IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow, Russia

Aim. Production of monoclonal antibodies (mAb) to synthetic tetrasaccharide — repeating unit of the capsular polysaccharide (CP) of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 and their immunochemical characterization. **Materials and methods.** In order to generate the hybridoma producing mAb, mice were immunized with synthetic tetrasaccharide conjugated with bovine serum albumin (BSA) with following hybridization of B lymphocytes with mouse myeloma cells. Antibodies were obtained *in vitro* and *in vivo*. Immunochemical characterization of mAb to tetrasaccharide was carried out using a variety of ELISA options. **Results.** For the first time obtained mouse hybridoma, producing IgM to tetrasaccharide. The IgM titer of anti-tetrasaccharide antibodies in supernatants of clones and in the ascitic fluid of mice in ELISA detected by biotinylated tetrasaccharide and synthetic CP adsorbed on the solid phase was higher compared to the use of bacterial CP as well cover antigen. In the reaction of inhibition of the ELISA, the mAb recognized the corresponding carbohydrate epitopes of the bacterial CP of *S. pneumoniae* serotype 14 dissolved in the liquid phase better than tetrasaccharide ligand and synthetic CP. **Conclusion.** To detect mAb to tetrasaccharide in ELISA preferably to use synthetic analogues of the CP as solid phase antigens. The obtained mAb to tetrasaccharide can be used to determine the representation of the protective tetrasaccharide epitope of CP in the development of pneumococcal vaccines.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 26—31

Key words: monoclonal antibody, isotype, synthetic tetrasaccharide, *Streptococcus pneumoniae* serotype 14, capsular polysaccharide

ВВЕДЕНИЕ

Пневмококки являются причиной тяжелых инвазивных и неинвазивных заболеваний у детей и взрослых. Бактериальная клетка пневмококка окружена полисахаридной капсулой. Капсула пневмококка содержит уникальные углеводные повторяющиеся структуры, определяющие серотиповую принадлежность *S. pneumoniae*. По химической структуре капсульного полисахарида (КП) насчитывают более 90 серотипов *S. pneumoniae*, примерно 20 из которых имеют наибольшее клиническое значение [5]. Антитела к КП распознают углеводные структуры капсулы пневмококка, что приводит к опсонизации бактерий и защите от пневмококковой инфекции [15]. Получение специфичных и высокоаффинных антител к КП *S. pneumoniae*, предназначенных для серотиповой идентификации пневмококка и серологических методов исследований в лабораторных условиях, осложняется трудностью выделения и очистки КП от тейхоевых кислот, липопротеинов, белков наружной мембраны, нуклеиновых кислот и других антигенов микробной клетки и не позволяет охарактеризовать распознаваемые антителами отдельные углеводные эпитопы. Перечисленные недостатки устранимы при использовании синтетических олигосахаридов с известной химической структурой [2]. Современные методы химического синтеза позволяют получить олигосахариды различной длины и пространственной ориентации, обладающие способностью индуцировать образование антител, способных распознавать единичные антигенные детерминанты, и точно идентифицировать соответствующие углеводные эпитопы микроорганизма [13]. Синтетические олигосахариды могут быть использованы для получения МкАт [9], направленных к строго определенным углеводным макромолекулам капсулы пневмококка.

S. pneumoniae серотипа 14 относится к немногочисленным серотипам пневмококка, наиболее часто вызывающим заболевания у детей [5, 10]. КП *S. pneumoniae* серотипа 14 состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев [2]. В ранее проведенных исследованиях показано, что синтетический тетрасахарид *S. pneumoniae* серотипа 14, конъюгированный с белком-носителем, индуцировал образование опсонизирующих антител, обладающих протективными свойствами, и обладал преимуществом по сравнению с олигосахаридами другой химической структуры [2, 12, 14].

В настоящем исследовании для получения МкАт мы использовали конъюгированный с БСА тетрасахарид — синтетический аналог повторяющегося звена КП *S. pneumoniae* серотипа 14.

Цель работы — получение МкАт к синтетическому тетрасахариду — повторяющемуся звену капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 14 и их иммунохимическая характеристика.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован спейсированный синтетический тетрасахарид (β -D-Gal-(1→4)- β -D-Glc-(1→6)-[β -D-Gal-(1→4)]- β -D-GlcNAc); а также биомолекулярные системы [7, 8] на его основе — конъюгаты с биотином и с БСА [4]. В соответствии с данными MALDI-TOF анализа БСА-гликоконъюгат содержал в среднем 11 тетрасахаридных лигандов, соединенных с БСА цепью, что было эквивалентно 10% углевода.

Синтетический КП *S. pneumoniae* серотипа 14, полученный с помощью реакции поликонденсации, представлял собой полимер, состоящий примерно из 10 повторяющихся тетрасахаридных звеньев [11].

Бактериальный КП получен из среды культивирования штамма *S. pneumoniae* серотипа 14 [1]. Присутствие КП в препарате подтверждено методом ЯМР-спектроскопии. Препараты высокоочищенных КП были предоставлены д.м.н. проф. Н.Е. Ястребовой (НИИВС им И.И.Мечникова).

Гибридома получена в результате слияния спленоцитов мыши BALB/c, 2-кратно иммунизированной неогликоконъюгатом дозой 10 мкг по углеводу, с клетками мышиной миеломы. Процедуру гибридизации проводили на 3 день после второй иммунизации. Выделение иммунных спленоцитов, слияние, культивирование культур, клонирование и селекцию технологичных клонов проводили по принятому протоколу. В результате проведенных экспериментов отобрана и клонирована гибридома 3G12. Дальнейшие эксперименты проводились с участием трех клонов-продуцентов этой культуры: 3G12/B10, 3G12/D4 и 3G12/G11. Нарработку антител проводили *in vitro* и *in vivo*. Гамма-глобулиновую фракцию белков, содержащих МкАт заданной специфичности, получали из среды культивирования клонов-продуцентов при 50% насыщении раствором сульфата аммония [3].

Изотип МкАт определяли методом встречной радиальной иммунодиффузии с антиизотипическими сыворотками (IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgGb, IgG3) в геле по Оухтерлони с использованием препаратов γ -глобулиновых фракций среды культивирования клонов-продуцентов.

Определение титра антител в супернатанте клонов и в асцитической жидкости мышей проводили с помощью ИФА при использовании в качестве твердофазных антигенов биотинилированного тетрасахарида, адсорбированного на покрытых стрептавидином планшетах Pierce (Thermo Scientific, США), а также синтетического и бактериального КП, адсорбированных на планшетах (Biomedicals, Россия) [6]. В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой анти-мышинные IgM (Thermo Fisher Scientific, США). Оптическую плотность (ОП) продуктов реакции определяли на ИФА-ридере (iMark, Япония) при длине волны 450 нм. Точкой отсечения отрицательных результатов считали ОП₄₅₀ < 0,2.

Блокирование связывания МкАт с КП, адсорбированным на твердой фазе, проводили в реакции ингибирования ИФА при использовании в качестве ингибиторов спейсированного тетрасахарида, синтетического и бактериального КП.

Статистическую обработку данных проводили методом Манна-Уитни для независимых выборок при использовании программного обеспечения STATISTICA 10. Данные представлены средним значением \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изотип антител к тетрасахариду определяли методом встречной радиальной иммунодиффузии в геле по Оухтерлони. Для этого использовали выделенные из среды культивирования препараты γ -глобулиновых фракций, содержащие МкАт, и антиизотипические сыворотки мыши: IgG и IgM, а также IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 мыши. Все три клона продуцировали антитела М класса.

Таким образом, в результате эксперимента получено три клон-продуцента IgM-МкАт к тетрасахариду.

В супернатантах клонов биотинилированный тетрасахарид и синтетический КП выявляли IgM к тетрасахариду (рис. 1А). Различий между уровнем МкАт, продуцируемых всеми тремя клонами, не выявлено. При использовании бактериального КП в качестве твердофазного антигена уровень IgM был ниже, чем при использовании синтетических аналогов КП ($p < 0,05$).

Аналогичные результаты получены при исследовании асцитической жидкости мышей (рис. 1Б). Различий между уровнем IgM к синтетическим аналогам КП не выявлено, тогда как уровень антител к бактериальными КП был существенно ниже ($p < 0,05$).

Исследование конкурентного взаимодействия полученных МкАт с иммобилизованным на твердой фазе синтетическим КП и находящимися в растворе тетрасахаридом и синтетическим и бактериальным КП показало, что наиболее активно МкАт связывали бактериальный КП, $IC_{50} = 0,1$ мкг/лунка (рис. 2).

В результате исследования получены IgM-МкАт к тетрасахариду — синтетическому аналогу повторяющегося звена КП *S. pneumoniae* серотипа 14, способные распознавать соответствующие углеводные эпитопы не только синтетических аналогов КП, но и бактериального КП *S. pneumoniae* серотипа 14.

В настоящем исследовании впервые получены МкАт к синтетическому тетрасахариду — повторяющемуся звену КП *S. pneumoniae* серотипа 14, относящиеся к IgM изотипу. В ранее проведенных исследованиях показано, что тетрасахарид указанной структуры, конъюгированный с БСА, адсорбированный на гидроксиде алюминия, обладает наиболее высокой способностью стимулировать выработку опсонизирующих антител и высокой протективной активностью в опытах на животных [12, 14].

В реакции иммунодиффузии с антиизотипическими сыворотками подтверждена принадлежность полученных МкАт к IgM изотипу. При использовании в качестве

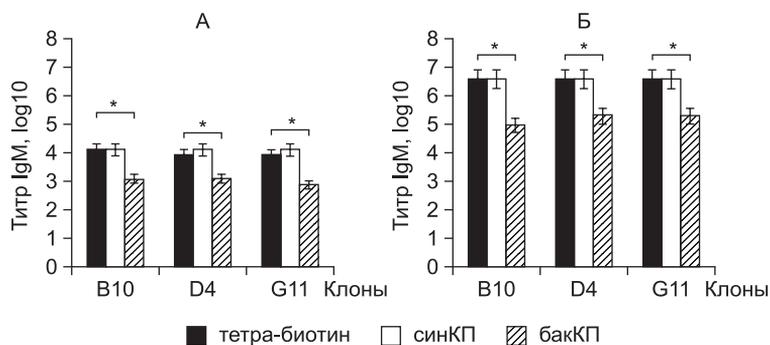


Рис. 1. Титр антител в супернатантах гибридных клонов в асцитической жидкости мышей в ИФА. А — супернатант; Б — асцитическая жидкость; * $p < 0,05$.

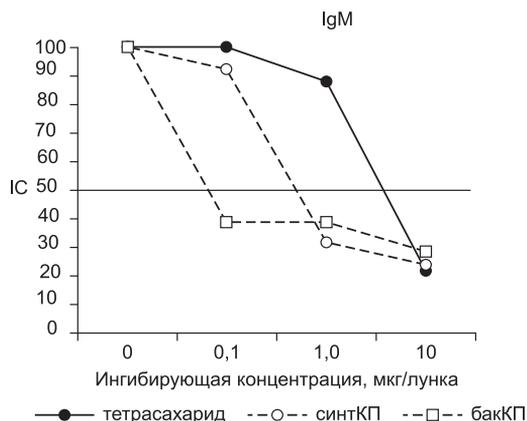


Рис. 2. Способность МкАт к тетрасахариду связывать лиганд тетрасахарида, синтетический и бактериальный КП в реакции ингибирования ИФА.

В качестве твердофазного антигена использован синтетический КП. IC50 — 50% ингибирующая концентрация.

представленности протективного тетрасахаридного эпитопа в КП этого серотипа пневмококка при разработке пневмококковых вакцин.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 14-50-00126.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванеева Н.П., Ястребова Н.Е. Специфический иммунный ответ к отдельным капсульным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae* у здоровых доноров и лиц, вакцинированных пневмококковыми вакцинами. Журн. микробиол. 2015, 5: 20-26.
2. Генинг М.Л., Курбатова Е.А., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э. Разработка подходов к созданию углеводной конъюгированной вакцины третьего поколения против *Streptococcus pneumoniae*: поиск оптимальных олигосахаридных лигандов. Усп. хим. 2015, 84: 1100-1113.
3. Методические рекомендации по получению гибридом-продуцентов моноклональных антител к бактериальным антигенам. Утверждены 29.11. 85 г. МЗ СССР.
4. Сухова Е.В., Яшунский Д.В., Цветков Ю.Е. и др. Синтез олигосахаридных фрагментов капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* тип 14 и их неогликоконъюгатов с бычьим сывороточным альбумином. Известия АН. Серия химическая. 2014, 2: 511-521.
5. Харит С.М. Пневмококковые вакцины. В кн.: Вакцины и вакцинация: национальное руководство. Под ред. В.В.Зверева, Б.Ф.Семенова, Р.М.Хайтова. М., ГОЭТАР-Медиа, 2011.
6. Akhmatova N.K., Kurbatova E.A., Akhmatov E.A. et al. The effect of a BSA conjugate of a synthetic hexasaccharide related to the fragment of capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 14 on the activation of innate and adaptive immune responses. Front. Immunol. 2016, 7: 1-11.
7. Ananikov V.P., Eremin D.B., Yakukhnov S.A. et al. Organic and hybrid systems: from science to practice. Mendeleev Commun. 2017, 27: 425-438.
8. Ananikov V.P., Galkin K.I., Egorov M.P. et al. Challenges in the development of organic and hybrid molecular systems. Mendeleev Commun. 2016, 26: 365-374.
9. Broecker F., Anish C., Seeberger P.H. Generation of monoclonal antibodies against defined oligosaccharide antigens. Methods Mol. Biol. 2015, 1331: 57-80.
10. Jansen W.T., Snippe H. Short-chain oligosaccharide protein conjugates as experimental pneumococcal vaccines. Indian J. Med. Res. 2004, 119 (Suppl): 7-12.

твердофазных антигенов синтетических аналогов КП МкАт хорошо распознавали представленные в них тетрасахаридные структуры. Меньшая способность МкАт связывать бактериальный КП, адсорбированный на твердой фазе, вероятно, обусловлена конформационными изменениями молекулы КП *S. pneumoniae* серотипа 14 при его иммобилизации на твердой фазе, что частично ограничивает доступ к его эпитопам для МкАт. Важно, что в растворе, как это показано нами в реакции ингибирования ИФА, МкАт лучше распознавали соответствующие эпитопы бактериального КП, чем его синтетических аналогов.

Таким образом, для выявления МкАт к тетрасахариду в ИФА в качестве твердофазных антигенов предпочтительно использовать синтетические аналоги КП. Полученные МкАт к тетрасахариду могут быть использованы для определения пред-

11. Kochetkov N.K., Nifant'ev N.E., Backinowsky L.V. Synthesis of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 14. *Tetrahedron*. 1987, 43 (13): 3109-3121.
12. Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Akhmatova E.A. et al. Neoglycoconjugate of tetrasaccharide representing one repeating unit of the *Streptococcus pneumoniae* type 14 capsular polysaccharide induces the production of opsonizing IgG1 antibodies and possesses the highest protective activity as compared to hexa- and octasaccharide conjugates. *Front. Immunol.* 2017, 8: 1-13.
13. Reimer K.B., Gidney M.A., Bundle D.R., Pinto B.M. Immunochemical characterization of polyclonal and monoclonal *Streptococcus* group A antibodies by chemically defined glycoconjugates and synthetic oligosaccharides. *Carbohydr Res.* 1992, 232(1): 131-142.
14. Safari D., Dekker H.A., Joosten A.F. Identification of the smallest structure capable of evoking opsonophagocytic antibodies against *S. pneumoniae* type 14. *Infect. Immun.* 2008, 76 : 4615-4623.
15. Song J.Y., Moseley M.A., Burton R.L., Nahm M.H. Pneumococcal vaccine and opsonic pneumococcal antibody. *J. Infect. Chemother.* 2013, 3: 412-425.

Поступила 25.02.18

Контактная информация: Курбатова Екатерина Алексеевна, д.м.н., 105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-57-74

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*И.В.Фельдблюм*¹, *К.А.Субботина*¹, *С.Д.Новгородова*¹, *Г.М.Игнатьев*^{2,6}, *М.Х.Альева*¹,
*М.К.Ерофеева*³, *В.Г.Орловский*⁴, *И.А.Ленева*⁵, *С.Я.Мельников*², *Е.В.Казакова*²,
*Е.П.Начарова*², *В.П.Трухин*²

РЕАКТОГЕННОСТЬ, БЕЗОПАСНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ РАСЩЕПЛЕННОЙ ВАКЦИНЫ ФЛЮ-М ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ВЗРОСЛЫХ 18-60 ЛЕТ

¹Пермский государственный медицинский университет им. Е.А.Вагнера; ²С.-Петербургский НИИ вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов; ³НИИ гриппа, С.-Петербург; ⁴ООО «Инфекционный центр», Новосибирск; ⁵НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ⁶Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П.Чумакова, Москва

Цель. Оценка реактогенности, безопасности и иммуногенности вакцины гриппозной инактивированной расщепленной Флю-М. *Материалы и методы.* Реактогенность, безопасность и иммуногенность препарата исследованы в многоцентровом двойном слепом сравнительном рандомизированном клиническом исследовании при иммунизации добровольцев 18-60 лет (препарат сравнения — инактивированная сплит-вакцина для профилактики гриппа Ваксигрип). *Результаты.* Отечественная расщепленная гриппозная вакцина Флю-М производства СПбНИИВС характеризуется хорошей переносимостью, высоким профилем безопасности и достаточной иммуногенностью, сопоставимой с гриппозной вакциной Ваксигрип. *Заключение.* Вакцина гриппозная инактивированная расщепленная Флю-М производства СПбНИИВС может быть рекомендована для регистрации на территории Российской Федерации для специфической профилактики гриппа у взрослых в возрасте от 18 до 60 лет.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 31—37

Ключевые слова: вакцина против гриппа Флю-М, взрослое население 18-60 лет, безопасность, реактогенность, иммуногенность, рандомизированное клиническое исследование

I.V.Feldblyum¹, K.A.Subbotina¹, S.D.Novgorodova¹, G.M.Ignatev^{2,6}, M.Kh.Alyeva¹,
M.K.Erofeeva³, V.G.Orlovsky⁴, I.A.Leneva⁵, S.Ya.Melnikov², E.V.Kazakova²,
E.P.Nacharova², V.P.Trukhin²

REACTOGENICITY, SAFETY AND IMMUNOGENICITY OF DOMESTIC FLU-M INACTIVATED SPLIT INFLUENZA VACCINE FOR THE IMMUNIZATION OF ADULTS AGED BETWEEN 18 AND 60

¹Vagner Perm State Medical University; ²St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera and the Bacterial Preparations Factory; ³Research Institute of Influenza, St. Petersburg; ⁴Centre for Infections Ltd., Novosibirsk; ⁵Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ⁶Chumakov Federal Scientific Centre for Research and Development of Immunobiological Products, Moscow, Russian

Aim. The research was aimed at evaluating the reactogenicity, safety and immunogenicity of Flu-M inactivated split influenza vaccine. *Materials and methods.* The reactogenicity, safety and immunogenicity of the drug were studied in the course of a multicenter, double blind, comparative, randomized clinical trial of immunized volunteers aged between 18 and 60 (comparator — Vaxigrip inactivated split vaccine for influenza prevention). *Results.* Domestic Flu-M inactivated split influenza vaccine manufactured by St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera features favorable tolerability, high safety profile and adequate immunogenicity which is consistent with that of Vaxigrip influenza vaccine. *Conclusion.* Flu-M inactivated split influenza vaccine manufactured by St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera can be recommended for authorization in the Russian Federation for the purpose of specific prophylaxis of influenza for adults aged between 18 and 60.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 31—37

Key words: inactivated split influenza vaccine (Flu-M), adult population aged between 18 and 60, safety, reactogenicity, immunogenicity, randomized clinical trial

ВВЕДЕНИЕ

Грипп — наиболее распространенная инфекция, вызывающая ежегодные эпидемии, когда в эпидемический процесс вовлекается до 5-10% взрослого населения и 20-30% детей.

Во всем мире признается, что важнейшей мерой защиты от гриппозной инфекции и ограничения ее распространения является вакцинопрофилактика. Гриппозные вакцины способны защитить от клинического заболевания 70-90% взрослого населения. ВОЗ рекомендует для лиц из групп высокого риска проводить вакцинацию ежегодно, так как она может снизить количество госпитализаций по причине гриппа на 25-39%, а смертность на 39-75% в течение эпидемического сезона [9].

Производство гриппозных вакцин основано на культивировании вируса в культуре соответствующих клеток куриных эмбрионов. Для того, чтобы добиться оптимальной эффективности вакцины против вирусов, превалирующих как в северном, так и в южном полушариях, антигенная структура вакцин пересматривается дважды в год и конкретизируется в соответствии с антигенной характеристикой циркулирующих вирусов гриппа, определенных ВОЗ в рамках глобальной системы эпидемиологического надзора за гриппом (GISRS).

В Российской Федерации зарегистрированы и разрешены к применению для профилактики гриппа как живые, так и инактивированные вакцины. Среди инактивированных вакцин различают цельновирионные, субъединичные и расщепленные. С точки зрения совокупной оценки иммуногенности и переносимости оптимальными считаются расщепленные (сплит) гриппозные вакцины [1, 8, 10]. Преимущество сплит-вакцин в том, что они содержат как наружные, так и внутренние антигены вируса гриппа. Наличие открытых для иммунной системы внутренних антигенов вируса гриппа (нуклеокапсида и матриксного белка) делает сплит-вакцины уникальными. Они защищают не только от ежегодных мутаций вируса гриппа, но частично

и от всех возможных разновидностей вируса, поскольку внутренние антигены подвержены лишь незначительным мутациям. В связи с этим, иммунизация расщепленными вакцинами позволяет сформировать достаточный иммунитет и получить более эффективную эпидемиологическую защиту населения в случае появления новых штаммов подтипов вируса гриппа. В то же время, за счет дополнительной очистки в такой вакцине содержится минимальное количество субстанций, в т.ч. липидных компонентов вируса, с которыми связаны основные побочные реакции [1 — 3, 10].

Сплит-вакцины с успехом используются для профилактики гриппа у детей с 6-месячного возраста, а также у пожилых людей, страдающих хроническими заболеваниями, в том числе у больных бронхиальной астмой [2, 4 — 7].

Рынок отечественных иммунобиологических препаратов представлен в современных условиях, преимущественно, субъединичными вакцинами. Технология и способ получения вакцины гриппозной инактивированной расщепленной как без консерванта, так и с консервантом (тиомерсал) впервые была разработана в С.-Петербургском НИИ вакцин и сывороток, успешно прошла доклинические испытания и I фазу клинических исследований. На основании результатов I фазы клинических исследований, проведенных в 2016 г., была установлена низкая реактогенность, высокий профиль безопасности и иммуногенности данной вакцины, что явилось основанием рекомендовать дальнейшее проведение клинических исследований на расширенном контингенте добровольцев.

Цель настоящего исследования — изучить реактогенность, безопасность и иммуногенность отечественной гриппозной инактивированной расщепленной вакцины Флю-М производства СПбНИИВС в сравнении с инактивированной расщепленной вакциной для профилактики гриппа Ваксигрип производства «Санофи Пастер», Франция, на добровольцах в возрасте 18-60 лет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактогенность, безопасность и иммуногенность гриппозной вакцины Флю-М были изучены в многоцентровом (Пермский государственный медицинский университет им. Е.А. Вагнера; НИИ гриппа, Санкт-Петербург и ООО «Инфекционный центр», Новосибирск) двойном слепом, сравнительном, рандомизированном клиническом исследовании (протокол клинического исследования «ФМВ-ВГИР-II-001/16»).

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

Критериями включения добровольцев в исследование явились: возраст на момент вакцинации от 18 до 60 лет; наличие подписанного и датированного информированного согласия на участие в исследовании; способность выполнять требования протокола; для женщин — отрицательный тест на беременность и использование средств контрацепции в течении всего периода проведения исследования.

Критериями не включения в исследование явились: наличие в анамнезе аллергических реакций на куриный белок или любую предшествующую вакцинацию гриппозной вакциной, лейкоз, онкологические заболевания, вирусные гепатиты В и С, сифилис, ВИЧ-инфекция, синдром Гийена-Барре; получение препаратов иммуноглобулина или крови в течении последних трех месяцев до начала исследования, длительное применение иммуносупрессантов или иммунодефицитное состояние; пребывание на учете в туберкулезном, наркологическом или психоневрологическом диспансере, наличие острых или обострившихся на момент исследования хронических заболеваний инфекционной и неинфекционной природы, злоупотребление алкоголем, употребление наркотиков, беременность и лактация, участие в каком-либо другом клиническом исследовании в течение последних 3 месяцев; вакцинация против гриппа в течение 6 месяцев, предшествующих началу клинических исследований.

По результатам клинико-лабораторного скрининга для участия в исследовании были отобраны 400 добровольцев в возрасте от 18 до 60 лет (средний возраст $33,6 \pm 0,6$ года), которые были рандомизированы на 2 группы. Добровольцы 1 группы (группа наблюдения, $n=200$) были привиты вакциной гриппозной инактивированной рас-

щепленной Флю-М (производства СПбНИИВС), содержащей консервант; добровольцы 2 группы (группа сравнения, n=200) — инактивированной сплит-вакциной для профилактики гриппа Ваксигрип (производства «Санофи Пастер», Франция), не содержащей консервант.

Исследуемый иммунобиологический лекарственный препарат представляет собой гриппозную инактивированную расщепленную вакцину, содержащую консервант тиомерсол в количестве 50 мкг. Активные компоненты вакцины — культивированные на куриных эмбрионах инактивированные расщепленные вирусы гриппа, представлены штаммами вируса гриппа типа А (H1N1 и H3N2) и вируса гриппа типа В по $15 \pm 2,2$ мкг гемагглютиниана каждый.

Препаратом сравнения явилась инактивированная сплит-вакцина для профилактики гриппа Ваксигрип производства «Санофи Пастер» (Франция), не содержащая консервант, аналогичная по составу исследуемому препарату (серия N3E681V).

Реактогенность вакцины оценивали по наличию местных и общих поствакцинальных реакций, степени их выраженности и продолжительности. Местные реакции оценивали по величине участка гиперемии, отека в месте введения препарата и болезненности, системные реакции — по степени повышения температуры тела и выраженности симптомов интоксикации (повышенная утомляемость, головная боль, головокружение, мышечная боль 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, наличие слабовыраженных симптомов интоксикации, гипертермия от 37,0 до 37,8°C соответственно; средняя степень выраженности — гиперемия диаметром более 50 мм или инфильтрат диаметром 26-50 мм, симптомы интоксикации, заметно нарушающие нормальную ежедневную деятельность, гипертермия от 37,9 до 38,5°C; сильная реакция — инфильтрат более 50 мм в диаметре, симптомы, препятствующие нормальной ежедневной деятельности, температура более 38,6°C. Активное наблюдение за привитыми в течение первых 7 дней после вакцинации проводили в условиях поликлиники. На 7 день после вакцинации пациенты получали дневник самонаблюдения, в который с 8 по 21 день вносили данные об общем состоянии, температуре тела, наличии поствакцинальных реакций, осложнений и нежелательных явлений.

Безопасность вакцины оценивали по показателям общего анализа крови (содержание эритроцитов, гемоглобина, СОЭ, форменных элементов, лейкоцитарной формулы), мочи (рН, удельный вес, содержание эритроцитов, лейкоцитов, эпителиальных клеток, цилиндров, белка, глюкозы, кетоновых тел, билирубина, уробилиногена, дрожжевых грибов, бактерий, кристаллов), биохимического анализа крови (АлАТ, АсАТ, щелочной фосфатазы, билирубина, общего белка, мочевины, креатинина, С-реактивного белка, глюкозы) и определения содержания общего IgE и специфического IgE к овальбумину в динамике перед вакцинацией, на 3 и 21 сутки после введения вакцины.

Иммуногенную активность вакцины определяли по данным исследования сывороточных проб в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) по стандартной методике на базе НИИВС им. И.И. Мечникова путем определения в сыворотке крови привитых антител к вирусам гриппа А(H1N1), А(H3N2) и В. Рассчитывали фактор сероконверсии, уровень сероконверсии и серопротекции, а также среднюю геометрическую титра.

Статистический анализ проведен с использованием методов описательной статистики. Достоверность различий в сравниваемых группах оценивали с помощью дисперсионного анализа с использованием программы Statistica (версия 6.0). Уровень статистической значимости (вероятность получения ошибки) в 95,0% расценивали как наличие достоверных различий между двумя явлениями. Для создания базы данных была применена программа MS Excel. При анализе полученных результатов определяли средние величины, стандартное отклонение и хи-квадрат.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количество зарегистрированных местных и системных поствакцинальных реакций достоверно не различалось между исследуемыми группами ($p > 0,05$) (табл. 1).

Местные поствакцинальные реакции как в группе наблюдения, так и в группе сравнения проявлялись, в основном, в виде болезненности в месте введения препарата. Только у одного добровольца группы сравнения наблюдалась гиперемия. Все местные реакции были слабовыраженными и проходили без применения медикаментозной терапии.

Системные реакции в обеих группах наблюдения характеризовались повышением температуры тела до $37,3^{\circ}\text{C}$ в группе привитых вакциной гриппозной инактивированной Флю-М и до $37,5^{\circ}\text{C}$ в группе привитых вакциной Ваксигрип. У одного добровольца, привитого вакциной Флю-М, выявлена системная реакция в виде кашля и фарингита. Других системных реакций как в группе привитых вакциной гриппозной инактивированной расщепленной Флю-М, так и в группе сравнения зарегистрировано не было. Все системные реакции носили слабовыраженный характер.

Анализ субъективных ощущений добровольцев, зафиксированных в дневниках самонаблюдения с 8 по 21 сутки после иммунизации вакцинами Флю-М и Ваксигрип, не выявил каких-либо признаков побочного действия вакцины.

В динамике наблюдения за привитыми добровольцами не выявлено каких-либо значимых различий в показателях общего анализа крови. Все показатели в обеих группах наблюдения находились в диапазонах нормальных значений.

Средние значения биохимических показателей крови у добровольцев обеих групп на разных сроках наблюдения также колебались в пределах нормативных значений. При анализе уровня общего IgE в сыворотке крови не было обнаружено существенных изменений в динамике (до вакцинации, на 3, 7 и 21 сутки после вакцинации, $p > 0,05$) в обеих группах. Анализ динамики уровня специфического IgE к овальбумину в сыворотке крови до вакцинации, на 7 и 21 сутки после вакцинации также не выявил отклонений. Средние значения общего IgE и специфического IgE к овальбумину во все периоды наблюдения не выходили за пределы нормативных значений.

Достоверно значимых различий в средних показателях общего анализа мочи в динамике наблюдения также не установлено, все показатели находились в пределах нормативных значений.

Оценка иммуногенности вакцины Флю-М в сравнении с вакциной Ваксигрип при однократном введении добровольцам в возрасте 18-60 лет выявила высокую иммуногенную активность ко всем штаммам вируса гриппа (вируса гриппа А (H1N1), вируса гриппа А (H3N2) и вируса гриппа В) (табл. 2).

Достоверных различий в уровне серопротекции, сероконверсии и фактора сероконверсии при введении вакцины Флю-М и вакцины Ваксигрип не выявлено ($p > 0,05$).

Получение высокоэффективных отечественных препаратов для специфической профилактики сезонного гриппа — вопрос стратегической безопасности страны.

Таблица 1. Местные и системные поствакцинальные реакции у 1 и 2 групп добровольцев в течение первых 7 суток наблюдения после вакцинации

Характер поствакцинальной реакции	Степень выраженности	Количество добровольцев, у которых были зарегистрированы поствакцинальные реакции				p
		Группа 1 n=200		Группа 2 n=200		
		абс.	%±m	абс.	%±m	
Местные реакции	Отсутствует	190	95,0±1,5	189	94,5±1,5	0,05 (p = 0,823)
	Слабая	10	5,0±1,5	11	5,5±1,6	
	Средняя	0	0,0	0	0,0	
	Сильная	0	0,0	0	0,0	
Системные реакции	Отсутствует	197	98,5±0,9	199	99,5±0,5	1,01 (p = 0,315)
	Слабая	3	1,5±0,9	1	0,5±0,5	
	Средняя	0	0,0	0	0,0	
	Сильная	0	0,0	0	0,0	

Примечание. Статистические различия достоверны при $p < 0,05$.

Таблица 2. Результаты оценки иммуногенности вакцины Флю-М в сравнении с инактивированной сплит-вакциной Ваксигрип

Препарат	Число лиц с парными сыворотками	Из них с 4-кратной сероконверсией во второй сыворотке после вакцинации		СГТА		Кратность нарастания титров антител (фактор сероконверсии)	Кол-во лиц с защитными титрами антител 1:40 и выше	
		абс.	% ±m	до вакцинации	после вакцинации		абс.	% ±m
Штамм вируса гриппа А (H1N1)								
Флю-М	200	182	91,0±2,0	20,1	271,0	13,5	198	99,0±0,7
Ваксигрип	200	173	86,5±2,4	18,91	285,4	15,1	199	99,5±0,5
Штамм вируса гриппа А (H3N2)								
Флю-М	200	177	88,5±2,3	13,4	190,4	14,2	183	91,5±2,0
Ваксигрип	200	178	89,0±2,2	12,1	162,2	13,4	186	93,0±1,8
Штамм вируса гриппа В								
Флю-М	200	175	87,5±2,3	7,4	56,0	7,6	169	84,5±2,6
Ваксигрип	200	164	82,0±2,7	7,3	55,4	7,6	151	75,5±3,0

Многоцентровое двойное слепое сравнительное рандомизированное клиническое исследование, проведенное в группе добровольцев 18-60 лет (средний возраст составил 33,6±0,6 года) выявило низкую реактогенность и высокий профиль безопасности отечественной расщепленной сплит-вакцины для специфической профилактики гриппа Флю-М производства СПбНИИВС. Местные поствакцинальные реакции слабой степени выраженности были выявлены у 5,0% привитых из группы наблюдения и у 5,5% привитых группы сравнения в виде болезненности в месте введения препарата при надавливании и гиперемии (p>0,05). Системные поствакцинальные реакции слабой и средней степени выраженности в виде повышения температуры отмечались у 1,5% и 0,5% иммунизированных соответственно. Все реакции купировались самостоятельно в течение 1-3 дней без применения медикаментозных препаратов.

Результаты проведенных лабораторных исследований подтвердили, что введение вакцины гриппозной инактивированной расщепленной Флю-М, содержащей консервант, не оказывает негативного влияния на основные показатели клинического и биохимического анализов крови, уровень общего IgE и специфического IgE к овалбумину и показатели общего анализа мочи.

Расщепленная вакцина Флю-М характеризовалась высокой иммунологической эффективностью. Однократное введение ее лицам от 18 до 60 лет обусловило выработку антител ко всем штаммам вируса гриппа. Фактор сероконверсии колебался от 7,6 до 15,1.

Вакцина гриппозная инактивированная расщепленная Флю-М по показателям реактогенности, безопасности и иммуногенности сопоставима с вакциной Ваксигрип, которая используется в Российской Федерации для специфической профилактики гриппа с 1992 г. и соответствует международным требованиям к инактивированным вакцинам. Полученные результаты позволяют рекомендовать вакцину Флю-М для регистрации на территории РФ для профилактики гриппа у лиц 18—60 лет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бектимиров Т.А. Вакцинопрофилактика гриппа. Лечащий врач. 2005, 9. Доступен <https://www.lvrach.ru/2005/09/4533051/>.
2. Медуницын Н.В. Вакцинология. М., Триада-Х, 2010.
3. Медуницын Н.В., Миронов А.Н., Мовсесян А.А. Теория и практика вакцинологии. М., Ремедиум, 2015.
4. Грибкова Н.В., Шмелева Н.П. Ретроспективная оценка профилактики гриппа вакциной «Флюваксин» в постпандемические сезоны 2010-2013 годов в Республике Беларусь. Медицинские новости. 2014, 10: 50-52.
5. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Под ред. А.Н. Миронова. М., Гриф и К, 2012.

6. Beran J., Prymula R., Chlibek R. et al. Evaluation of reactogenicity and immunogenicity of two influenza vaccines (vaxigrip and fluarix) in the season 1996-1997. *Cent. Eur. J. Public Health*. 1998, 6(4): 269-273.
7. Beyer W., Palache A., Osterhaus A. Comparison of serology and reactogenicity between influenza subunit vaccines and whole virus or split vaccines: A review and metaanalysis of literature. *Clin Drug Invest*. 1998, 15(1):1-12.
8. Bricout H., Chabanon Al., Souverain A. et al. Passive enhanced safety surveillance for Vaxigrip and Intanza 15 µg in the United Kingdom and Finland during the northern hemisphere influenza season 2015/16. *Euro Surveill*. 2017, 22(18): 1-9.
9. Gessner B.D. et al. Seasonal influenza epidemiology in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Lancet Infectious Disease*. 2011, 11:223-235.
10. Vaccines against influenza WHO position paper. November 2012. *Wkly Epidemiol. Rec*. 2012, 87(47):461-76. PMID:23210147.

Поступила 28.02.18

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

А.С.Пименова¹, О.Ю.Борисова^{1,2}, М.С.Петрова¹, Е.В.Власов³, И.С.Воронина¹, А.Б.Борисова², С.С.Афанасьев¹, Е.Е.Донских², Л.И.Кафарская², В.А.Алешкин¹, А.В.Алешкин¹, М.С.Афанасьев⁴, А.В. Караулов⁴

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА УСКОРЕННОЙ ГЕНОДИАГНОСТИКИ КОКЛЮША НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (LAMP)

¹Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского, ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, ³Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы, ⁴Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва

Цель. Оптимизация ускоренного способа генодиагностики коклюша на основе изотермической амплификации для выявления ДНК возбудителя. *Материалы и методы.* Исследование проводилось на 35 типовых коллекционных штаммах и 169 штаммах *Bordetella pertussis*, *B.parapertussis*, *B. bronchiseptica*, выделенных в бактериологических лабораториях субъектов РФ. В исследование включено 329 клинических образцов, полученных от больных с подозрением на коклюш и контактных с ними лиц, госпитализированных в ИКБ № 1 ДЗМ. Хромосомную ДНК выделяли стандартным методом кипячения из штаммов, из клинических образцов с помощью коммерческих наборов. Выявление и дифференциацию специфических фрагментов генома возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в клиническом материале осуществляли с использованием набора «АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*» (ЦНИИЭ, Москва). *Результаты.* Проведена оптимизация ранее предложенного способа и разработан ускоренный метод генодиагностики коклюшной инфекции на основе LAMP с детекцией с помощью электрофореза, а также с помощью интеркалирующего красителя. Разработанный способ генодиагностики позволяет выявлять ДНК *B.pertussis* в течение 4-5 часов от начала исследования в клиническом материале. Аналитическая чувствительность — 10² ГЭ/мл. Оценка валидности показала, что разработанный способ обладает 99,6% чувствительностью и 98,7% специфичностью; прогностическая ценность положительного и отрицательного результата составила 99,6% и 98,7% соответственно; индекс точности (диагностическая эффективность) — 99,4%; отношение правдоподобия положительного и отрицательного результата — 76,6 и 0,004 соответственно. Оценка аналитической надежности в 100% случаев показала сходимость и воспроизводимость методики. *Заключение.* Диагностический тест по выявлению ДНК *B.pertussis* методом LAMP позволит увеличить эффективность лабораторной диагностики коклюшной инфекции.

Журн. мкробиол, 2018, № 5, С. 37—46

Ключевые слова: коклюш, *B.pertussis*, изотермальная амплификация, диагностика

A.S.Pimenova¹, O.Yu.Borisova^{1,2}, M.S.Petrova¹, E.V.Vlasov³, I.S.Voronina¹, A.B.Borisova²,
S.S.Afanasyev¹, E.E.Donskich², L.I.Kafarskaya², V.A.Aleshkin¹, A.V.Aleshkin¹,
M.S.Afanasyev⁴, A.V.Karaulov⁴

OPTIMIZATION OF A METHOD OF ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) FOR DIAGNOSIS OF WHOOPING COUGH

¹Gabrichesky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pirogov Russian National Research Medical University, ³Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 of the Moscow Department of Healthcare, ⁴Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Aim. Optimization of the accelerated whooping cough method of isothermal amplification for DNA *Bordetella pertussis*. *Materials and methods.* The research was conducted on 35 standard collection strains and 169 strains of *Bordetella* allocated in bacteriological laboratories of territorial subjects of the Russian Federation. The research included 329 clinical samples received from patients with whooping cough and the persons, contact with them, hospitalized in IDCH No. 1 DZM. Chromosomal DNA was extracted with a standard method of boiling from strains, from clinical samples by means of commercial sets. Identification of causative agents of whooping cough were performed with use of the АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL. *Results.* We performed optimization method of a diagnostics of whooping cough by LAMP with detection by means of an electrophoresis and with naked-eye inspection under normal light is developed. The developed method allows to detect a DNA of *B.pertussis* within 4 — 5 hours in clinical material. The analytical sensitivity was 10² GE/ml. Assessment of validity showed that the developed method possesses 99,6% sensitivity and 98,7% specificity; predictive value positiveness and negative result was 99,6% and 98,7%, respectively; the index of accuracy (diagnostic efficiency) — 99,4%; the likelihood ratio of positive and negative result — 76,6 and 0,004, respectively. Assessment of analytical reliability in 100% of cases showed convergence and reproducibility of a technique. *Conclusion.* Diagnostic test on DNA of *B.pertussis* identification by LAMP method will allow to increase efficiency of laboratory diagnosis of whooping cough.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 37—46

Key words: pertussis, *B.pertussis*, isothermal amplification, diagnostics

ВВЕДЕНИЕ

Коклюш является воздушно-капельной бактериальной инфекцией, управляемой средствами массовой иммунизации, введение которой в Российской Федерации с 1959 года привело к значительному улучшению эпидемиологической обстановки [7]. С 1990-х годов в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками регистрируется подъем заболеваемости коклюшем (<https://www.cdc.gov/>), что связано с недостатками вакцинации ацеллюлярными вакцинами, изменением генотипических свойств возбудителя, а также широким внедрением молекулярно-генетических методов для идентификации *B.pertussis* [22, 23]. С 2012 года в России заболеваемость коклюшем стабилизировалась на уровне 3,0 — 5,0 на 100 тыс. населения ([http://www.rosпотребнадzor.ru/](http://www.rosпотребнадзор.ru/)). Вместе с тем, в 2016 году отмечался рост заболеваемости: регистрировались высокая заболеваемость среди детей до 1 года и локальные вспышки с формированием очагов разной интенсивности в организованных детских коллективах [2]. Кроме того, в последние годы в структуре заболеваемости увеличивается удельный вес стертых и легких форм болезни среди детей старшей возрастной группы и взрослых [1, 9]. Поэтому совершенствование лабораторной диагностики будет способствовать раннему выявлению больных коклюшем и бактерионосителей, в том числе, в эпидемических очагах инфекции.

В нашей стране согласно санитарно-эпидемиологическим правилам (СП 3.1.2.3162-14) «Профилактика коклюша» при диагностике коклюшной инфекции используются три метода — бактериологический, серологический и молекулярно-генетический, применение которых определяется сроком развития заболевания.

Наиболее эффективным среди них является молекулярно-генетический, позволяющий выявить фрагмент/фрагменты генома *V.pertussis*, в том числе, геномов нескольких видов бордетелл методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Вместе с тем, применение тест-систем в формате ПЦР-РВ сопряжено с рядом недостатков: высокая стоимость исследования и квалификация персонала, необходимость в приобретении дорогостоящего оборудования и иногда возникающие сложности при интерпретации полученных результатов, что требует проведения повторного исследования. Поэтому разработка альтернативных более простых и надежных методов и тест-систем, направленных на выявление ДНК *V.pertussis*, остается перспективным направлением по улучшению диагностики коклюша, в том числе, и в направлении снижения стоимости самого исследования, что экономически целесообразно для региональных лабораторий с разными системами финансирования.

В течение последних 10 лет перспективным направлением является разработка технологий на основе изотермической амплификации, в частности, метод петлеобразующей изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), который обладает высокой чувствительностью, специфичностью и амплификационной эффективностью [20, 21]. Этот метод применен и для диагностики коклюша [12, 15, 16]. В 2009 году в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского на основании этой технологии предложен способ ускоренной генодиагностики коклюша, позволяющий выявить ДНК *V.pertussis* в клиническом материале в течение 9 — 10 часов от начала исследования с эффективностью 84,9% [3]. Вместе с тем, этот способ требует совершенствования в направлении сокращения времени проведения исследования и увеличения диагностической эффективности. Поэтому целью исследования была оптимизация ускоренного способа генодиагностики коклюша на основе изотермической амплификации для выявления ДНК возбудителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовано 35 типовых коллекционных штаммов *A.viscosus*, *V.bronchiseptica*, *V.parapertussis*, *V.pertussis*, *C.albicans*, *H.influenzae*, *N.meningitidis*, *K.pneumoniae*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.hominis*, *S.mitis*, *S.oralis*, *S.parasanguinis*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*, *S.salivarius* и 18 штаммов представителей рода *Corynebacterium*, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ, Оболенск, Россия) и Государственной коллекции патогенных микроорганизмов НЦЭСМП (Россия); 169 свежее выделенных штаммов *V.pertussis*, *V.parapertussis*, *V. bronchiseptica*, полученных из бактериологических лабораторий ЛПО и ЦГиЭ в субъектах РФ в соответствии с письмом Роспотребнадзора от 19.06.2012 г. № 01/6830-12-32 «Об организации исследований культур возбудителей дифтерии и коклюша». В исследование включено 329 клинических образцов, полученных от больных с подозрением на коклюш и контактных с ними лиц, госпитализированных в Инфекционную клиническую больницу № 1 Департамента здравоохранения города Москвы (ИКБ № 1 ДЗМ). Клинический материал брали двумя сухими стерильными одноразовыми зондами-тампонами (СОРАН, Италия) с задней стенки ротоглотки. Идентификацию микроорганизмов видов *V.pertussis*, *V.parapertussis* и *V.bronchiseptica* проводили согласно методическим рекомендациям (МР 3.1.2.0072-13) «Диагностика коклюша и паракоклюша». Выделение хромосомной ДНК из бактерий проводили кипячением (Маниатис Т., 1984). Выделение ДНК из клинического материала осуществляли с помощью коммерческих наборов «ДНК-сорб-В» (ЦНИИЭ, Москва) (2013 г.) или «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» (ООО «НекстБио», Москва) (2014 — 2016 гг.). Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (Lonza, США) в 50x TAE-буфере (Thermo Fisher Scientific, Литва) в камере SUB-CELL® GT (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве маркера молекулярных масс использовали ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Литва). Электрофорез проводили при напряжении 160 V в течение 60 мин. Продукты амплификации ви-

зуализировали с помощью гельдокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция). Выявление и дифференциацию специфических фрагментов генома возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в клиническом материале осуществляли с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (ЦНИИЭ, Москва). Амплификацию проводили с помощью прибора Rotor-Gene Q 5 plex HRM (QIAGEN GmbH, Германия). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ SPSS 19.0. Для признаков, имеющих распределение, отличное от нормального, данные представлены в виде медианы. Согласованность мнений двух испытателей, осуществляющих исследование, относительно наличия/отсутствия изучаемого качественного критерия оценивали по каппе Кохена [8, 10]. Расчет показателей, характеризующих валидность диагностического теста проводили по стандартным формулам [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами проведена оптимизация ранее предложенного способа [3] и разработан ускоренный метод генодиагностики коклюшной инфекции на основе изотермической амплификации (LAMP), который включает проведение следующих этапов: 1 — взятие клинического материала с задней стенки ротоглотки; 2 — пробоподготовка образца; 3 — выделение ДНК сорбционным методом; 4 — проведение амплификации при изотермических условиях; 5 — детекция продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Взятие клинического материала производили в соответствии с МР 3.1.2.0072-13. Рабочие части зондов помещали в одну пробирку типа эппендорф с 0,5 мл физиологического раствора. Пробоподготовку образца проводили путем смыва клинического материала с тампона в физиологический раствор. Выделение ДНК осуществляли сорбционным методом с помощью коммерческих наборов реагентов в соответствии с инструкцией по применению. Приготовление реакционной смеси проводили путем смешивания двух смесей: смеси № 1 и смеси № 2. Состав смеси № 1: 10х реакционный буфер для ПЦР, 2 mM смесь нуклеотидов (dNTP), 25 mM MgCl₂, раствор Betaine и три пары праймеров [15]. Состав смеси № 2: рабочее разведение (1:9) Bst ДНК-полимеразы в буферном растворе. В смесь № 1 вносили пробы ДНК (по 8 мкл) и минеральное масло. Затем прогревали в течение 5 мин. и охлаждали в течение 1 мин. После чего в каждую пробу вносили смесь № 2, перемешивали на вортексе и осаждали капли кратковременным центрифугированием. В качестве положительного контроля амплификации использовали ДНК штамма *V.pertussis* № 143. Амплификацию в изотермическом режиме проводили или в программируемом твердотельном термостате «Гном», или в амплификаторе «Терцик» при следующих условиях: 65 °С — 60 мин., 80 °С — 2 мин. Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в 50х ТАЕ-буфере в 2 % агарозном геле при 160 В в течение 40 мин. Дифференциацию проводили путем сравнения электрофоретической подвижности полученных фрагментов ДНК с подвижностью контрольного образца ДНК штамма *V. pertussis*. Если у исследуемого ДНК-образца имелись специфические светящиеся профили, аналогичные профилю контрольного штамма *V.pertussis* № 143, то данные образцы регистрировались как содержащие ДНК штамма *V.pertussis* (рис. А, Б).

С целью сокращения времени исследования нами проведена апробация методики детекции продуктов амплификации с помощью интеркалирующего красителя на ограниченном количестве проб клинического материала от больных с диагнозом «Коклюш». Для этого в каждую пробу вносили по 10 мкл 10 000х SYBR Green I. Результаты амплификации оценивали визуально по изменению цвета содержимого пробирки. Положительными считали те пробы, в которых регистрировали светло-зеленое окрашивание, отрицательные образцы имели светло-оранжевое окрашивание.

Следовательно, разработан способ ускоренной генодиагностики коклюша, позволяющий выявлять ДНК *V.pertussis* в течение 4 — 5 часов от начала исследования в клиническом материале. Применение разработанного способа в практическом здравоохранении будет способствовать быстрому лабораторному подтверждению диагноза коклюша.

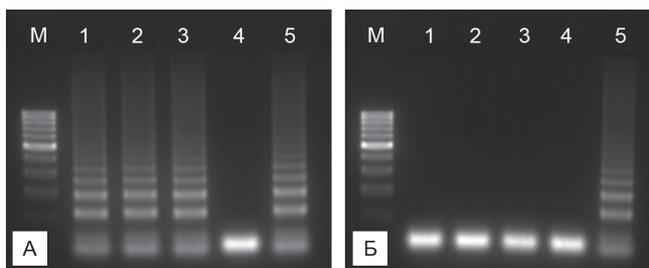
С целью оценки аналитической чувствительности разработанного способа готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры типового контрольного штамма *B.pertussis* № 143: 5×10^9 — 10^1 м.к. в 1 мл. Далее из 100 мкл каждого разведения суспензии выделяли ДНК. Параллельно с этим для определения общего количества жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл бактериальной взвеси из каждого разведения производили высев 100 мкл на чашки Петри с бордетеллагаром. Засеянные чашки инкубировали при 37 °С. Через 72 и 96 часов подсчитывали число выросших колоний (КОЕ/мл). Выделение ДНК из исследуемого материала осуществляли с помощью коммерческого набора «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ». Аналитическая чувствительность составила 10^2 ГЭ/мл.

Оценка аналитической специфичности разработанного способа генодиагностики возбудителя коклюша проведена на типовых коллекционных и свежевыделенных штаммах представителей рода *Bordetella* и микроорганизмов других родов. Установлено, что положительные сигналы отмечали только в образцах, содержащих ДНК *B.pertussis*, в то время как во всех других изученных образцах ДНК положительные сигналы не регистрировали.

Аналитическую надежность диагностического теста оценивали также по частоте совпадения обнаружения ДНК *B.pertussis* в многочисленных пробах одного и того же однородного образца, определяя таким образом сходимость и воспроизводимость методики. Однородный образец (как положительный, так и отрицательный) готовили в лабораторных условиях: в 1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия (рН 7,0) суспендировали полную микробиологическую петлю бактериальной культуры. В качестве положительного контрольного образца использовали типовой штамм *B.pertussis* № 688, в качестве отрицательного — *S.aureus* Wood-46. Затем из положительного контрольного материала готовили 10 одинаковых проб, содержащих по 100 мкл бактериальной взвеси. Аналогичная процедура была выполнена и с отрицательным контрольным образцом. На этапе проведения амплификации каждую пробу тестировали в трех повторах.

Сходимость методики определяли в условиях, при которых результаты ПЦР анализа 60 проб получены при использовании одного и того же метода в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одной и той же партии реактивов, одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени (пяти рабочих дней). По итогам проведенных исследований в 10 пробах с положительным контрольным материалом, каждая из которых тестировалась в трех повторах, ДНК *B.pertussis* была детектирована в 100 % случаев. Наряду с этим, в 10 пробах с отрицательным контрольным материалом, каждая из которых также тестировалась в трех повторах, в 100 % случаев был получен отрицательный результат.

Воспроизводимость методики внутри одной лаборатории определяли на многочисленных пробах одного и того же однородного образца, тестирование которых проводили одним и тем же методом разными операторами с использованием разных партий реактивов и различного оборудования в различные рабочие дни. Проведена оценка согласия между независимыми результатами исследований двух испытателей. При этом между участниками эксперимента наблюдалось полное согласие от-



Выявление ДНК *B.pertussis* методом LAMP: детекция продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (А, Б).

М — маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific.

А: 1—3 — ДНК штаммов *B.pertussis*; 4 — отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 5 — положительный контроль (ДНК штамма *B.pertussis* № 143). Б: 1, 2 — ДНК штаммов *B.parapertussis*; 3 — ДНК штамма *B.bronchiseptica*; 4 — отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 5 — положительный контроль (ДНК штамма *B.pertussis* № 143).

носителем правильности интерпретации результатов при визуализации фрагментов амплифицированной ДНК в агарозном геле (критерий каппа Кохена, $K = 1$). Таким образом, двумя исследователями были получены идентичные результаты.

В исследование было включено 329 пациентов в возрасте от 27 дней до 40 лет, госпитализированных в ИКБ № 1 ДЗМ. Клинический диагноз устанавливался врачами-инфекционистами в соответствии с принятыми протоколами ведения больных. Обследование пациентов проведено с использованием двух методов: метода сравнения и разработанного метода. В качестве метода сравнения использовали коммерческий диагностический тест по выявлению специфических фрагментов генома *V.pertussis* методом ПЦР-РВ. В соответствии с эпидемиологическим анамнезом, анамнезом заболевания, клинической картиной болезни и результатами лабораторного обследования, проведенного методом сравнения, пациенты были разделены на две группы.

В I группу включено 252 больных в возрасте от 0 месяцев до 30 лет, у которых при постановке клинического диагноза в качестве основного заболевания фигурировал диагноз «коклюш» и при использовании метода сравнения в образцах клинического материала была обнаружена ДНК *V.pertussis*. Возраст пациентов I группы: от 0 до 12 месяцев — 165 (65,5%) человек, от 1 года до 7 лет — 68 (27%) человек, от 7 до 18 лет — 12 (4,7%) человек, 18 лет и старше — 7 (2,8%) человек, то есть основную группу составили дети в возрасте от 0 до 12 месяцев (медиана 4 месяца). Тяжесть и течение коклюша оценивали согласно общепринятой классификации, в соответствии с которой у 41 (16,3%) больного коклюш протекал в легкой, у 186 (73,8%) — в среднетяжелой, у 24 (9,5%) — в тяжелой, у 1 (0,4%) — в стертой формах. Следует отметить тот факт, что степень тяжести течения коклюша зависела от возраста больного. Тяжелые формы были только у детей в возрасте 0 — 12 месяцев, в то время как взрослые переболели коклюшем исключительно в легкой форме, а дети ясельного, дошкольного и школьного возрастов — в меньшей степени в стертой или легкой (17 пациентов; 6,8%) и в большей степени в среднетяжелой (63 пациента; 25%) формах.

Обследование пациентов I группы проведено с диагностической целью на разных сроках от начала заболевания: 12 (4,8%) человек — на 1, 72 (28,6%) — на 2, 96 (38,1%) — на 3, 48 (19%) — на 4, 16 (6,3%) — на 5, 4 (1,6%) — на 6, 3 (1,2%) — на 7, 1 (0,4%) — на 8 неделях болезни, то есть большинство (216; 85,7%) больных было обследовано на 2 — 4 неделях болезни.

Во II группу включено 77 пациентов в возрасте от 1 месяца до 40 лет, у которых диагностированы другие заболевания респираторного тракта или установлен контакт с больным коклюшем, и при использовании метода сравнения в образцах клинического материала ДНК *V.pertussis* не была выявлена. Возраст пациентов II группы: от 1 до 12 месяцев — 37 (48%) человек, от 1 года до 7 лет — 26 (33,8%) человек, от 7 до 18 лет — 4 (5,2%) человека, 18 лет и старше — 10 (13%) человек.

В ходе эксперимента установлено, что при использовании разработанного диагностического теста по выявлению ДНК *V.pertussis* в биологическом материале среди пациентов I группы в одном случае получен отрицательный результат, который классифицировался как ложноотрицательный. Среди пациентов II группы также в одном случае получен положительный результат, интерпретируемый как ложноположительный.

Валидность разработанного способа по выявлению ДНК *V.pertussis* в биологическом материале методом LAMP оценивали в соответствии с [4, 8, 10] по следующим критериям: чувствительность и специфичность, прогностическая ценность положительного результата и прогностическая ценность отрицательного результата, индекс точности (диагностическая эффективность), отношение правдоподобия положительного результата и отношение правдоподобия отрицательного результата. Вышеперечисленные критерии рассчитывали по стандартным формулам с использованием полученных данных при распространенности коклюша среди пациентов изученной выборки в 76,6%. Результаты оценки валидности разработанного способа представлены в табл.

Результаты оценки валидности разработанного способа

Критерий (Гринхалх Т., 2006)	Величина критерия	Характеристика (Гринхалх Т., 2006)
Чувствительность	99,6 %	Способность теста определять наличие данного заболевания у пациента
Специфичность	98,7 %	Способность теста определять отсутствие данного заболевания у пациента
Прогностическая ценность положительного результата, ПЦ ⁺	99,6 %	Вероятность того, что при положительном результате теста пациент на данный момент действительно болен
Прогностическая ценность отрицательного результата, ПЦ ⁻	98,7 %	Вероятность того, что при отрицательном результате теста пациент на данный момент действительно здоров
Индекс точности, ИТ (диагностическая эффективность)	99,4 %	Доля истинных результатов (истинно положительных и истинно отрицательных) по отношению ко всем
Отношение правдоподобия положительного результата, ОП ⁺	76,6	Насколько более вероятен положительный результат у больного по сравнению с вероятностью положительного результата у здорового
Отношение правдоподобия отрицательного результата, ОП ⁻	0,004	Насколько более вероятен отрицательный результат у больного по сравнению с вероятностью отрицательного результата у здорового

ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики коклюша стали применяться в различных странах мира с конца 1980-х годов [13, 14, 17 — 19, 22 — 24]. По данным многочисленных источников, чувствительность метода ПЦР при обнаружении ДНК *B.pertussis* в исследуемом материале варьирует от 73 % до 100 % [13, 14, 17, 18]. При этом унифицированной ПЦР тест-системы для диагностики коклюша на сегодняшний день не существует, так как различия в выборе генов-мишеней и систем для их детектирования препятствуют стандартизации метода и созданию единой концепции диагностики коклюша с помощью амплификационных технологий. Тем не менее, применение методов генодиагностики обеспечивает быструю и раннюю диагностику коклюша.

В последнее десятилетие разработаны разные варианты молекулярно-генетических методов для идентификации возбудителя коклюша, основанные на выявлении различных мишеней в геноме *B. pertussis*: гена коклюшного токсина, порина, аденилатциклазного токсина, повторяющихся последовательностей хромосомы [13, 14, 17—19, 22—24]. Опыт применения ПЦР для идентификации возбудителей бордетеллез показал, что наиболее точные результаты получают при использовании праймеров, расположенных в промоторной зоне коклюшного токсина, повторяющихся последовательностях IS481 и IS1001 или гене *суаА*. На данный момент многие исследователи ведут работу по созданию мультиплексных диагностических тест-систем, позволяющих выявлять в биологическом материале и дифференцировать до вида представителей рода *Bordetella* путем одновременной амплификации нескольких специфических ДНК-матриц и последующей их детекцией в режиме реального времени, что увеличивает специфичность исследования [17, 18, 22].

На территории РФ официально зарегистрирован лишь один набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в биологическом материале методом ПЦР-РВ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*» [11]. Вместе с тем, вывод о том, что в образце присутствует ДНК *B.parapertussis*, можно сделать при наличии положительного результата амплификации по области гена *ptxA*, и отрицательного по областям, специфичным для геномов *B.pertussis* и *B.bronchiseptica*. Кроме того, результаты ПЦР-исследования по выявлению и идентификации возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза часто интерпретируются как «Обнаружена ДНК одного из представителей рода *Bordetella*» (многолетние данные, полученные

в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского). В таких случаях для видовой идентификации требовалось повторное взятие клинического материала и выполнение всех этапов ПЦР-исследования, что приводило к увеличению стоимости анализа или было невозможно по причине выписки пациента из стационара.

Также следует учитывать и тот факт, что применение тест-систем в формате ПЦР-РВ сопряжено с необходимостью наличия высокотехнологичного приборного оснащения, что нередко представляет трудности для лабораторий разного уровня финансирования. Поэтому одним из перспективных направлений является разработка тест-систем, направленных на выявление ДНК *V.pertussis*, являющейся наиболее патогенной среди всех бордетелл и вызывающей тяжелые формы заболевания с летальным исходом, использование которых не требует применения дорогостоящего оборудования.

Коллективом авторов НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи в 2010-х годах была разработана видоспецифичная тест-система на основе ПЦР-РВ, позволяющая выявлять в клинических образцах *V.pertussis*, содержащие интеграции IS481 и IS1002 в опероне вирулентности *bvgAS* [5, 6]. В качестве исследуемого субстрата используется смыв с носоглоточного тампона. С помощью предложенной тест-системы ПЦР-РВ осуществляют диагностику типичных и атипичных форм коклюша, бактерионосительства и изучают изменения фазового состава популяции возбудителя. Также результаты исследования могут быть полезны для определения тактики лечения заболевания, особенно, в случаях атипичных форм коклюша, затяжного течения и смешанных с коклюшем респираторных инфекций.

В последнее время популярность приобрели технологии на основе изотермической амплификации, одной из которых является LAMP [20, 21]. Метод петлеобразующей изотермической амплификации, обладающий высокой чувствительностью, специфичностью и амплификационной эффективностью, был применен и при диагностике коклюша [12, 15, 16]. Ранее в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского на основе изотермической амплификации был разработан способ для ускоренной лабораторной диагностики коклюша [3], который позволял выявить ДНК *V.pertussis* в течение 9 — 10 часов от начала исследования в клиническом материале. Нами проведена оптимизация этого способа и разработан новый ускоренный способ, отличающийся от предыдущего сокращением времени пробоподготовки клинического образца, составом реакционной смеси, внедрением процедуры первичного отжига праймеров, возможностями перехода на детекцию с помощью интеркалирующего красителя и, в целом, повышением эффективности выявления ДНК *V.pertussis*. Применение разработанного нами способа позволяет выявлять ДНК *V.pertussis* в клиническом материале в течение 4—5 часов с 99,4 % диагностической эффективностью, в то время как проведение исследования с помощью ранее предложенного способа занимало до 9—10 часов и позволяло выявлять ДНК возбудителя в 84,9 % случаях.

При дальнейшем совершенствовании разработанного способа выявления ДНК *V.pertussis* в направлении создания диагностического теста «у постели больного» проведена апробация методики с использованием детекции с интеркалирующим красителем на ограниченном количестве проб клинического материала от больных с диагнозом «коклюш». Анализ результатов амплификации проводили визуально по изменению цвета содержимого пробирки. Применение данной технологии позволяет сократить продолжительность исследования еще на 1 час, что, в общей сложности, будет занимать 3 — 4 часа от начала. Кроме того, преимуществами использования изотермической амплификации является отсутствие дорогостоящего оборудования для ПЦР-РВ, так как для проведения исследования требуются только реактивы и микротермостат, что делает эту технологию доступной для лабораторий первичного звена и с разной системой финансирования.

Работа выполнена в рамках Государственной НИР МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаченко И.В., Харит С.М., Курова Н.Н. и др. Коклюш у детей: монография. М., Комментарий, 2014.
2. Басов А.А., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г. и др. Особенности распространения коклюша в организованном коллективе с высоким уровнем привитости против этой инфекции. Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2013, 8(4): 60-64.
3. Борисова О.Ю., Петрова М.С., Гадуа Н.Т. и др. Прямой ускоренный метод выявления возбудителя коклюша. Клиническая лабораторная диагностика. 2010, (5): 53-55.
4. ГОСТ Р 53022.3-2008. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. Введ. 2010-01-01. М.: Стандартинформ, 2009.
5. Каратаев Г.И., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю. и др. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis*. Генетика. 2016, 52(4): 422.
6. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Синяшина Л.Н. и др. Распространенность стертых форм коклюша и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis*. Детские инфекции. 2010, 9(4): 19-22.
7. Онищенко Г.Г. Эпидемиологическое благополучие населения России. Журн. микробиол. 2013, (1): 42-51.
8. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика: учебное пособие для вузов. М., ГЭОТАР-Медиа, 2010.
9. Петрова М.С., Попова О.П., Борисова О.Ю. и др. Коклюш у детей раннего возраста. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012, (6): 12-24.
10. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М., РАМН, 2000.
11. Прадед М.Н., Яцышина С.Б., Селезнева Т.С. и др. ПЦР-диагностика инфекций, вызванных *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica*. Клиническая лабораторная диагностика. 2013, (1): 53-56.
12. Brotons P., de Paz H.D., Esteva C. et al. Validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of pertussis infection in nasopharyngeal samples. Expert Rev. Mol. Diagn. 2016, 16(1): 125-130. doi: 10.1586/14737159.2016.1112741.
13. Douglas E., Coote J.G., Parton R. et al. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene. J. Med. Microbiol. 1993, 38(2): 140-144. doi: 10.1099/00222615-38-2-140.
14. Grimprel E.P., Begue P., Anjak I. et al. Comparison of polymerase chain reaction, culture and Western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. J. Clin. Microbiol. 1993, 31(10): 2745-2750.
15. Kamachi K., Toyozumi-Ajisaka H., Toda K. et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J. Clin. Microbiol. 2006, 44(5): 1899-1902. doi: 10.1128/JCM.44.5.1899-1902.2006.
16. Kamachi K., Yoshino S., Katsukawa C. et al. Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens. New Microbes New Infect. 2015, (8): 70-74. doi: 10.1016/j.nmni.2015.10.001.
17. Lanotte Ph., Plouzeau C, Burucoa C. et al. Evaluation of four commercial Real-Time PCR assays for detection of *Bordetella* spp. in nasopharyngeal aspirates. J. Clin. Microbiol. 2011, 49(11): 3943-3946. doi: 10.1128/JCM.00335-11.
18. Litt D.J., Jauneikaite E., Tchipeva D. et al. Direct molecular typing of *Bordetella pertussis* from clinical specimens submitted for diagnostic quantitative (real-time) PCR. J. Med. Microbiol. 2012, 61(12): 1662-1668. doi: 10.1099/jmm.0.049585-0.
19. Loeffelholz M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. J. Clin. Microbiol. 2012, 50(7): 2186-2190. doi: 10.1128/JCM.00612-12.
20. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000, 28(12): E63.
21. Notomi T., Mori Y., Tomita N. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. J. Microbiol. 2015, 53(1): 1-5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9.
22. Qin X., Galanakis E., Martin E.T. et al. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications. J. Clin. Microbiol. 2007, 45(2): 506-511. doi: 10.1128/JCM.02042-06.

23. Qin X. Resurgence of Pertussis and its laboratory diagnosis. Clin. Microbiol. Newsletter. 2015, 37(9): 69-76. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2015.04.001.
24. Stone B.L., Daly J., Srivastava R. Duration of Bordetella pertussis polymerase chain reaction positivity in confirmed pertussis illness. J. Pediatric Infect. Dis. Soc. 2014, 3(4): 347-349. doi: 10.1093/jpids/piu004.

Поступила 05.03.18

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Г.И.Алаторцева¹, А.В.Сидоров¹, Л.Н.Нестеренко¹, Л.Н.Лухверчик¹, А.В.Милованова¹,
Ю.И.Аммур¹, М.И.Михайлов^{1,2}, К.К.Кюрегян^{1,2}, С.В.Жаворонок³, В.В.Зверев¹*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ORF3 ВИРУСА ГЕПАТИТА Е 3 ГЕНОТИПА И ОЦЕНКА ЕГО АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²Российская медицинская академия последиplomного образования, Москва, Россия; ³Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Цель. Разработка рекомбинантного полипептида — аналога полноразмерного белка ORF3 вируса гепатита Е (ВГЕ) 3 генотипа. *Материалы и методы.* Штаммы Escherichia coli, плазмидные векторы, биологические и клинические образцы, молекулярно-биологические, биоинформационные, биохимические, биотехнологические, серологические методы. *Результаты.* Из фекальных экстрактов от свиней из хозяйств Белгородской обл. выделена РНК, которая использована в ОТ-ПЦР для получения фрагмента гена orf3 ВГЕ 3 генотипа. С помощью А/Т-клонирования получена рекомбинантная плаزمиды со вставкой фрагмента ДНК (230 п.н.), кодирующего N-концевой участок белка ORF3. Рассчитана первичная структура недостающего С-концевого участка белка. Для повышения выхода целевого продукта в клетках E.coli проведена оптимизация кодонов последовательности ДНК, кодирующей полноразмерный белок ORF3. Рассчитанный фрагмент ДНК был химически синтезирован и использован при конструировании рекомбинантной плазмиды экспрессии. Получен рекомбинантный штамм E.coli — продуцент белка ORF3 в составе слитного с β-галактозидазой полипептида. Рекомбинантный белок выделен из телец-включений биомассы штамма-продуцента и хроматографически очищен. Антигенная специфичность полученного рекомбинантного полипептида подтверждена в иммунохимических реакциях (ИФА, Вестерн-блоттинг) с образцами сывороток крови больных гепатитом Е и контрольных групп пациентов. *Заключение.* Разработан рекомбинантный антиген ORF3 ВГЕ 3 генотипа и показана возможность его применения в диагностических тестах.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 46—53

Ключевые слова: вирус гепатита Е, ВГЕ 3 генотипа, ген orf3, рекомбинантный антиген ORF3, иммуноферментный анализ, ИФА, Вестерн-блоттинг

*G.I.Alatortseva¹, A.V.Sidorov¹, L.N.Nesterenko¹, L.N.Luhverchik¹, A.V.Milovanova¹,
Yu.I.Ammur¹, M.I.Mikhailov^{1,2}, K.K.Kyuregyan^{1,2}, S.V.Zhavoronok³, V.V.Zverev¹*

OBTAINING THE RECOMBINANT ORF3 PROTEIN OF HEPATITIS E GENOTYPE 3 AND EVALUATION OF ITS ANTIGENIC PROPERTIES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia; ³Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Aim. Design and construction of the hepatitis E virus (HEV) genotype 3 full-size ORF3 recombinant polypeptide. *Materials and methods.* Escherichia coli strains, plasmid vectors, serological

and biological amples, molecular biological, bioinformatic, biotechnological, biochemical and serological methods. *Results.* RNA was isolated from pig fecal extracts collected on Belgorod farms and was used in RT-PCR to obtain the fragment of the orf3 gene of the hepatitis E virus genotype 3. Using A/T-cloning a recombinant plasmid was obtained with insertion of a DNA fragment (230 bp) encoding the N-terminal region of the ORF3 protein. The primary structure of the missing C-terminal region of the ORF3 VGE of the genotype 3 was calculated by bioinformatics methods. Codon optimization of the sequence for biosynthesis in *E.coli* cells was performed. For constructing the recombinant plasmid a chemically synthesized DNA fragment encoding the full-length ORF3 protein had been used. *E.coli* strain producing full-size recombinant protein ORF3 fused to *E.coli* beta-galactosidase was developed. Recombinant protein ORF3 had been isolated from the inclusion bodies of the *E.coli* biomass and purified by size exclusion chromatography. Antigenic specificity of recombinant polypeptide had been confirmed in immunochemical reactions (ELISA, Western blot) with sera from patients with hepatitis E and control groups of patients. *Conclusion.* HEV genotype 3 ORF3 recombinant antigen had been designed, and its applicability in diagnostic tests had been experimentally confirmed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 46—53

Key words: hepatitis E virus; genotype 3 HEV; orf3 gene; recombinant ORF3 antigen, ELISA, Western blot

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит Е (ГЕ) — острое вирусное инфекционное заболевание с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, которое характеризуется преимущественно водным путем распространения, острым течением и частым развитием тяжелых форм у беременных. Подтверждением случая ГЕ считается обнаружение РНК вируса гепатита Е (ВГЕ) в фекалиях и/или сыворотке крови, наличие специфических IgM и/или IgG к ВГЕ с увеличением титра в 4 и более раза в парных сыворотках крови, взятых с интервалом в 4-6 недель в сочетании с клиническими и биохимическими проявлениями острого гепатита. В ряде случаев клинические проявления могут быть стертыми или отсутствовать.

Вирусный геном представлен одноцепочечной полиаденилированной РНК положительной полярности размером 7,3 т.н., содержит три открытые рамки считывания orf1, orf2 и orf3. Одним из важных этапов жизненного цикла вируса является образование бицистронной субгеномной РНК размером 2,2 т.н. с последующей транскрипцией информационной РНК, с которой транслируются наиболее антигенно-значимые белки ORF2 и ORF3 [11, 20]. Продукт гена orf3 — белок ORF3, или VP13 (m.w. 3 kDa) — включает 3 антигенные домена (в положениях с 31 по 40 а.о., с 63 по 76 а.о. и С-концевого участка) [13, 19]. Диагностически важная особенность белка ORF3 — его способность взаимодействовать со специфическими сыворотками крови больных на поздних сроках острой фазы инфекции и в ранней фазе реконвалесценции [16]. Стратегия получения рекомбинантных аналогов полноразмерного белка ORF3 для применения в диагностических тестах представляется наиболее целесообразной, учитывая относительно его небольшой размер и возможность презентации всех эпитопов, необходимых для определения давности инфицирования и стадии развития заболевания.

Генотипирование изолятов ВГЕ показало, что в России и на территории постсоветского пространства циркулируют штаммы ВГЕ преимущественно 3 и 1 генотипов. Поскольку известно, что для белков ВГЕ разных генотипов характерны отличия в антигенных свойствах, была поставлена задача получения рекомбинантных антигенов ORF2 и ORF3 ВГЕ 1 и 3 генотипов путем клонирования в бактериальной экспрессирующей системе соответствующих фрагментов вирусного генома. Получение рекомбинантных полипептидов, содержащих антигенно-значимые фрагменты белков ORF2 и ORF3 ВГЕ 1 генотипа, описано в ранее опубликованных работах [4, 5].

В данной работе была поставлена задача получения рекомбинантного аналога полноразмерного белка ORF3 циркулирующего на территории России штамма ВГЕ 3 генотипа и оценка его антигенных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Праймеры и пробы для проведения ПЦР и секвенирования синтезировали в ЦКП ВНИИСБ «Биотехнология». Получение фекальных экстрактов, выделение из них нуклеиновых кислот и подтверждение наличия РНК ВГЕ методом вложенной ПЦР проводили по ранее разработанным методикам [8]. Тотальную РНК выделяли из фекальных экстрактов с применением наборов QIAamp Viral RNA Mini Kit («Qiagen», Германия) и High Pure RNA Isolation Kit («Roche Diagnostics», Германия). Дополнительно наличие РНК ВГЕ 3 генотипа в образцах тотальной РНК подтверждали методом ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров, Taq-полимеразы и красителя SybrGreen («Синтол», Россия). ДНК-копии полиаденилированной РНК получали с использованием праймеров dT-18 и обратной транскриптазы SuperScript III («Life Technologies», США). Полученные ДНК-копии амплифицировали с помощью высокоточной ДНК-полимеразы «Phusion» («Finnzymes», Финляндия) и вирусоспецифических праймеров. Реакции проводили на термоциклере «TProfessional Gradient» («Biometra», Германия). ПЦР-продукты необходимого размера выделяли из агарозных гелей после электрофоретического разделения ампликонов, для добавления к ПЦР-продукту эктра-3'-dA проводили ещё один цикл амплификации с Taq-полимеразой, полученную ДНК очищали на колонках («Евроген», Россия) и использовали в А/Т-клонировании. Лигирование полученных фрагментов ДНК в плазмидные векторы pGEM-Teasy («Promega», США), pAL2-T («Евроген», Россия), pEL5a [1] и трансформацию компетентных клеток *E.coli* CC001 генотипа XL-Blue (ООО «Евроген», Россия) и штамма *E.coli* PLT90 [2] лигазной смесью осуществляли по общепринятому методу Маниатис Т. и др.

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили методом Сэнгера в модификации капиллярного электрофореза в ЦКП ВНИИСБ «Биотехнология» на геномном анализаторе «ABI-3130-XL» («Applied Biosystems», США). Для анализа и обработки нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайна праймеров использовали пакет программ Vector NTI ver. 11.0. Полипептидные последовательности анализировали дополнительно, используя программу BLAST-Protein. Анализ коротких пептидных гомологий между белком ORF3 ВГЕ 3 генотипа и белками герпес-вирусов человека 1-8 типов проводили, используя ранее описанные алгоритмы [9, 15].

Получение биомасс культур клеток *E.coli* PLT90, трансформированных векторной или рекомбинантными плазмидами, выделение и очистку рекомбинантных полипептидов проводили с помощью ранее опубликованных методик [3, 7].

В работе использовали сыворотки крови больных ГЕ, предоставленные Белорусским государственным медицинским университетом. В качестве источника вирусной РНК использовали образцы фекалий свиней из свиноводческих хозяйств Белгородской обл. Сыворотки крови условно здоровых лиц и контрольной группы (содержащие серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и инфекционных патологий печени иной этиологии: инфекционный мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ-инфекция) были получены из Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф.Владимирского и Клинико-диагностического центра НИИВС им. И.И.Мечникова (Москва). В качестве положительного контрольного образца в иммунохимических реакциях использовали ранее полученный рекомбинантный полипептид ORF3 ВГЕ 1 генотипа [4], в качестве отрицательного — β -галактозидазу *E.coli*, выделенную из клеток штамма PLT90, трансформированных векторной плазмидой pEL5a без вставки вирусоспецифической ДНК. IgG к ВГЕ в образцах сывороток крови выявляли с помощью иммуноферментной тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы»). Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С и возбудителями инфекционной патологии печени иной этиологии определяли с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HAV-G-РЕКОМБ», «ДС-ИФА-НВsAg-подтверждающий тест», «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ/АТ Скрин» (НПО «Диагностические системы»), «Вектогеп В-НВs-антиген-2», «ГепаБест анти-НВс-IgG», «Бест анти-ВГС-авто», «Бест анти-

ВГС-подтверждающий тест», «ВектоЦМВ-IgG-авидность», «ВектоВЭБ-ЕА-IgG», «ВектоВЭБ-НА-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест»), «БЛОТ ВИЧ S+0» (ЗАО БТК «Биосервис»).

Вестерн-блоттинг и твердофазный непрямой иммуноферментный анализ проводили с помощью ранее описанных методик [4, 18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве источника вирусосодержащего материала использовали образцы фекалий от свиней из Белгородской области — региона с высоким распространением ВГЕ среди людей и животных [6]. Из образцов фекальных экстрактов, по результатам ПЦР в реальном времени содержащих РНК ВГЕ 3 генотипа, выделяли тотальную РНК, которую использовали для получения кДНК в реакциях обратной транскрипции с применением праймеров dT-18, принимая во внимание факт 3'-концевого полиаденилирования вирионной РНК ВГЕ. С учетом высокой гетерогенности вирусного генома было проведено конструирование более 20 прямых и обратных праймеров различной степени вырожденности для получения ПЦР-продуктов разной длины. Условия реакции амплификации подбирали в зависимости от размера получаемого продукта, варьируя как состав и концентрацию компонентов реакции, так и условия ее проведения (время элонгации, градиент температуры отжига и т.д.). Критерием отбора ПЦР-продуктов для клонирования был их размер в диапазоне 230–2000 п.н.о. в зависимости от использованных для амплификации праймеров (рис. 1). Отдельные полосы, содержащие полученные ПЦР-продукты разных размеров, вырезали из агарозных гелей, ДНК очищали на колонках и клонировали в векторах pGEM-Teasy или pAL2-T. Полученные рекомбинантные плазмиды исследовали с помощью рестриционного анализа с последующим секвенированием каждой из вставок ДНК, предположительно содержащих вирусоспецифические последовательности. В результате отбора были получены плазмиды, содержащие ПЦР-продукты размером 230 п.н.о., кодирующие N-концевые фрагменты вирусных белков ORF2 и ORF3 ВГЕ 3 генотипа. ПЦР-продукт, содержащий ДНК-копию фрагмента генома ВГЕ 3 генотипа, был получен при использовании следующих праймеров: 5'-ATYGCCCATGGGATCRCCA-3' (прямой), 5'-TCCAGCCCCGGRTTGTGAWA-3' (обратный).

Последовательность клонированного фрагмента кодировала значительную часть (Met1-Leu76) белка ORF3. Анализ нуклеотидной последовательности 3'-концевого фрагмента гена *orf3* протяженностью 111 н.о. показал выраженную гетерогенность, однако кодируемый им С-концевой участок белка ORF3 оказался довольно консервативным, поэтому на основе множественного сравнения доступных в базах данных ами-

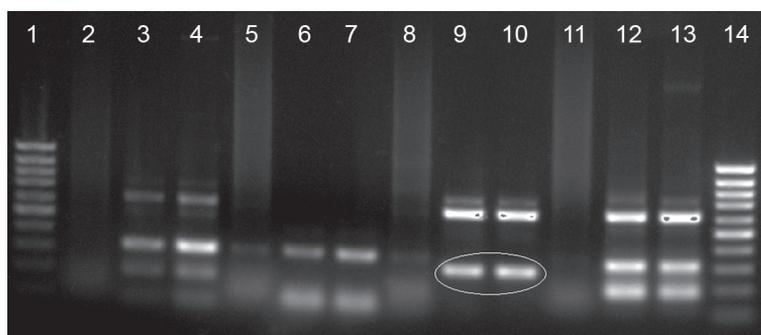


Рис. 1. Разделение ПЦР-продуктов с помощью электрофореза на 1,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

Дорожки: 1, 14 — маркеры молекулярных масс ДНК 100 бр (сверху вниз: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 бр); 2, 5, 8, 11 — отрицательный контроль без добавления ДНК; 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13 — продукты ПЦР. На дорожках 9 и 10 отмечены ПЦР-продукты, содержащие фрагменты ДНК-копии геномной РНК ВГЕ.

нокислотных последовательностей была рассчитана консенсусная последовательность недостающего С-концевого фрагмента ORF3 (Glu77-Arg113): ELALDSRPAPSAPLGLTSPSAPPLPPVVDLPQLGLRR. Для улучшения экспрессии рекомбинантного белка в бактериальной системе дополнительно была проведена оптимизация кодонов. Синтез оптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей полноразмерный белок ORF3 ВГЕ 3 генотипа, был выполнен компанией «Евроген», затем синтетический ген *orf3* амплифицировали с использованием праймеров, фланкированных сайтами рестрикции *Xma*I и *Pst*I. ПЦП-продукт был вставлен в плазмиду pEL5a по соответствующим сайтам.

Анализ коротких гомологичных пептидных последовательностей между белком ORF3 ВГЕ 3 генотипа и белками семейства герпесвирусов человека 1-8 типов подтвердил отсутствие заметной гомологии с белками цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса Эпштейна-Барр (ЭБВ). Ранее мы отмечали мотив QPTSPSP (63-69 а.о.) в белке ORF3 1 генотипа, совпадающий с мотивом в ядерном белке EBNA-2 ЭБВ [4]. В составе белка ORF3 3 генотипа мы обнаружили похожий мотив с консервативной для ВГЕ 3 генотипа аминокислотной заменой Ser на Leu в положении 67, приводящей к изменению структуры потенциального линейного эпитопа. По литературным данным иммунодоминантный домен ORF3 1 генотипа локализован в области 67-76 а.о. [13, 19], нами показано практическое отсутствие совпадения в структуре данного эпитопа у белков ORF3 1 и 3 генотипов (LPP в белке ORF3 ВГЕ 3 генотипа вместо SPP в белке ORF3 ВГЕ 1 генотипа).

Таким образом, была получена плаزمида, кодирующая полноразмерную копию белка ORF3 в виде слитного с β -галактозидазой *E.coli* полипептида. Наличие вставки и рамки считывания слитного белка было подтверждено секвенированием. Белковый состав лизатов клонов рекомбинантного штамма-производителя, полученного в результате трансформации рекомбинантной плазмидой клеток штамма *E.coli* PLT90, исследовали методами электрофореза в SDS-полиакриламидном геле и Вестерн-блоттинга с пулом

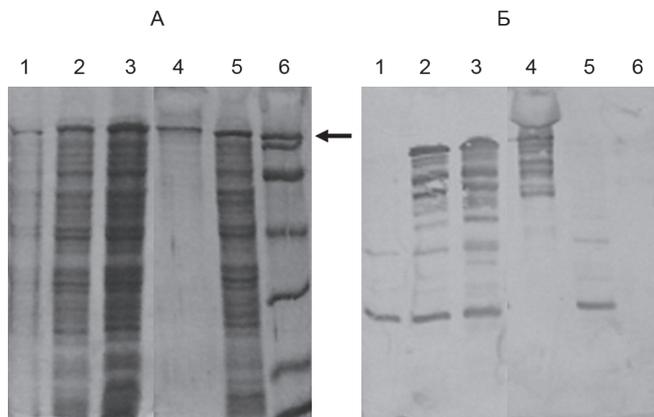


Рис. 2. Анализ с помощью электрофореза в 10% SDS-полиакриламидном геле (А) и Вестерн-блоттинга с пулом сывороток крови больных ГЕ (Б) белковых профилей бактериальных клонов после трансформации рекомбинантной плазмидой, содержащей ДНК-копию гена *orf3* ВГЕ 3 генотипа.

Дорожки: 1, 5 — лизаты биомасс клеток *E.coli* PLT90, трансформированных плазмидой pEL5a без вставки вирусоспецифической ДНК; 2, 3 — образцы лизатов биомасс клонов *E.coli* PLT90, трансформированных рекомбинантной плазмидой со вставкой ДНК-копии гена *orf3* ВГЕ 3 генотипа; 4 — рекомбинантный белок ORF3 ВГЕ 1 генотипа [4]; 6 — маркеры молекулярных масс (193, 112, 64, 30, 26, 12,8; 6,5 кД). Стрелкой показано положение β -галактозидазы *E.coli*.

образцов сывороток крови, содержащих IgG к ВГЕ (рис. 2). По результатам исследований отобрали клон, для которого был показан наибольший уровень синтеза рекомбинантного белка, обладающего антигенной активностью в реакции иммуноблоттинга со специфическими сыворотками.

Степень очистки рекомбинантного антигена ORF3 и β -галактозидазы *E.coli* на отдельных стадиях процесса выделения контролировали с помощью электрофореза в 10% SDS-полиакриламидном геле. Исследование фракций белка после хроматографической очистки подтвердило отделение рекомбинантных полипептидов от основной массы примесных белков. Белковые фракции тестировали также методом ИФА в реакциях с пулом образцов сывороток крови, содержащих IgG к ВГЕ, и с пулом отрицательных сывороток. Фракции, содержащие наибольшее коли-

чество целевого белка и наименьшее примесей, а также показавшие наилучшую реактивность в ИФА с положительной сывороткой и минимальные неспецифические взаимодействия с отрицательной, объединяли, полученный препарат белка дополнительно исследовали методом электрофореза в SDS-полиакриламидном геле. Молекулярная масса полученного рекомбинантного белка, определенная по результатам электрофоретического профиля лизатов штамма-продуцента и препаратов выделяемого из них целевого продукта, соответствовала расчетной величине (128,4 кДа). Продуктивность полученного рекомбинантного штамма составила не менее 2,5 мг рекомбинантного белка на 1 г биомассы, степень очистки белка по данным электрофореза 100%.

Для оценки антигенной специфичности полученного рекомбинантного белка были сформированы контрольные панели образцов сывороток крови, протестированных с помощью коммерческих тест-систем на содержание серологических маркеров инфицирования вирусами гепатитов А, В, С, Е, ВЭБ, ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВПГ1, ВПГ2, ЦМВ. Средние значения оптической плотности (ОП) в обследованных методом ИФА группах образцов при использовании в качестве антигена полученного рекомбинантного белка ORF3 представлены в табл.

При взаимодействии с полученным белком ORF3 3 генотипа 48 из 50 образцов (96 %) от больных ГЕ и реконвалесцентов были позитивными с ОП от 0,236 до 0,657 о.е./мл. Более редкое выявление антител к ВГЕ и относительно невысокие значения ОП можно объяснить, во-первых, меньшим количеством диагностически значимых эпитопов в его составе по сравнению с ORF2, используемом в качестве антигенной основы в наборе реагентов для отбора образцов сывороток [17], и, во-вторых, тем, что белки ORF3 ВГЕ индуцируют образование преимущественно специфических IgM и ранних IgG [16], а данное исследование проводилось на охарактеризованных только в отношении IgG образцах, полученных как от больных, так и от реконвалесцентов.

Ложноположительных реакций с исследованными образцами от здоровых доноров не обнаружено. Результаты тестирования образцов контрольных групп (пациенты с вирусными гепатитами А, В и С, ВИЧ-инфицированные лица, больные цитомегаловирусной инфекцией и герпесвирусными инфекциями, вызванными ВПГ первого и второго типов) показали отсутствие позитивных реакций с полученным рекомбинантным белком, что позволяет сделать заключение о его высокой антигенной специфичности. При использовании в качестве антигена препарата β-галактозидазы, выделенной из биомассы клеток штамма E.coli PLT90, трансформированных плазмидой rEL5a без вставки вирусоспецифической ДНК, положительных реакций с образцами сывороток опытной и контрольных групп не выявлено.

Сравнительные анализ результатов ИФА, полученных с использованием нашего рекомбинантного белка и референс-набора «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», Е-151, НПО «Диагностические системы» (ОПкр. = 0,195) показал полное совпадение: среди обследованных больных ГЕ

и реконвалесцентов не выявлено ложноотрицательных образцов, среди обследованных здоровых доноров и контрольных групп — ложноположительных образцов.

На территории России и большинства других стран наиболее распространен ВГЕ 3 генотипа, что объясняет использование в производимых в России и за рубежом тест-системах для серодиагностики ГЕ в качестве антигенной

Результаты иммуноферментной оценки полученного рекомбинантного антигена ORF3 ВГЕ 3 генотипа

Обследуемая группа	Количество исследованных образцов	Средняя величина оптической плотности при λ=450 нм, ОП сред. (M±m)		
		ORF3 ВГЕ 3 генотипа	β-галактозидаза E.coli	Референс-набор «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», Е-151 ОП _{кр.} = 0,195
Больные ГЕ и реконвалесценты	50	0,407±0,030	0,024±0,002	0,832±0,09
Здоровые доноры	75	0,047±0,006	0,022±0,002	0,029±0,005
Больные ВГА	20	0,084±0,001	0,025±0,002	0,038±0,006
Больные ВГВ	20	0,026±0,002	0,027±0,001	0,027±0,004
Больные ВГС	20	0,025±0,004	0,024±0,002	0,031±0,005
ВИЧ-инфицированные	20	0,079±0,005	0,024±0,001	0,046±0,008
Больные ВПГ-1,2	20	0,091±0,006	0,026±0,002	0,026±0,010
Больные ЦМВ	20	0,033±0,006	0,025±0,003	0,034±0,007

основы рекомбинантных полипептидов, содержащих фрагменты белка ORF3 ВГЕ 3 генотипа различной длины. Небольшой размер белка ORF3, отсутствие значимых аминокислотных гомологий с белками других вирусов, наличие антигенных сайтов на всем протяжении белка определили задачу данного исследования: получение рекомбинантного аналога полноразмерного белка ORF3 ВГЕ 3 генотипа. Предполагаемое рядом авторов конформационное экранирование эпитопов в составе рекомбинантных аналогов полноразмерного белка ORF3 [14] с большой вероятностью не имеет места в случае полученного нами белка, поскольку методика его очистки из нерастворимых телец включений содержит этап денатурации. В первичной структуре полученного рекомбинантного белка выявлена одна аминокислотная замена, затрагивающая иммунодоминантный домен, что может приводить к штаммоспецифичной вариабельности антигенных свойств ВГЕ и свидетельствовать об уникальности антигена, полученного на основе природного изолята вируса. Поскольку в научной литературе имеются сообщения о перекрестной иммунореактивности при выявлении антител к ВГЕ и некоторым герпесвирусам (ВЭБ, ЦМВ), осложняющей интерпретацию результатов серодиагностики ГЕ [10, 12], проведено сравнение аминокислотных последовательностей разработанного нами антигена и белков герпесвирусов, показавшее отсутствие протяженных гомологичных участков. Методами иммуноблоттинга и ИФА в реакциях с сыворотками крови больных ГЕ и групп сравнения, включающими образцы с серологическими маркерами инфицирования ЦМВ и ВЭБ, показана антигенная специфичность полученного рекомбинантного полипептида. Однако для более надежного обоснования возможности применения в диагностических тестах требуется дополнительное расширенное и более детальное исследование его иммунореактивных свойств.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ. 1992. № 2043409 на изобретение «Штамм бактерий *Escherichia coli*, используемый для получения рекомбинантных белков».
2. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Патент РФ. 1992. № 2071501 на изобретение «Вектор рEL5a, предназначенный для экспрессии чужеродной ДНК».
3. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Получение рекомбинантного аналога гликопротеина Е вируса *Varicella zoster*: клонирование, экспрессия и исследование антигенных свойств. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 15, 1(86): 77-85.
4. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 1 генотипа с применением метода оптимизации кодонов. Журн. микробиол. 2017, 6: 63-72.
5. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Получение рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита Е 1: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств. Журн. микробиол. 2017, 6: 72-80.
6. Поляков А.Д. Особенности эпидемиологического процесса гепатита Е в Белгородской области. Научные ведомости. Сер. Медицина. Фармация, 2016, 5(226), вып. 33:79-83.
7. Практическая химия белка. Ред. Дарбре А. М., 1989.
8. Солонин С.А., Мальцева Н.С., Троценко О.Е. и др. Циркуляция вируса гепатита Е на территории Хабаровского края. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2010, 16: 31-36.
9. Altschul S., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search too. *J. Molecular. Biology.* 1990, 215(3):403-410.
10. Fogeda M., de Ory F., Avellyn A. et al. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J. Clin. Virol.* 2009, 45(3): 259-261.
11. Graff J., Torian U. et al. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* 2006, 80: 5919-5926.
12. Nyams C., Mabayoje D.A., Copping R. et al. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J. Med. Virol.* 2014, 86(3): 478-483.

13. Khudyakov Y.E., Khudyakova N.S., Fields H.A. et al. Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus. *Virology*. 1993, 194(1): 89-96.
14. Khudyakov Y. E., Khudyakova N.S, Jue D.L. et al. Comparative characterization of antigenic epitopes in the immunodominant region of the protein encoded by open reading frame 3 in Burmese and Mexican strains of hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 1994, 75 (3): 641-646.
15. Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A. et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992, 89(17): 8259-8263.
16. Ma H., Song X., Li Z. et al. Varying abilities of recombinant polypeptides from different regions of hepatitis E virus ORF2 and ORF3 to detect anti-HEV immunoglobulin M. *J. Med. Virol.* 2009, 81(6): 1052-1061.
17. Obriadina A., Meng J.H., Ulanova T. et al. A new enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus. *J. Gastroenterol Hepatol.* 2002, Suppl 3:360-364.
18. Towbin H., Staehlin T., Gordon Y. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979, 76(9):4350-4359.
19. Yarbough P.O., Tam A.W., Fry K.E. et al. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. *J. Virol.* 1991, 659(11): 5790-5797.
20. Zhou Y.H., Purcell R.H., Emerson S.U. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine*. 2004, 22(20): 2578-2585.

Поступила 11.04.18

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*С.А.Мазурина¹, Г.А.Данилина², М.Ю.Смирнова³, Г.Л.Осипова³, В.Б.Гервазиева¹,
А.Ю.Конищева¹, Т.П.Оспельникова^{1,2}*

МИКРОБИОТА НИЖНИХ ОТДЕЛОВ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ОБСТРУКТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии Н.Ф.Гамалеи, ³НИИ пульмонологии, Москва

Цель. Определить композиционный состав микробиоты и частоту выявления отдельных бактериальных видов в образцах мокроты у пациентов с бронхиальной астмой (БА), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и их сочетанной формой. *Материалы и методы.* Проведено бактериологическое исследование образцов индуцированной мокроты больных хроническими обструктивными заболеваниями легких (БА, ХОБЛ). *Результаты.* У больных сочетанной формой БА и ХОБЛ обнаружен более разнообразный видовой состав *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus* spp., грамотрицательные палочки *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cerasia*, грамположительные палочки и палочковидные бактерии *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp. и *Tsukamurella paurometabola* в сравнении с пациентами, страдающими только астмой или ХОБЛ. Отмечено изменение микробного состава (преобладание *Streptococcus* spp., *Neisseria subflava* и снижение *Enterococcus* spp.) у пациентов с ХОБЛ и сочетанной формой ХОБЛ и БА, осложненных дыхательной недостаточностью, эмфиземой легких и/или диффузным пневмосклерозом. *Заключение.* Видовое разнообразие респираторной микробиоты является не только фактором риска прогрессирующего течения легочных заболеваний, но и свидетельствует о тех изменениях в структуре ткани легкого, которые происходят в процессе хронического воспаления.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 53—60

Ключевые слова: бронхиальная астма, ХОБЛ, сочетанная форма БА/ХОБЛ, респираторный микробиом

THE MICROBIOTA OF LOWER AIRWAYS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASES

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

Aim. We aimed to estimate the composition and the detection frequency of bacterial species in induced sputum samples from patients with bronchial asthma (BA), chronic obstructive lung disease (COPD) and its combined phenotype (ACOS). *Materials and methods.* Bacteriological examination of samples of induced sputum in patients with chronic obstructive pulmonary diseases (BA, COPD) was carried out. *Results.* Patients with asthma-COPD overlap syndrome exhibit more diverse bacterial species composition as represented both by gram-positive *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., gram-negative *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* and rodlike bacterium *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp. и *Tsukamurella paurometabola* as compared to patients with only one diagnosis of COPD or asthma. In addition, we revealed the differences between microbiological diversity and predominance of *Streptococcus* spp., *Neisseria subflava* with decrease of *Enterococcus* spp. in samples from patients with complicated forms of obstructive lung diseases as COPD and ACOS, with pulmonary emphysema and/or pneumosclerosis. *Conclusion.* The biodiversity of lung microbiome could be one of the pathology risk factors in patients with chronic lung diseases, on the other hand reflecting the structural morphological changes in the lung tissue as a result of sustainable inflammation.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), No. 5, P. 53—60

Key words: bronchial asthma, COPD, ACOS, lung microbiome

ВВЕДЕНИЕ

Рост числа заболеваний органов дыхания, среди которых особое место занимают бронхиальная астма (БА), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и их сочетанная форма (ACOS), представляет значительную медицинскую и социальную проблему. Помимо различий в патогенезе этих двух сложных заболеваний, их объединяющей характеристикой является развитие обострений, частота которых приводит к прогрессивному нарастанию тяжести заболевания, переходу из одной формы течения в другую и даже совместному их существованию в виде сочетанной формы ХОБЛ/БА. Основными факторами риска прогрессирующего течения данных заболеваний считается избыточная бактериальная контаминация, которая формирует хронический инфекционный процесс, обеспечивая высокую частоту обострений заболевания и гиперреактивность бронхов с преобладанием Th2 или Th17 иммунного ответа [2]. В среднем больной БА или ХОБЛ переносит в год от одного до четырех и более эпизодов обострений заболевания. Каждое новое обострение приводит к антибиотикотерапии, которая, в свою очередь, обуславливает нарушение нормального роста микробиоты и способствует колонизации патогенными микроорганизмами слизистых оболочек.

В последнее десятилетие новые культурально-независимые методы идентификации микроорганизмов выявили ранее недооцененную сложность бактериального микробиома дыхательных путей. Следует сказать, что в свое время проект «Микробиом человека», запущенный в 2007 году, не включил отбор проб тканей дыхательных путей здорового человека, поскольку легочная ткань в то время считалась стерильной. Однако вскоре после этого появился целый ряд новаторских работ в этой области, которые изменили наше понимание состава и функции микробиоты слизистых дыхательных путей здоровых легких и в условиях хронической патологии. В настоящее время известно, что слизистая оболочка дыхательного тракта заселена специфической бактериальной микробиотой [3,5,13]. Самая высокая плотность ее обнаружена на слизистой верхних дыхательных пу-

тей, достигая до 10^3 жизнеспособных бактерий в мазке из носовой полости и носоглотки и до 10^6 /мл жизнеспособных клеток в отпечатках орофаринкса. В трахее и легких выявленное количество бактерий ниже и составляет в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) из здорового легкого примерно 10^2 /мл бактериальных клеток. С помощью секвенирования консервативных участков бактериальной 16S рРНК установлены 6 доминирующих типов Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroides, Fusobacteria, Acidobacteria и Actinobacteria, обычно встречающихся при хронических легочных заболеваниях. Оценка микробиома носа, ротоглотки и образцов бронхоальвеолярных смывов из нижнего отдела дыхательных путей показала, что тип Proteobacteria и особенно семейства Pasteurellaceae (род Haemophilus), Enterobacteriaceae (род Klebsiella), Neisseriaceae (род Neisseria) и Pseudomonadaceae чаще встречаются в верхних и нижних дыхательных путях взрослых больных астмой, ХОБЛ и у детей с астмой и ассоциированы с ухудшением контроля астмы, инфильтрацией Th17 клеток в слизистой бронхов и суммарным лейкоцитозом в мокроте [4,6,12,14,15]. В противоположность этому, наличие Actinobacteria коррелировало с улучшением и/или стабильностью контроля астмы. Некоторые различия в результатах исследования бактериальных типов или родов в микробиоме легких пациентов с хроническими заболеваниями могут быть связаны с методическими подходами. Так, современные некультуральные генетические методы хороши для изучения фундаментальных вопросов разнообразия человеческого микробиома. В то же время, культуральный анализ видового состава микробиоты, используемый в клинической практике, представляется полезным в стратегии терапевтических подходов в каждом конкретном случае хронической воспалительной патологии дыхательных путей человека.

В этой связи, целью настоящего исследования было определить композиционный состав микробиоты и частоту выявления отдельных бактериальных видов в образцах мокроты у пациентов с бронхиальной астмой, хронической обструктивной болезнью легких и их сочетанной формой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было проведено одномоментное кросс-секционное исследование, в которое были включены 56 пациентов с заболеваниями верхних дыхательных путей (ХОБЛ, БА и сочетанные их формы) в возрасте от 21 до 70 лет, проходящих консультационно-клиническое обследование в ГКБ №57. Диагноз и степень тяжести заболевания установлен по совокупности всех клинических признаков, данных лабораторно-инструментального обследования больных в клинике, согласно GINA (2009, 2014) и GOLD (2008). Синдром сочетания БА и ХОБЛ (ACOS) был установлен согласно большим и малым критериям Louie S. (2013). У всех пациентов исследовали композиционный состав респираторного микробиома методом бактериологического анализа бронхиального секрета.

Сбор и обработку образцов индуцированной мокроты выполняли в соответствии с правилами, представленными в методических указаниях «Микробиологические методы обследования пульмонологических больных» и «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. МУ 4.2.2039-05, 2005 г.». Для контроля качества мокроты готовили мазки, окрашивали их по Граму и под малым увеличением в затемненном фоне проводили подсчет лейкоцитов и эпителиальных клеток (Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний. МУК 4.2.3115-13, 2013 г.). В образцах, содержащих, согласно критериям Murrey-Washington, меньше 10 эпителиальных клеток и больше 25 лейкоцитов в одном поле зрения, осуществляли выделение и идентификацию изолятов культуральным методом (Приказ № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений, от 22.04.1985 г.») с использованием селективных питательных сред и диагностических тест-систем API фирмы Био-Мерье (Франция) и Lachema Entero-test-24, Staphy-test-16, Strepto-test-16 (Чешская республика). Материал высевали на твердые питательные среды (5% кровяной агар, среды Эндо, Макконки, Гектоин, желточно-солевой агар, энтерококковый агар, среда Сабуро) и

культивировали в течение 18-24 ч в термостате при температуре 37°C. Подсчет микроорганизмов осуществляли количественным методом — число колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл клинического материала. Для характеристики частоты встречаемости отдельных видов и биоценоза в целом использовали показатель постоянства «С» с выделением представителей основной, дополнительной и случайной микрофлоры. Показатель постоянства «С» выражался в процентах: $C = p \times 100/P$, где p — число выборок, содержащих изучаемый вид, P — общее число взятых выборок. К основной микрофлоре отнесены таксоны, характеризующиеся высокой частотой встречаемости ($C > 45\%$), к дополнительной микрофлоре — при значениях «С» от 25% до 44%, а к случайной микрофлоре — $< 25\%$.

Уровень общего IgE в сыворотке крови и sIgA в слюне определяли методом ИФА, используя соответствующие диагностические тест-системы «Вектор-Бест» согласно инструкции по применению.

Статистическую обработку материала проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0. Вычисляли следующие величины: медиану M_e ; интерквартильный размах (25%; 75%) и частоту встречаемости %. Связь между исследуемыми показателями оценивали корреляционным анализом с вычислением коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). Сравнение частоты распределения проводили с помощью критерия хи-квадрат Пирсона с поправкой по Йетсу. Критической величиной уровня значимости считали 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все обследованные нами лица были разделены на 4 группы. В первую группу включили 8 пациентов с atopической БА. Средний возраст пациентов — 40 (28; 53) лет, длительность заболевания астмой — 17,5 (7; 21) лет. Уровень сывороточного общего IgE в этой группе больных составил 540 (303; 560) МЕ/мл, sIgA в слюне — 985 (385; 1950) мг/л.

Вторую группу составили 15 больных atopической БА сочетанной с ХОБЛ (БА/ХОБЛ), у 5 из которых патология была осложнена дыхательной недостаточностью (1-2 степени), эмфиземой легких и диффузным пневмосклерозом. Средний возраст больных был 54 (46,5; 65,5) года, длительность заболевания — 22 (15; 30) года. Уровень общего IgE в этой группе составил 115 (6; 460) МЕ/мл, sIgA в слюне — 750 (250; 3800) мг/л.

В третью группу вошли 23 пациента с ХОБЛ и присоединившейся к ней БА (ХОБЛ/БА). У 13 больных этой группы болезнь сопровождалась дыхательной недостаточностью (1-2 степени), эмфиземой легких и диффузным пневмосклерозом. Средний возраст пациентов — 57 (52; 60) лет, длительность заболевания — 10,5 (5; 15) лет. Уровень общего IgE в этой группе больных составил 100 (16; 368) МЕ/мл, sIgA в слюне был снижен относительно нормативных значений и составил 510 (320; 2200) мг/л.

В четвертой группе были 10 человек с ХОБЛ, у 5 из которых отмечена эмфизема легких и диффузный пневмосклероз. Средний возраст пациентов — 62 (58,5; 68) года, длительность заболевания — 18 (10; 30) лет. Уровень общего IgE был в пределах допустимой нормы и составил 48 (16,5; 108) МЕ/мл, sIgA в слюне — 1000 (850; 2900) мг/л.

Следует отметить, что у пациентов с сочетанным синдромом легочной патологии хроническое воспаление протекает на фоне сниженных показателей sIgA (750 мг/л и 510 мг/л соответственно) в слюне и значений общего IgE в пределах верхней границы нормы (115 МЕ/мл и 100 МЕ/мл соответственно). Это может свидетельствовать о сниженной активности врожденного иммунитета у этих больных.

Все пациенты обследованы в период ремиссии заболевания и в течение 4 недель до исследования не принимали антибактериальную терапию.

При бактериологическом исследовании образцов индуцированной мокроты было выделено более 50 культур. Композиционный состав микрофлоры дыхательных путей легких был представлен в основном 8 видами микроорганизмов, причем их количественное значение в целом не превышало 10^3 КОЕ/мл. С утяжелением

патологии, присоединением к астме ХОБЛ и, наоборот, разнообразие микробного состава расширялось до 30 изолятов. При этом отдельные виды бактерий высевались в большом количестве 10^6 — 10^7 КОЕ/г. К грамположительной флоре относились 19 видов бактерий (61,2%), к грамотрицательной — 12 видов (38,7%). Были определены также грибы рода *Candida albicans* и *Aspergillus* spp. (*A. niger*, *A. fumigatus*). Среди выделенных культур ведущей была грамположительная микробиота, которая преимущественно относилась к кокковой. Среди грамположительных кокков доли выделенных культур (17 видов) родов *Staphylococcus* и *Streptococcus* были практически сопоставимы (15% и 12,5% соответственно). Среди выделенных стафилококков доминировал *S.aureus* (43%). Видовой пейзаж стафилококков включал еще 4 вида: *S.epidermidis*, *S.milleri*, *S.lugdunensis*, *S.acidominimus*, последние три были представлены единичными изолятами.

Внутри рода *Streptococcus* доминировали α - и β -гемолитические стрептококки (*S.pyogenes*, *S.pneumoniae*). Выделенный спектр стрептококков включал еще 6 видов: *S.agalactiae*, *S.faecium*, *S.mitis*, *S.constellatus*, *S.acidominimus*, которые были представлены единичными изолятами.

Среди грамположительных кокков были выделены также *Enterococcus* spp., доля которых составила 20,5%.

Грамположительные палочки и палочковидные бактерии были представлены видами *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp. и *T. paurometabola*.

Среди грамотрицательной микробиоты отмечалось незначительное преобладание кокковой флоры — *N. subflava* и *N. mucosa*. Грамотрицательные палочки были представлены семейством *Enterobacteriaceae*: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *S. marcescens* и отдельными представителями: *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *B. cepacia*.

Постоянными или основными микроорганизмами, выделенными из образцов индуцированной мокроты, являлись α -гемолитические стрептококки, *Enterococcus* spp. и *N.subflava*. К добавочной микробиоте относились β -гемолитические стрептококки, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *K.pneumoniae*, *E.coli* и *C.albicans*, к случайной — *P.aeruginosa*, *H.influenzae*, *B.cepacia*, *S.marcescens*, *Aspergillus* spp., *Actinomyces* spp., другие виды *Neisseria* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp.

Проанализировав результаты посевов образцов индуцированной мокроты в группах исследуемых больных в зависимости от легочной патологии, мы получили следующие данные.

У всех пациентов с БА или ХОБЛ в образцах мокроты значительно чаще высевались представители постоянной (основной) микробиоты: α -гемолитические стрептококки (100% и 100% соответственно), *Enterococcus* spp. (62,5% и 50%) и *N.subflava* (75% и 65%) в сравнении с пациентами с сочетанной патологией ($p < 0,05$). По мере осложнения основного заболевания и перехода его в сочетанную форму высеваемость основных микроорганизмов снижалась. Так, в группах БА/ХОБЛ или ХОБЛ/БА α -гемолитические стрептококки были обнаружены у 33% и 78% больных соответственно. При этом в образцах мокроты этих пациентов другие виды стрептококков были обнаружены с частотой 20% и 58,3% соответственно. Аналогичным образом изменялся видовой состав *Staphylococcus* spp. У больных БА или ХОБЛ в образцах индуцированной мокроты часто высевался *S.aureus* (50% и 40% соответственно), у больных сочетанной патологией БА/ХОБЛ или ХОБЛ/БА — кроме *S.aureus* (20% и 26% соответственно) выделены и другие *Staphylococcus* spp. в 20% и 17,4% случаев. Интересно при этом отметить, что высеваемость *S.epidermidis* у больных ХОБЛ прямо пропорционально коррелировала с длительностью заболевания (0,5; $p = 0,03$) и возрастом больных (0,35; $p = 0,04$). Количество высеваемых *Enterococcus* spp. и *N. subflava* у пациентов с БА/ХОБЛ или ХОБЛ/БА также снижалось до 33%, 26% и 33%, 43,5% соответственно. При этом в образцах мокроты пациентов с сочетанной патологией были выявлены другие виды *Neisseria* spp. в единичных случаях. Что же касается добавочной микробиоты, то у пациентов с сочетанной патологией БА/ХОБЛ или ХОБЛ/БА она была представлена большим

разнообразием. Помимо *Staphylococcus* spp. и *Streptococcus* spp. в мокроте больных были обнаружены *Klebsiella* spp., в том числе *K.pneumoniae* (26,6% и 13% соответственно.) и *E.coli* (6,6% и 17,4% соответственно). В то же время, в мокроте больных, страдающих только БА или только ХОБЛ, последние микроорганизмы отсутствовали. Обращает на себя внимание обнаружение в образцах индуцированной мокроты пациентов с сочетанной патологией грамположительных палочек и палочковидных бактерий (*Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp. и *T. paurometabola*) и отдельных видов грибов (*Aspergillus* spp.), относящихся к случайной микробиоте. В то же время, другие представители случайной микробиоты (*Paeruginosa*, *H.influenzae*, *V.ceracia*, *S.marcescens*) были обнаружены в единичных случаях как у больных БА или ХОБЛ, так и у пациентов с сочетанной патологией БА/ХОБЛ или ХОБЛ/БА. Частота высеваемости *S.albicans* не различалась между группами с различной легочной патологией и варьировала между 33% и 50% случаев.

У части пациентов с сочетанной патологией заболевание протекало с осложнениями в виде дыхательной недостаточности, эмфиземы легких и диффузного пневмосклероза, сопровождающимися нарушением легочной вентиляции и газообмена. Это не могло не сказаться на способности микроорганизмов выживать в условиях кислородной недостаточности.

Было установлено, что частота высеваемости основных видов бактерий изменяется в зависимости от наличия структурных изменений в легких. Так, у больных ХОБЛ и ХОБЛ/БА наблюдаются одинаковые тенденции — преобладание α -гемолитических стрептококков и *N.subflava* на фоне сниженной частоты высеваемости β -гемолитических стрептококков и *Enterococcus* spp. У пациентов с БА/ХОБЛ также наблюдается увеличение частоты высеваемости *N.subflava* и снижение *Enterococcus* spp. на фоне постоянства α - и β -гемолитических стрептококков.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное нами бактериологическое исследование образцов индуцированной мокроты выявило различный спектр бактериальных видов в зависимости от легочной патологии больных. Так, у больных БА/ХОБЛ или ХОБЛ/БА обнаружен более разнообразный видовой состав *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus* spp. в сравнении с пациентами, страдающими только БА или ХОБЛ. Также в мокроте наших пациентов с сочетанной легочной патологией высевались грамотрицательные палочки *K.pneumoniae*, *E.coli*, *S.marcescens*, *Paeruginosa*, *H.influenzae*, *V.ceracia* и грамположительные палочки и палочковидные бактерии *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp. и *T.paurometabola*.

По данным литературы у 50—60% больных легочными заболеваниями наиболее часто выявляются бактериальные патогены *H.influenzae*, *S.pneumoniae*, *Klebsiella* spp. и *Pseudomonas* spp. в процессе обострения [6 — 11]. Так, у больных с обострением ХОБЛ и острой дыхательной недостаточностью в посевах экспекторированной мокроты были обнаружены *Pseudomonas* spp. (в 29% случаев), *Haemophilus* spp. (в 20% случаев) и *S.pneumoniae* (в 14% случаев). При этом на долю энтеробактерий и *Pseudomonas* spp. приходилось 64% всех микроорганизмов, выделенных у обследованных больных [12]. Следует отметить, что наши пациенты находились в стадии ремиссии и этим можно объяснить то небольшое число пациентов, в образцах мокроты которых высевались грамотрицательные и грамположительные палочки. В условиях ремиссии легочной патологии микроорганизмы, взаимодействующие с иммунной системой человека, находятся в состоянии гомеостатического равновесия. При нарушении этого равновесия происходит трансформации бактериальной колонизации в инфекционный процесс, способный вызвать обострение хронической патологии легких.

Обращает на себя внимание также изменение микробного состава (преобладание *Streptococcus* spp., *N.subflava* и снижение *Enterococcus* spp.) в образцах индуцированной мокроты обследованных нами пациентов с ХОБЛ и ХОБЛ/БА, осложненных дыхательной недостаточностью, эмфиземой легких и/или диффузным пневмосклерозом. В условиях постоянного хронического воспаления, отека слизистой бронхов, спазма гладкой мускулатуры происходят необратимые изменения, приводящие к

развитию перибронхиального фиброза и эмфиземы легких. Нарушается газообмен, эпителиальная ткань замещается соединительной, и это ведет к изменению состава микробиоты респираторного тракта. В работе Engel M. et al. было показано, что с возникновением структурных изменений легких у пациентов с ХОБЛ изменяется и состав микробиоты, в частности, начинают превалировать *Streptococcus*, которые, скорее всего, ответственны за периодические обострения, и *Prevotella*, анаэробы, высеваемые обычно при пневмонии [9].

Следует отметить, что в большинстве проведенных исследований роль бактериальных патогенов у больных ХОБЛ изучали при помощи микробиологического анализа экспекторированной мокроты, между тем серьезным недостатком данного метода является проблема контаминации бронхиального секрета микрофлорой верхних дыхательных путей. Более надежным методом оценки спектра патогенов инфекций нижних дыхательных путей является техника защищенной щеточной биопсии (браш-биопсия), исключающий контаминацию материала микроорганизмами верхних дыхательных путей. Данные о бактериальных возбудителях обострения ХОБЛ, полученные в исследованиях, проведенных с использованием техники ЗЩБ, подтверждают значение микроорганизмов *H.influenzae*, *S.pneumoniae*, *Klebsiella* spp. и *Pseudomonas* spp. в генезе обострения легочных заболеваний [1,6,10,11,14].

В респираторном тракте здорового человека условия внутренней среды, как правило, неблагоприятны для роста бактерий, что приводит к относительно небольшому размножению их и соответственно микробному разнообразию [7,8,16]. Однако хроническое воспаление меняет местные условия роста в легких, создавая разрешительные ниши для избирательного размножения бактерий. Давно признанный феномен бактериальной колонизации дыхательных путей на поздних стадиях хронической патологии отражает композиционный состав тех видов бактерий, которые хорошо адаптированы к конкретным условиям среды. Таким образом, видовое разнообразие респираторного микробиома является не только фактором риска прогрессирующего течения легочных заболеваний, но и свидетельствует о тех изменениях в структуре ткани легкого, которые происходят в процессе хронического воспаления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеев С.Н., Шанина А.Г., Чучалин А.Г. Бактериальная инфекция у больных ХОБЛ. *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2005, 7(3): 245-254.
2. Adami A., Bracken S. Breathing better through bugs: Asthma and the Microbiome. *Yale J. Biol. Med.* 2016, 89(3): 309-324.
3. Bassis C.M., Erb-Downward J.R., Dickson R.P. et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio.* 2015, 6: e00037. doi: 10.1128/mBio.00037-15.
4. Beck J.M., Young V.B., Huffnagle G.B. The microbiome of the lung. *Transl. Res.* 2012, 160(4): 258-266. doi: 10.1016/j.trsl.2012.02.005.
5. Charlson E.S., Bittinger K., Haas A.R. et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011, 184(8): 957-63. doi: 10.1164/rccm.201104-0655OC.
6. Cui L., Morris A., Huang L. et al. The microbiome and the lung. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2014, 11 Suppl. 4: S227-32. doi: 10.1513/AnnalsATS.201402-052PL.
7. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Huffnagle G.B. Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis. *Lancet Respir. Med.* 2014, 2: 238-246. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70028-1. pmid:24621685.
8. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Freeman C.M. et al. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2015, 12(6):821-30. doi: 10.1513/AnnalsATS.201501-029OC.
9. Engel M., Endesfelder D., Schlöter-Hai B. et al. Influence of lung CT changes in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) on the human lung microbiome. *PLoS One.* 2017, 12(7): e0180859. doi: 10.1371/journal.pone.0180859.
10. Huang Y.J., Nariya S., Harris J.M. et al. The airway microbiome in patients with severe asthma: associations with disease features and severity. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2015, 136(4):874-84. doi: 10.1016/j.jaci.2015.05.044.

11. Huang Y.J., Sethi S., Murphy T. et al. Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52(8):2813-2823.
12. Man W.H., de Steenhuijsen Pijters W.A., Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017, 15: 259-270. doi: 10.1038/nrmicro.2017.14.
13. Morris A., Beck J.M., Schloss P.D. et al. Lung HIV microbiome project. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013, 187(10): 1067-75. doi: 10.1164/rccm.201210-1913OC.
14. Pragman A.A., Lyu T., Baller J.A. et al. The lung tissue microbiota of mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Microbiome.* 2018, 6(1): 7. doi: 10.1186/s40168-017-0381-4.
15. Sokolowska M., Frei R., Lunjani N. et al. Microbiome and asthma. *Asthma Res. Pract.* 2018, 4: 1. doi: 10.1186/s40733-017-0037-y.
16. Venkataraman A., Bassis C.M., Beck J.M. et al. Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *MBio.* 2015, 6(1). pii: e02284-14. doi: 10.1128/mBio.02284-14.

Поступила 30.03.18

Контактная информация: Мазурина Светлана Александровна, к.б.н., 105064, Москва, М. Казенный пер., 5А, р.т. (495) 917-20-26

© О.Г.МАЛЫГИНА, Т.А.БАЖУКОВА, 2018

О.Г.Малыгина, Т.А.Бажукова

СТАНОВЛЕНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С ОЧЕНЬ НИЗКОЙ И ЭКСТРЕМАЛЬНО НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА НА ПЕРВОМ ГОДУ ЖИЗНИ

Северный государственный медицинский университет, Архангельск

Цель. Оценка качественного и количественного состава культивируемых микроорганизмов толстой кишки у недоношенных детей весом при рождении 1500 г и менее на протяжении первого года жизни. *Материалы и методы.* Проведено бактериологическое исследование фекалий у 58 недоношенных детей с массой тела 1500 г и менее, находившиеся под наблюдением в течение года. *Результаты.* В неонатальном периоде отмечается выраженный дефицит микробиоценоза толстой кишки у недоношенных детей. К 2-месячному возрасту происходит медленное формирование микрофлоры кишечника, преимущественно за счет бифидобактерий. К году жизни сформированной микробиоты толстой кишки у недоношенных детей не наблюдается, в первую очередь, за счет дефицита лактобацилл и позднего формирования типичных эшерихий. *Заключение.* У недоношенных детей с очень низкой массой тела и экстремально низкой массой тела при рождении процесс становления микробиоценоза толстой кишки замедлен. Этому способствует длительная госпитализация в стационаре, реанимационном отделении, отсутствие естественного вскармливания и антибактериальная терапия.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 60—66

Ключевые слова: микробиота, толстая кишка, недоношенный ребенок

O.G.Malygina, T.A.Bazhukova

LARGE BOWEL MICROBIOCENTOSIS IN IMMATURE INFANTS WITH VERY LOW AND EXTREMELY LOW BODY WEIGHT IN THE FIRST YEAR OF LIFE

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia

Aim. To assess qualitative and quantitative composition of culture large bowel bugs in immature infants with birth weight 1500 g and less during the first year of life. *Materials and methods.*

Fecal matter culturing has been done in 58 immature infants with body weight 1500 g and less, who were under supervision during the year. *Results.* A significant deficit of large bowel microbiocentosis in immature infants has been registered in the neonatal period. Up to 2 months of life a slow formation of bowel's microflora is observed mainly due to bifidus bacteria. Up to 1 year of life a formed colonic microbiota in immature infants was not observed firstly due to lactobacilli deficit and late formation of typical *Escherichia*. *Conclusion.* The process of large bowel microbiocentosis in immature infants with very low and extremely low birth weight is slowed down due to extended admission in the intensive care unit, absence of breast feeding and antybiotherapy.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 60—66

Key words: colonic microbiota, large bowel, immature infant

ВВЕДЕНИЕ

Микробиом кишечника человека является наиболее обширным микробным сообществом. Формирование микрофлоры кишечного тракта человека — многоэтапный процесс, на который оказывают влияние множество факторов [9]. К основным факторам, негативно влияющим на микрофлору новорожденного ребенка, относят: оперативное родоразрешение, позднее прикладывание к груди, искусственное вскармливание, антибактериальную терапию, продолжительность пребывания детей в отделении реанимации, а у недоношенных детей еще гестационный возраст и вес при рождении [4, 6, 8, 10]. Микробиота кишечника влияет на метаболические и иммунологические процессы человека, поэтому при изменении видового разнообразия микроорганизмов происходит развитие патологических процессов в различных органах и системах [1, 2]. С изменением микрофлоры кишечника связано развитие многих заболеваний: желудочно-кишечных, иммунных, аллергических и др. У здоровых доношенных детей процесс формирования микрофлоры толстой кишки наиболее физиологичный процесс, в отличие от недоношенных детей, особенно с очень низкой массой тела (ОНМТ) и экстремально низкой массой тела (ЭНМТ). В связи с этим, целью исследования является оценка качественного и количественного состава культивируемых микроорганизмов толстой кишки у недоношенных детей весом при рождении 1500 г и менее на протяжении первого года жизни.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 58 недоношенных детей с массой тела при рождении 1500 г и менее, находившихся под наблюдением в течение года. Бактериологическое исследование кала проводилось при поступлении детей в отделение патологии новорожденных и недоношенных детей Архангельской детской клинической больницы им. П.Г. Выжлецова (средний возраст детей составил 15 дней). Далее исследование кала осуществлялось при выписке из стационара (средний возраст детей 56 дней), в 6 и 12 месяцев. Средний гестационный возраст детей был 30 недель, средняя масса тела при рождении 1248 г. Лечение в отделении реанимации новорожденных (ОРН) получили 33 ребенка (57%). К выписке из стационара на грудном вскармливании находились 26 младенцев (45%), на искусственном вскармливании 32 ребенка (55%). Все дети получили антибактериальную терапию.

Проводили количественный и качественный учет состава микробной флоры фекалий. Количественный учет проводили путем мерного посева из исходного материала и/или из стандартных разведений на поверхность плотных питательных сред в количестве 0,03 мл и на жидкие питательные среды в объеме 1,0 мл разведения. Для оценки качественного состава микрофлоры толстой кишки фекалии засеивали на дифференциально-диагностические среды: 5% кровяной агар, среду Эндо (ГНЦ ПМБ, Оболенск), маннит-солевой агар (Conda «Pronadisa», Испания), Сабуро декстрозный агар (Conda «Pronadisa», Испания), Шадлера агар (Conda «Pronadisa», Испания), MRS агар (Conda «Pronadisa», Испания), железосодержащий сульфитный агар («HiMedia», Индия), агар с фенилаланином (Conda «Pronadisa», Испания), би-

фидум-среду и энтерококкагар (ГНЦ ПМБ, Оболенск). Все посеы культивировали при температуре 37°C в течении 24–48 часов. Идентификацию микроорганизмов проводили по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы SPSS (м.18.0). Критический уровень значимости $p < 0,05$. Для построения факторных моделей взаимодействия микроорганизмов применяли метод факторного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При бактериологическом исследовании микробиоты толстой кишки у недоношенных детей с ОНМТ и ЭНМТ на момент поступления в отделение выявлен выраженный дефицит облигатной микрофлоры. Типичные *Escherichia coli* выявляли в 5,2% случаев в очень низком количестве 1,60 lg КОЕ/г; у 8,6% обследованных детей регистрировали лактобациллы (7,12 lg КОЕ/г); бифидобактерии определяли у 48,3% в численности 3,0 lg КОЕ/г. Следует отметить, что лактобациллы отсутствовали у детей с ЭНМТ.

В кишечном микробиоценозе преобладали факультативно-анаэробные микроорганизмы: энтерококки встречались у 55,2% детей в большом количестве (9,1 lg КОЕ/г). Видовой состав представлен: *Enterococcus faecium* (43,1%) и *E.faecalis* (13,8%). Вторыми по частоте выявления были представители рода *Staphylococcus* (48,3%), выделение которых отмечено в значительном количестве (6,82 lg КОЕ/г). Идентифицировано три вида: *S.epidermidis* (37,9%), *S.haemolyticus* (12,1%), *S.hominis* (1,7%). В 36,2% случаев высевали грибы рода *Candida* в численности 5,60 lg КОЕ/г, которые были представлены *C.tropicalis* (22,4%), *C.albicans* (10,3%) и *C.krusei* (5,2%).

Представители семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующие грамотрицательные (НГОБ) бактерии выявляли у 19,0% и 20,7% детей соответственно в численности, превышающей возрастную норму (5,7 и 7,4 lg КОЕ/г соответственно). Грамотрицательные энтеробактерии (ГОЭБ) представлены шестью родами (*Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Hafnia*). Среди ГОЭБ наиболее часто выделяли *K.pneumoniae* (у 5,2%), с одинаковой частотой (3,4%) регистрировали *E.aerogenes* и *S.koseri*. Среди НГОБ чаще кишечник колонизировала *Pseudomonas aeruginosa* (12,1%) в значительной численности (7,5 lg КОЕ/г).

Выделение анаэробных представителей в раннем неонатальном периоде было на низком уровне, представлено только бактероидами (3,4%; 4,5 lg КОЕ/г).

Следовательно, микробиота толстой кишки у недоношенных детей с ОНМТ и ЭНМТ характеризуется резким дефицитом облигатных представителей (лактобациллы и функционально значимые *E.coli*).

За период госпитализации в стационаре отмечено постепенное формирование облигатного пула толстой кишки у недоношенных детей, но сформированной микророзкологии данного биотопа не было. Типичные *E.coli* выявляли к выписке из стационара у 60,3 % детей ($p < 0,001$) в количестве, соответствующем возрастной норме (8,1 lg КОЕ/г; $p < 0,001$); бифидобактерии статистически значимо регистрировали у 98,3% детей ($p < 0,001$) в количестве 9,0 lg КОЕ/г ($p < 0,001$). Интенсивность заселения лактобациллами оставалась низкой (29,3%; $p = 0,012$) с увеличением численности данных представителей (6,99 lg КОЕ/г). Практически в 2 раза (94,8%) отмечен рост энтерококков ($p < 0,001$) с одновременным увеличением среднего количества (10,8 lg КОЕ/г), при этом видовой пейзаж оставался без изменений. Обратная ситуация отмечена в отношении коагулазоотрицательных стафилококков (КОС), произошло статистически значимое снижение данных представителей до 18,9% ($p = 0,002$) за счет *S.haemolyticus* и *S.hominis*. С другой стороны, отмечено обсеменение толстой кишки *S.aureus* у 6,9 % детей в численности 4,38 lg КОЕ/г. Наблюдалось снижение выделения грибов рода *Candida* в 7 раз до 5,2% ($p < 0,001$) с уменьшением их численности (4,82 lg КОЕ/г) и сужением видового пейзажа до одного вида (*C.tropicalis*).

Частота выявления анаэробных представителей бактериоидов значительно возросла до 34,5% ($p < 0,001$) с одновременным увеличением численности данных микроорганизмов (5,7 lg КОЕ/г). Отмечено появление кластридий у 24,1% детей (4,0 lg КОЕ/г).

Следует отметить, что интенсивность обсеменения толстой кишки недоношенных детей ГОЭБ на момент выписки из стационара была достоверно выше (69,0%; $p < 0,001$) по сравнению с поступлением в отделение с одновременным расширением видового спектра до 10 представителей. Анализ микробного пейзажа данных представителей показал, что у недоношенных детей микробиоценоз толстой кишки представлен консорциумом из микроорганизмов, состоящим из двух видов. Наиболее значимый рост отмечен в отношении представителей рода *Klebsiella* spp. и *Serratia* spp. Среди указанных представителей увеличивалась контаминация за счет *K.pneumoniae* ($p = 0,007$) и *S.odorifera* ($p = 0,002$). У 22,4% детей появились лактозонегативные и у 3,4% гемолитические штаммы эшерихий в среднем количестве (8,22 lg КОЕ/г и 7,6 lg КОЕ/г соответственно). На фоне проводимого лечения частота НГОБ статистически значимо снизилась до 3,4 % ($p = 0,006$) при сохранении численности данных представителей на высоком уровне (7,71 lg КОЕ/г).

Таким образом, можно отметить, что к 1,5–2-месячному возрасту микробиота толстой кишки не сформирована, поэтому нами было проведено дальнейшее наблюдение за данной группой детей.

В возрасте 6 месяцев со 100% частотой определялись бифидобактерии и энтерококки в количестве, соответствующем возрастной норме (11,0 lg КОЕ/г; $p < 0,001$ и 8,4 lg КОЕ/г; $p < 0,001$ соответственно). С одинаковой частотой регистрировали *E.faecalis* и *E.faecium*. Вместе с тем, произошло увеличение типичных кишечных палочек до 93,1% случаев ($p = 0,012$) в количестве 8,8 lg КОЕ/г, а лактобацилл до 74,1% ($p < 0,001$) в численности 6,0 lg КОЕ/г ($p = 0,028$). Обнаружение лактозонегативных штаммов *E.coli* осталось на прежнем уровне (25,9%) при значительном увеличении в 4 раза гемолизинпродуцирующих штаммов эшерихий (13,8%) в сравнении с показателями на момент выписки из стационара. Частота выявления других энтеробактерий осталась без изменений (63,8%). Анализ видового спектра показал сужение разнообразия микроорганизмов до 7 представителей. Наиболее часто (в 34,4% случаев) выявляли клебсиеллы (*K.pneumoniae* — 24,1%, *K.oxytoca* — 10,3%) со средней микробной обсемененностью 7,5 lg КОЕ/г. У 10,3% детей были обнаружены представители рода *Citrobacter* — *C.freundii* (6,9%; 3,8 lg КОЕ/г) и *C.koseri* (3,4%; 3,0 lg КОЕ/г). Значительно снизился процент выделения представителей рода *Serratia* (3,4%), при увеличении *Proteus vulgaris* (13,8%) и отсутствии регистрации представителей рода *Enterobacter*. Частота встречаемости КОС продолжала снижаться до 10,3% и была представлена монокультурой (*S.epidermidis*). Кроме того, происходило увеличение контаминации толстой кишки *S.aureus* (10,3%; 3,6 lg КОЕ/г). Дрожжеподобные грибы рода *Candida* были также обнаружены у 10,3% детей (4,4 lg КОЕ/г). Видовой пейзаж представлен тремя штаммами: *S.albicans* (3,4%; 5,1 lg КОЕ/г), *S.tropicalis* (3,4%; 3,1 lg КОЕ/г), *S.kefyr* (3,4%; 4,4 lg КОЕ/г). К 6-месячному возрасту происходила полная элиминация НГОБ из толстой кишки.

Увеличивался анаэробный пул кишечной микробиоты. Бактероиды выделяли у 60,3% детей в количестве 7,0 lg КОЕ/г; клостридии у 13,8% детей в численности 3,0 lg КОЕ/г.

Следовательно, к возрасту 6 месяцев происходит дальнейшее формирование микробиоты толстой кишки, однако у 25,9% детей сохраняется дефицит лактобацилл, 39,7% бактериоидов.

К 1 году жизни формируется в 100% нормальный пул *E.coli* (8,3 lg КОЕ/г), однако при этом продолжали значительно нарастать гемолизипродуцирующие штаммы кишечных палочек (29,3%). Представители семейства *Enterobacteriaceae* оставались без изменений (67,2%), но происходила постоянная сукцессия видового разнообразия. Схожая картина отмечена и в отношении КОС. Частота выявления осталась на прежнем уровне (13,8%) при изменении видового спектра — появлении *S.saprophyticus*. Продолжалось дальнейшее увеличение анаэробных микроорганизмов, бактериоиды регистрировали у 82,7% ($p = 0,039$) детей в среднем количестве 7,0 lg КОЕ/г ($p = 0,003$); клостридии — у 17,2% (4,0 lg КОЕ/г). Также отмечен рост частоты встречаемости грибов рода *Candida* (25,9%) со снижением их численности до 3,0 lg КОЕ/г и с преобладанием *S.albicans* (3,2 lg КОЕ/г).

Таким образом, к первому году жизни полной сформированной микробиоты толстой кишки у данной группы детей не наблюдалось.

В результате исследования микрофлоры толстой кишки у недоношенных детей с ОНМТ и ЭНМТ выявлены качественные и количественные изменения как облигатной, так и условно патогенной микрофлоры, поэтому мы попытались определить основные факторы, влияющие на микробиологическое формирование «главного» биотопа организма человека.

Нами проведен факторный анализ формирования микробиоты толстой кишки от длительности сохранения изменений микрофлоры после госпитализации детей в ОРН и вида вскармливания.

Проведенный факторный анализ микрофлоры толстой кишки показал, что после ОРН первый фактор представлен ГОЭБ (0,8) и бифидобактериями (0,7), в сравнении с детьми без лечения в ОРН, у данной группы детей уровень ГОЭБ был отрицательный (-0,9) при формировании грамположительной кокковой флоры: энтерококки (0,7) и КОС (0,6). Во второй фактор (после ОРН) вошли также представители госпитальной флоры — НГОБ (0,8) при снижении заселения КОС (-0,8). У детей без госпитализации в ОРН второй фактор представлен анаэробными представителями — бактероидами (0,8) и дрожжеподобными грибами рода *Candida* (0,8). Следует заметить, что после ОРН бактероиды и грибы рода *Candida* смещаются в четвертый фактор, при этом бактероиды имеют отрицательное значение (-0,6). Третий фактор продемонстрировал формирование лактобацилл независимо от реанимационных мероприятий, однако уровень данного представителя выше у детей без лечения в ОРН (0,9).

Таким образом, госпитализация в ОРН способствует контаминации толстой кишки госпитальными представителями (ГОЭБ и НГОБ), при этом медленнее заселяются КОС и энтерококки и, как следствие, происходит замедленное формирование облигатно-анаэробного пула.

В силу физиологических особенностей, незрелости недоношенным детям с массой тела менее 1500 г при рождении требуется длительный этап выхаживания в условиях стационара, в связи с этим, нами проведен анализ микрофлоры кишечника у данной группы детей от длительности госпитализации. При госпитализации детей до 30 дней в первом факторе были представители облигатного звена — бактероиды (0,5) и лактобациллы (0,5), на фоне этого с меньшей частотой происходит обсеменение толстой кишки *S.aureus* (-0,7) и клостридиями (-0,6). Второй фактор показывает антагонистические отношения между бифидобактериями (0,6) и ГОЭБ (-0,7) при заселении гемолизин-продуцирующих штаммов эшерихий (0,6) и энтерококков (0,5). В четвертый фактор вошли КОС (0,6) при отрицательных значениях лактозонегативных *E.coli* (-0,6).

При госпитализации детей в отделении патологии новорожденных и недоношенных детей от 31-40 дней первый фактор отражает контаминацию кишечника ГОЭБ (0,7). Вторым фактором демонстрирует, что заселение облигатными микроорганизмами бифидобактериями (0,7) и лактобациллами (0,7) приводит к снижению выделения НГОБ (-0,5). В составе третьего фактора были представители облигатного анаэробного звена — бактероиды (0,8) и типичные *E.coli* (0,7), которые обеспечивают снижение контаминация *S.aureus* (-0,6). В четвертый фактор вошли грамположительные кокки, обладающие антагонистической способностью энтерококков (0,6) и КОС (-0,8). Заселение энтерококками снижает численность КОС, и наоборот.

С увеличением длительности госпитализации детей от 41 до 50 дней продолжается контаминация толстой кишки лактозонегативными *E.coli* (0,8) и появляются лактобациллы (0,8), на фоне этого сдерживается формирование пула анаэробной флоры — бактероидов (-0,7) и снижается контаминация ГОЭБ (-0,7). Вторую группу факторов представляли бифидобактерии (0,7), которые обладали антагонистической активностью в отношении дрожжеподобных грибов *Candida* (-0,8) и КОС (-0,8). Третий микроэкологический фактор показывает заселение толстой кишки типичными *E.coli* (0,7), клостридиями (0,6) и снижение уровня НГОБ (-0,6). Наличие обратных связей свидетельствует о положительном влиянии типичных эшерихий на элиминацию НГОБ. Четвертый фактор определяет постепенное заселение толстой кишки энтерококками (0,8).

На фоне длительной госпитализации (более 51 дня) первый фактор свидетельствует о заселении биотопа толстой кишки условно патогенными и патогенными представителями: *S.aureus* (0,9), дрожжеподобные грибы *Candida* (0,8) и лактозонегативные эшерихии (0,7) на фоне продолжающегося заселения бактероидами (0,9). Второй фактор соответствует продолжающейся контаминации кишечника ГОЭБ (0,7) и ростом КОС (0,9) и клостридий (0,9). И только в третьем и четвертом факторах у данных детей сосредоточены облигатные представители: бифидобактерии (0,9) и энтерококки (0,8) — третий фактор, лактобациллы (0,9) и типичные *E.coli* (0,6) — четвертый фактор.

Таким образом, продолжительный процесс выхаживания детей в условиях стационара значительно изменяет характер микробиоты толстой кишки с более поздним заселением облигатными представителями.

В проведенных ранее исследованиях показано, что характер вскармливания влияет на микрофлору толстой кишки [3, 7]. Факторный анализ продемонстрировал, что на грудном вскармливании на первый план (первый фактор) выступают облигатные представители: бифидобактерии (0,7) и лактобациллы (0,6), при этом замедляется рост дрожжеподобных грибов *Candida* (-0,7), что является благоприятным моментом в формировании микробиоты толстой кишки. На искусственном вскармливании в первый фактор вошли эшерихии как типичные (0,8), так и лактозонегативные (0,7). Второй фактор не выявил значимых различий взаимосвязи микрофлоры от вскармливания. Третий и четвертый фактор продемонстрировали, что на искусственном вскармливании происходит более позднее формирование лактобацилл (0,8; третий фактор) при контаминации данного биотопа ГОЭБ (0,7; четвертый фактор). Обратная ситуация получена на естественном вскармливании — ГОЭБ (-0,9).

Таким образом, естественное вскармливание способствует более физиологичному формированию микрофлоры толстой кишки.

Следовательно, на процесс становления микробиоты толстой кишки недоношенных детей с ОНМТ и ЭНМТ влияет одновременно множество факторов, основными являются: госпитализация в ОРН, длительность выхаживания в условиях стационара, характер вскармливания и антибактериальная терапия, что приводит к неадекватной колонизации кишечника [5].

Нами проанализировано дальнейшее становление микрофлоры кишечника в возрасте 6 и 12 месяцев от характера вскармливания.

На грудном вскармливании сохранялась схожая структура первого фактора, что и при выписке детей из стационара, доминировали бифидобактерии (0,9) и лактобациллы (0,6) при отрицательном значении типичных *E.coli* (-0,9). Сохранившаяся тенденция указывает на значимость грудного молока в формировании микрофлоры.

На искусственном кормлении в возрасте 6 месяцев первый фактор представлен лактозонегативными эшерихиями (0,9) при отрицательном значении ГОЭБ (-0,8). *E.coli* с измененными свойствами доминируют в первом факторе с момента выписки из стационара до 6-месячного возраста. К году происходит обратное изменение взаимосвязей между лактозонегативными *E.coli* (-0,7) и ГОЭБ (0,5). В структуре второго фактора в 6 и 12 месяцев имеется схожая картина во взаимосвязи типичных эшерихий и бифидофлоры, на фоне этого в 6 месяцев имеются отрицательные значения дрожжеподобных грибов *Candida* (-0,5), а в 12 месяцев — клостридий (-0,6). Третий фактор в 6 месяцев представлен теми же микроорганизмами, что и при выписке из стационара (лактобациллы, 0,8 и *S.aureus*, 0,6). В возрасте 12 месяцев утрачивается данная связь, на смену лактобациллам приходят энтерококки. К четвертому фактору в возрасте 6 месяцев относились облигатные анаэробы: бактероиды (0,8) и клостридии (0,7). К году в структуре четвертого фактора остаются лактобациллы (0,8).

Следовательно, на искусственном вскармливании происходит постоянная сукцессия микроорганизмов с преобладанием ГОЭБ и эшерихий с измененными свойствами.

Полученные результаты позволили сделать следующее заключение, что у недоношенных детей с ОНМТ и ЭНМТ при рождении процесс становления микробиоценоза толстой кишки замедлен, что отражается, в первую очередь, на сохраняющемся дефиците лактофлоры, позднем формировании типичных эшерихий. Длительная

госпитализация в стационаре, реанимационном отделении, отсутствие естественного вскармливания и антибактериальная терапия способствуют контаминации толстой кишки ГОЭБ, которые сохраняются длительное время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляева И.А., Бомбардинова Е.П., Турти Т.В., Митиш М.Д., Потехина Т.В. Кишечная микробиота у недоношенных детей — современное состояние проблемы (обзор литературы). Педиатрическая фармакология. 2015, 12 (3): 296-303.
2. Кафарская Л.И., Ефимов Б.А., Постникова Е.А., Донских Е.Е. Особенности становления микрофлоры у детей раннего возраста. Детские инфекции. 2006, 1: 6-11.
3. Лифшиц К., Захарова И.Н., Дмитриева Ю.А. Влияние кишечного микробиома в норме и патологии. Медицинский совет. 2017, 1: 155-159.
4. Макарова С.Г., Намазова-Баранова Л.С. Кишечная микробиота и использование пробиотиков в практике педиатра. Что нового? Педиатрическая фармакология. 2015, 12 (1): 38-45.
5. Малыгина О.Г., Бажукова Т.А. Влияние антибиотиков на формирование микроэкологии у недоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела при рождении. Журн. микробиол. 2014, 1: 61-65.
6. Набока Ю.Л., Рымашевский А.Н., Свирава Э.Г., Брагина Л.Е. Формирование микрофлоры пищеварительного тракта новорожденных в динамике. Журн. микробиол. 2012, 3: 65-70.
7. Пахомовская Н.Л., Потапов А.С., Вольнец Г.В. Дисбактериоз кишечника. Медицинский совет. 2015, 6: 38-42.
8. Печуров Д.В., Турти Т.В., Беляева И.А., Тяжева А.А. Микробиота кишечника у детей: от профилактики нарушений становления к предупреждению неинфекционных заболеваний. Педиатрическая фармакология. 2016, 13 (4): 377-383.
9. Чаплин А.В., Ребриков Д.В., Болдырева М.Н. Микробиом человека. Вестник РГМУ. 2017, 2: 5-13.
10. Toscano M., De Grandi R., Grossi E. et al. Role of the human breast milk-associated microbiota on the newborns' immune system: a mini review. Front. Microbiol. 8:2100. DOI: 10.3389/fmicb. 2017.02100.

Поступила 06.03.18

Контактная информация: Малыгина Ольга Геннадьевна,
163000, Архангельск, пр. Троицкий, 51, р.т. (818)28-57-65

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.В.Цветкова^{1,2}, Г.М.Алешина², Л.Е.Леонова¹, О.В.Шамова^{1,2}, Е.В.Романовская¹, В.Н.Кокряков^{1,2}

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА θ -ДЕФЕНСИНОВ ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ГАМАДРИЛА *Papio hamadryas*

¹Санкт-Петербургский государственный университет, ²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

Цель. Изучение функциональных свойств катионных антимикробных пептидов θ -дефенсинов, выделенных из лейкоцитов крови гамадрила *Papio hamadryas*. *Материалы и методы.* θ -Дефенсины гамадрила были выделены из экстрактов лейкоцитарной массы методами ультрафильтрации, препаративного электрофореза и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве тестовых микроорганизмов использовали грамотрицательные бактерии *Escherichia coli*, грамположительные бактерии *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*, грибы *Candida albicans*. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) определяли, тестируя последовательные разведения исследуемых пептидов методом радиальной диффузии в агарозном геле. Микробицидное действие оценивали методом подсчета выживших КОЕ после инкубации с пептидами. Влияние θ -дефенсинов на проницаемость мембран *E.coli* оценивали с помощью хромогенных маркеров о-нирофенил- β -D-галактопиранозида и нитроцефина. *Результаты.* Сравнительный анализ антимикробных свойств θ -дефенсинов гамадрила показал, что

они обнаруживают широкий спектр антимикробного действия, сопоставимый с θ -дефенсином макаки резус RTD-1 и проявляют бактерицидный и фунгицидный эффекты в микромолярных концентрациях. Изучено влияние различных условий среды (низкая и повышенная ионная сила, содержание в среде сыворотки крови) на антимикробную активность θ -дефенсинов. Показано, что θ -дефенсины обладают способностью увеличивать проницаемость наружной мембраны *E.coli*, однако в отличие от α -дефенсинов не оказывают заметного влияния на проницаемость внутренней мембраны. *Заключение.* Выделенные из лейкоцитов крови гамадрила θ -дефенсины являются эффективными антимикробными агентами с широким спектром микробицидного действия. θ -Дефенсины гамадрила в отличие от α -дефенсинов сохраняют антимикробную активность в средах с повышенной ионной силой. θ -Дефенсины увеличивают проницаемость наружной, но не цитоплазматической мембраны *E.coli*, что позволяет предположить механизм антимикробного воздействия этих пептидов, отличный от α -дефенсинов.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 66—73

Ключевые слова: врожденный иммунитет, антимикробные пептиды, θ -дефенсины, гамадрил *Papio hamadryas*

E.V.Tsvetkova^{1,2}, *G.M.Aleshina*², *L.E.Leonova*¹, *O.V.Shamova*^{1,2}, *E.V.Romanovskaya*¹, *V.N.Kokryakov*^{1,2}

FUNCTIONAL EFFECTS OF θ -DEFENSINS FROM BLOOD LEUKOCYTES OF BABOON *PAPIO HAMADRYAS*

¹Saint-Petersburg State University, ²Research Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

Aim. Study the functional properties of cationic antimicrobial peptides θ -defensins isolated from baboon *Papio hamadryas* blood leukocytes. *Materials and methods.* Baboon θ -defensins were extracted from leukocyte mass using ultrafiltration, preparative electrophoresis and reverse phase high performance liquid chromatography. The test microorganisms used were Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, Gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, and fungi *Candida albicans*. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by testing serial dilutions of the test peptides by radial diffusion in agarose gel. Microbicidal action was evaluated by counting surviving colony forming units after incubation microorganisms with the peptides. The θ -defensins influence on *E.coli* membrane permeability was assessed using chromogenic markers o-nitrofenil- β -D-galactopyranoside and nitrocefin. *Results.* The analysis of the θ -defensins antimicrobial properties showed that they produce antimicrobial activity against test microorganisms, exhibiting bactericidal and fungicidal effects at micromolar concentrations. We studied the influence of different environmental conditions (low and high ionic strength, blood serum in medium) for antimicrobial activity. It is shown that θ -defensins have the ability to increase the outer membrane of *E.coli* permeability, however, in contrast to α -defensins have no noticeable influence on the inner membrane permeability. *Conclusion.* Baboon θ -defensins isolated from blood leukocytes are effective antimicrobial agents with a broad spectrum of microbicidal action. θ -Defensins baboon unlike α -defensins exhibit antimicrobial activity in environments with high ionic strength. θ -Defensins increase the outer membrane of *E.coli* permeability but not the cytoplasmic membrane, suggesting that the mechanism of antimicrobial effect of these peptides other than α -defensins.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 66—73

Key words: innate immunity, antimicrobial peptides, θ -defensins, baboon *Papio hamadryas*

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря своей генетической и физиологической близости к человеку низшие узконосые обезьяны семейства мартышковых, представителем которых является гамадрил, широко используются в медицинских и биологических экспериментах, в том числе и при изучении различных патологических процессов и заболеваний человека инфекционной природы. Основой изучения инфекционных заболеваний в экспериментах

с использованием обезьян является создание и сравнительное исследование моделей инфекций, многие из которых не воспроизводятся на других лабораторных животных. При этом необходимо учитывать, что защитные факторы низших обезьян и, в частности, факторы врожденного иммунитета, к которым относятся антимикробные белки и пептиды лейкоцитов крови, могут отличаться от таковых человека, поэтому их сравнительное изучение представляет определенный интерес. Антимикробные пептиды (АМП) являются важнейшей составляющей врожденного иммунитета млекопитающих и представлены у них, главным образом, двумя семействами: кателицидинами и дефенсинами. Последние представляют небольшие амфипатические катионные пептиды с тремя внутримолекулярными дисульфидными связями, высоким содержанием аминокислотных остатков аргинина, лизина и аминокислот с гидрофобными боковыми радикалами [6]. Дефенсины приматов подразделяются на три подсемейства: α -дефенсины, выделенные из лейкоцитов и клеток Паннета в тонком кишечнике; β -дефенсины, найденные в эпителиях дыхательного, желудочно-кишечного и мочеполового трактов; и наконец, θ -дефенсины, которые выделены пока только из лейкоцитов низших узконосых обезьян макака резус *Macaca mulatta* [9] и павианов рода *Papio* [3,8]. θ -Дефенсины по своим структурным и функциональным свойствам существенно отличаются от других АМП млекопитающих, представляя единственные известные на настоящий момент макроциклические пептиды у животных. Три θ -дефенсина RTD 1-3 макаки резус проявляли широкий спектр антимикробной и противовирусной активности, в том числе, в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, вирусов простого герпеса и иммунодефицита человека, при этом антибактериальная активность θ -дефенсинов, в отличие от таковой α - и β -дефенсинов, сохраняется при физиологических концентрациях хлорида натрия в среде *in vitro* [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Два θ -дефенсина RTD-1 и RTD-3 (*Papio theta defensin*) гамадрила были выделены из уксуснокислых экстрактов лейкоцитарной массы и очищены до гомогенного состояния методами ультрафильтрации, препаративного электрофореза в полиакриламидном геле и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, как описано в [8]. В качестве контрольных пептидов использовали α -дефенсин человека HNP-1, θ -дефенсин RTD-1 макаки резус и протегрин свиньи PG-1, первые два пептида были выделены нами из лейкоцитов человека и макаки резус, согласно описанным методикам [5]. Протегрин свиньи PG-1 был предоставлен R.I. Lehrer. Концентрации пептидов рассчитывали методом, предложенным Pace C.N. et al. [7]

В качестве тестовых микроорганизмов использовали грамотрицательные бактерии *E.coli*, штамм ML35p; грамположительные бактерии *L.monocytogenes*, штамм EGD и *S.aureus*, штамм MRSA ATCC 33591; грибы *Candida albicans*, штамм 820. Для определения антимикробной активности индивидуальных фракций использовали метод радиальной диффузии пептидов в агарозном геле, содержащем тестируемые микроорганизмы [5]. Микроорганизмы предварительно культивировали в течение 16 ч в среде, представляющей 3% раствор триптического гидролизата сои (для бактерий) (Sigma, США) и среды Сабуро (для *C. albicans*) (Sigma, США) при 37°C. Аликвоты культур переносили затем отдельно в свежеприготовленные среды и инкубировали при 37°C на водяной бане с шейкером в течение 2,5 ч для получения микроорганизмов, находящихся в середине логарифмической фазы роста. Количество клеток каждого из микроорганизмов оценивали, измеряя оптическую плотность суспензий на спектрофотометре при длине волны 620 нм. Считали, что оптическая плотность 1,0 соответствует концентрации $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мл для бактерий и $2,86 \times 10^7$ КОЕ/мл для *C. albicans*. Аликвоты суспензий, содержащие 4×10^6 клеток микроорганизмов, перемешивали с 10 мл стерильной 1% агарозы в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 при температуре 42°C. Полученную смесь выливали в стерильные чашки Петри и оставляли при комнатной температуре до застывания. В лунки, сделанные аппликатором (диаметр 3 мм), вносили анализируемые образцы в объеме 5 мкл и инкубировали в воздушном термостате в течение 3 ч при 37°C. Затем чашки заливали 1% агарозой, содержащей 6% ТГС (для бактерий) или 6% среду Сабуро (для *C. albicans*) и

инкубировали в течение 18 часов при 37°C. Диаметр зоны ингибирования роста (зона вокруг лунки, свободная от микроорганизмов) измеряли, принимая за 1 условную единицу антимикробной активности 0,1 мм и вычитая из измеренного значения 30 условных единиц, соответствующих диаметру самой лунки. При изучении влияния на антимикробную активность пептидов повышенной ионной силы среды в агарозный гель добавляли NaCl в конечной концентрации от 0 до 0,2 М. Для изучения влияния на антимикробную активность сывороточных белков в агарозный гель, содержащий микроорганизмы, была добавлена стерильная жидкая сыворотка крови эмбрионов коров (Биолот, Россия) в конечных концентрациях 5, 10 и 15%.

Для определения минимальных ингибирующих рост микроорганизмов концентраций (МИК) антимикробную активность последовательных разведений исследуемых пептидов, начиная с 50 мкМ, анализировали методом радиальной диффузии. МИК определяли путем построения линейных регрессий зависимости антимикробной активности от концентрации пептидов. Точка пересечения графика регрессии с осью абсцисс принималась за МИК.

Микробоцидное действие выделенных пептидов оценивали методом подсчета колоний. Культуры микроорганизмов готовили, как описывалось выше. Аликвоты культур микроорганизмов (5 мкл) с концентрацией 2×10^6 КОЕ/мл помещали в эппендорфы с 5 мкл последовательных разведений пептидов (конечная концентрация от 5 до 0,625 мкМ). Инкубировали при 37°C на шейкере. Через 1 ч инкубационную смесь разводили 0,1 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,4 до 0,5 мл и отбирали аликвоты 50 мкл. При изучении микробоцидного действия пептидов на *E.coli* ML35p в зависимости от времени инкубации концентрация микроорганизмов составляла 2×10^7 КОЕ/мл. Аликвоты культуры *E.coli* ML35p (5 мкл) помещали в эппендорфы с 5 мкл пептидов (конечная концентрация пептидов 2,5 мкМ). Инкубировали при 37°C на шейкере. Через определенные промежутки времени (2, 5, 10, 15, 30 мин) инкубационную смесь разводили в 1000 раз 0,1 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,4, отбирали аликвоты 50 мкл. Отобранные аликвоты переносили на чашки Петри с 1% агарозой, содержащей 3% ТГС (для бактерий) или 3% среду Сабуро (для грибов) и равномерно распределяли по поверхности агарозы стеклянной палочкой. Чашки инкубировали при 37 °C в течение 16–18 ч, после чего визуально производили подсчет колоний. Одна выжившая КОЕ соответствовала 1000 КОЕ в исходной культуре микроорганизмов. При изучении микробоцидного действия пептидов на *E.coli* ML35p в зависимости от времени инкубации одна выжившая КОЕ соответствовала 10000 КОЕ в исходной культуре.

При изучении влияния пептидов на проницаемость внешней и цитоплазматической мембран грамотрицательной бактерии *E.coli* ML35p оценивали увеличение проницаемости мембран бактерии для хромогенных маркеров — о-нитрофенил- β -D-галактопиранозида, субстрата для фермента β -галактозидазы, локализованного в цитоплазме бактерии и нитроцефина, субстрата для фермента β -лактамазы, находящегося в периплазматическом пространстве [4]. При нарушении целостности мембран они становятся проницаемыми для субстратов и продуктов ферментативных реакций. За ходом ферментативных реакций наблюдали спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при длине волны 420 нм для оценки проницаемости наружной мембраны бактерии и при длине волны 486 нм — для цитоплазматической.

Статистическую обработку результатов опытов проводили с использованием традиционных методов вариационной статистики. Представленные данные являются усредненными значениями, полученными в трех независимых экспериментах, каждый эксперимент проводили в трипликате. При обработке данных использовали пакет программ Statistica 6.0. и Sigma Plot 11.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты определения МИК выделенных из лейкоцитов крови гамадрила θ -дефенсинов (PTD-1 и PTD-3), и контрольных пептидов (α -дефенсин человека HNP-1, θ -дефенсин RTD-1 макаки резус и протегрин свиньи PG-1) в среде, не содержащей NaCl, и в присутствии 0,1 М NaCl представлены в табл. Их сравнительный анализ показал, что все пептиды проявляют антимикробную активность против всех четырех

Минимальные ингибирующие концентрации антимикробных пептидов (мкМ), определенные методом радиальной диффузии в среде, не содержащей NaCl и сыворотки крови, в присутствии 0,1 М NaCl и в присутствии сыворотки крови

Микроорганизмы	Среда	Пептиды				
		PTD-1	PTD-3	RTD-1	PG-1	HNP-1
<i>L.monocytogenes</i>	без NaCl и с.к.	1,4±0,3	1,3±0,5	1,2±0,3	1,2±0,2	1,7±0,2
	+ 0,1 М NaCl	1,4±0,5	1,4±0,5	1,3±0,5	1,0±0,3	1,9±0,6
	с с.к. 5%	1,3±0,2	1,5±0,3	1,1±0,2	1,1±0,2	3,4±0,8
	с с.к. 10%	1,5±0,4	1,5±0,5	1,7±0,5	1,2±0,2	7,6±1,8
	с с.к. 15%	3,8±0,8	3,9±0,9	4,3±0,9	1,6±0,9	>25
<i>E.coli</i>	без NaCl и с.к.	1,5±0,3	1,7±0,3	1,8±0,4	1,2±0,2	1,7±0,4
	+ 0,1 М NaCl	2,0±0,3	2,2±0,4	1,9±0,3	1,0±0,3	7,6±1,5
	с с.к. 5%	4,2±1,0	5,1±1,2	3,2±0,5	1,5±0,3	>25
	с с.к. 10%	15,2±3,2	10,5±3,7	12,6±2,4	2,3±0,7	>25
	с с.к. 15%	>25	>25	>25	3,7±1,2	>25
<i>C.albicans</i>	без NaCl и с.к.	1,6±0,4	1,4±0,2	1,7±0,3	1,1±0,2	2,6±0,8
	+ 0,1 М NaCl	6,5±1,5	7,4±2,0	3,9±0,9	1,5±0,3	>25
	с с.к. 5%	>25	>25	>25	не исслед.	>25
	с с.к. 10%	>25	>25	>25	не исслед.	>25
	с с.к. 15%	>25	>25	>25	не исслед.	>25
<i>S.aureus</i>	без NaCl и с.к.	2,5±0,6	1,7±0,3	2,1±0,5	1,2±0,3	4,1±1,2
	+ 0,1 М NaCl	3,6±1,2	4,5±1,0	2,8±0,8	1,1±0,2	>25
	с с.к. 5%	4,3±0,5	5,3±0,7	5,6±0,5	1,5±0,4	7,1±1,5
	с с.к. 10%	6,3±0,6	7,1±0,9	7,6±0,7	1,6±0,4	>25
	с с.к. 15%	7,9±0,9	8,8±1,0	9,8±1,1	2,1±0,6	>25

Примечание. с.к. — сыворотка крови.

тестируемых микроорганизмов в микромолярных концентрациях в среде, не содержащей NaCl, причем наибольшая антимикробная активность, которая сохранялась и при добавлении в среду 0,1 М NaCl, наблюдалась в отношении *L.monocytogenes*. В отношении *S.aureus* и *C.albicans* МИК θ -дефенсинов гамадрила РТD-1 и РТD-3 были сравнимы с МИК θ -дефенсина макаки резус RTD-1 и ниже, чем МИК α -дефенсина человека HNP-1. Добавление в агарозный гель 0,1 М NaCl приводило к сохранению антимикробного действия RTD-1 в отношении *S.aureus*, антимикробное действие РТD-1 и РТD-3 несколько снижалось. Еще более выраженное снижение антимикробной активности РТD-1 и РТD-3 в среде с повышенной ионной силой наблюдалось в отношении *C.albicans*. В то же время, антимикробная активность α -дефенсина человека HNP-1 в отношении этих двух микроорганизмов в данных условиях полностью ингибировалась. В отношении *E.coli* исследуемые и контрольные пептиды продемонстрировали схожую антимикробную активность в среде, не содержащей NaCl. При добавлении в агарозный гель 0,1 М NaCl МИК РТD-1, РТD-3 и RTD-1 практически не изменились, в то время как МИК HNP-1 в этих условиях заметно увеличилась. На антимикробную активность протегрина свиньи PG-1 в отношении всех четырех тестируемых микроорганизмов повышение ионной силы среды влияния не оказывало.

Результаты изучения влияния на антимикробное действие выделенных пептидов компонентов сыворотки крови в конечных концентрациях 5, 10 и 15% представлены в табл. Наибольшее влияние добавление сыворотки крови оказывало на антимикробную активность исследуемых пептидов в отношении грибов *C.albicans*, которая полностью ингибировалась уже при 5% концентрации сыворотки в среде. По сравнению с α -дефенсином человека HNP-1, для которого наблюдалось практически полное ингибирование антимикробной активности в отношении *E.coli* уже при 5% концентрации сыворотки в среде, снижение антимикробной активности θ -дефенсинов в отношении этого микроба становилось заметным при концентрациях свыше 5%. В отношении *S.aureus* добавление сыворотки оказывало заметное ингибирующее действие на антимикробную активность как α -дефенсина HNP-1

человека, так и θ -дефенсинов гамадрила и макаки резус, при этом, также как и в экспериментах с *E.coli*, ингибирующий эффект был более выражен для α -дефенсина. Наименьшее воздействие добавление сыворотки оказывало на антимикробную активность θ -дефенсинов в отношении *L.monocytogenes*, для α -дефенсина HNP-1 человека это воздействие было более выраженным — при 15% концентрации сыворотки крови наблюдалось полное ингибирование антимикробной активности.

Микробоцидное действие θ -дефенсинов гамадрила и контрольных пептидов оценивали методом подсчета выживших КОЕ после инкубации с тестируемыми микроорганизмами. Обнаружено, что все пептиды проявляют бактерицидную и фунгицидную активность в отношении всех 4 тестируемых микроорганизмов в микромолярных концентрациях, при этом по своему воздействию РТD-1 и РТD-3 наиболее схожи с РТD-1. Инкубация микроорганизмов с этими пептидами в концентрациях от 2,5 мкМ приводила к 100% гибели *L.monocytogenes*, *E.coli* и *S.albicans*. 100% гибель *S.aureus* наблюдалась при более высокой концентрации пептидов (5 мкМ), хотя МИК этих пептидов в отношении всех тестируемых микроорганизмов примерно одинаковы.

Повреждающее воздействие РТD-1 на наружную и цитоплазматическую мембраны грамотрицательной бактерии *E.coli* ML35p оценивали с помощью хромогенных маркеров — продуктов ферментативных реакций, как описано в разделе «Материалы и методы». В качестве контрольного пептида использовали протегрин свиньи PG-1, обладающий сильно выраженной мембранолитической активностью. Результаты показали процесс увеличения проницаемости наружной мембраны бактерий для нитроцефина при воздействии исследуемых пептидов. Как оказалось, действие РТD-1 гамадрила, также как и РТD-1 макаки резус, в концентрациях 5 мкМ на наружную мембрану бактерий было гораздо менее выражено, чем у протегрина, хотя они тоже обладали способностью повышать ее проницаемость. Из этого следует, что на проницаемость цитоплазматической мембраны бактерии пептиды действуют по-разному: протегрин в течение первых 10 минут эксперимента вызывал выраженное увеличение её проницаемости, в то время как РТD-1 гамадрила, также как и РТD-1 макаки резус в этот же период времени не оказывали заметного влияния на проницаемость цитоплазматической мембраны. Чтобы определить промежуток времени, когда наступала гибель *E.coli*, изучали зависимость бактерицидного действия РТD-1 гамадрила и РТD-1 макаки резус от времени их инкубации с бактерией. Обнаружено, что эти пептиды в концентрации 2,5 мкМ в первые 15 мин инкубации вызывают уменьшение количества жизнеспособных КОЕ на три порядка, в то же время как заметного увеличения проницаемости цитоплазматической мембраны *E.coli* не наблюдается.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе представлены данные по сравнительному изучению антимикробных свойств пептидов РТD-1 и РТD-3, выделенных нами из лейкоцитов крови гамадрила и отнесенных к классу θ -дефенсинов. Первый представитель θ -дефенсинов РТD-1, который также как и θ -дефенсины гамадрила, содержит 18 аминокислотных остатков, был найден у макаки резус в 1999 году, и большинство знаний о функциональных свойствах этих пептидов получены при его исследовании [9]. Наличие пептидной связи между первым и восемнадцатым аминокислотными остатками обуславливает циклическую структуру θ -дефенсинов (иногда используют термин «макроциклическая», чтобы подчеркнуть отличие от α -дефенсинов, циклическая структура которых обусловлена внутримолекулярными дисульфидными связями). Определенное сходство с РТD-1 в структурной организации молекулы имеет протегрин свиньи PG-1, который также состоит из восемнадцати аминокислотных остатков, но имеет в составе молекулы две дисульфидные связи, поэтому при сравнительном изучении антимикробных свойств пептидов гамадрила РТD-1 и РТD-3 использовали θ -дефенсин РТD-1 макаки резус, протегрин свиньи PG-1 и α -дефенсин человека HNP-1 в качестве контроля. При анализе антимикробных свойств θ -дефенсинов прежде всего обращает на себя внимание сохранение или незначительное снижение их антимикробной активности в условиях повышенной ионной силы среды в отличие от α -дефенсинов, чья активность в этих условиях ингибируется практи-

чески полностью. Это явление, характерное, в той или иной степени, для большинства изученных α -дефенсинов, может объясняться ослаблением сорбции пептидов на мембранах микроорганизмов в условиях повышенной ионной силы среды. Также известно, что ациклическая форма RTD-1 в 3 раза менее активна в отношении *S.aureus* и *E.coli*, чем нативный RTD-1, при этом уменьшение активности связывают, скорее, не с изменением конформации пептида, а с появлением дополнительного отрицательного заряда на С-конце молекулы, что способствует ухудшению сорбции ациклического RTD-1 на поверхности мембран микроорганизмов [1]. Из литературных данных известно, α -дефенсины могут связываться с различными сывороточными белками, что приводит к уменьшению антимикробной активности при добавлении в среду сыворотки крови. Так, добавление сыворотки крови человека в концентрации 1 мг сывороточных белков на мл среды вызывало уменьшение антимикробной активности α -дефенсина человека HNP-1 в отношении *E.coli* в два раза и полностью ингибировало активность в отношении *S.aureus* [13]. В то же время, установлено, что антимикробная активность PG-1 в этих условиях не изменялась или изменялась незначительно. Как показали наши исследования, θ -дефенсины в этих условиях проявляют большее сходство с α -дефенсинами, чем с протегрином. Несмотря на некоторое сходство θ -дефенсинов в характере антимикробного воздействия как с PG-1 (сохранение антибактериальной активности при добавлении в среду NaCl), так и с α -дефенсинами его механизмы у этих пептидов, по-видимому, различаются. На это, в частности, указывают эксперименты по исследованию проницаемости наружной и внутренней (цитоплазматической) мембран *E.coli* ML35p под воздействием изучаемых и контрольных антимикробных пептидов. Ранее нами было показано, что α -дефенсины гамадрила, также как α -дефенсины других животных и протегрин PG-1 в концентрациях 5 мкМ проявляли выраженное действие на наружную и внутреннюю мембраны бактерий уже в первые несколько минут эксперимента [12]. Это позволяет предположить, что основной мишенью для поражающего действия α -дефенсинов и протегрина является именно цитоплазматическая мембрана. В то же время, θ -дефенсин RTD-1 макаки резус и θ -дефенсин PTD-1 гамадрила в концентрациях, вдвое превышающих бактерицидные, не оказывали выраженного действия на проницаемость цитоплазматической мембраны. Изучение взаимодействия RTD-1 и PG-1 с липидными бислоями различного состава методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) показало, что эти пептиды взаимодействуют с ними по-разному. Так, степень разрушения липидного бислоя при взаимодействии с PG-1 зависит от его толщины, тогда как RTD-1 вызывает нарушение ориентации бислоя вне зависимости от длины ацильных цепей составляющих его жирных кислот. PG-1, по-видимому, полностью «прошивает» бислой, тогда как RTD-1, скорее всего, связывается с его поверхностью, вызывая образование так называемых липидных цилиндров [2,15]. Если разрушение мембран при взаимодействии с PG-1 можно объяснить его встраиванием в бислой с последующим образованием пор, то в случае с RTD-1 неясно, как происходит разрушение самой мембраны. Данные ЯМР свидетельствуют лишь о менее выраженном воздействии на мембрану RTD-1 по сравнению с PG-1, что согласуется с нашими данными по проницаемости мембраны *E.coli*. Эти различия большинство авторов связывают с отсутствием амфипатических свойств у молекулы RTD-1, присутствующих большинству АМП. Предполагают, что на начальном этапе происходит взаимодействие положительно заряженных аргининовых остатков RTD-1 с отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов мембран с образованием пептид-липидных кластеров [1]. Это предположение подтверждается экспериментальными данными, подтверждающими существование двух состояний RTD-1 при его связывании с бислоями [14]. В одном, соответствующем начальному электростатическому взаимодействию, RTD-1 ориентирует плоскость своего кольца параллельно бислою. Второе состояние не было полностью определено, но отличалось от первого. Возможно, гидрофобные аминокислотные остатки RTD-1 взаимодействовали с углеводородными цепями жирных кислот в составе фосфолипидов, что могло приводить к последующему разрушению мембраны. Точные механизмы этого взаимодействия пока остаются невыясненными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abuja P.M., Zenz A., Trabi M. et al. The cyclic antimicrobial peptide RTD-1 induces stabilized lipid-peptide domains more efficiently than its open-chain analogue. *FEBS Letters*. 2004, 566: 301-306.
2. Buffy J.J., McCormick M.J., Wi S. et al. Solid-state NMR investigation of selective perturbation of lipid bilayers by cyclic antimicrobial peptide RTD-1. *Biochemistry*. 2004, 43: 9800-9812.
3. Garcia A.E., Цсары G., Tran P.A. et al. Isolation, synthesis, and antimicrobial activities of naturally occurring θ -defensin isoforms from baboon leukocytes. *Infect. Immun*. 2008, 76: 5883-5891.
4. Lehrer R., Barton A., Daher K. et al. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Invest.* 1989, 84: 553-561.
5. Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S.L. et al. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods*. 1991, 137:167-173.
6. Lehrer R.I., Lu W. α -Defensins in human innate immunity. *Immunol. Rev*. 2012, 245: 84-112.
7. Pace C.N., Vajdos F., Fee L. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*. 1995, 4: 2411-2423.
8. Stegemann C., Tsvetkova E.V., Aleshina G.M. et al. De novo sequencing of two new cyclic theta-defensins from baboon (*Papio hamadryas*) leukocytes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2010, 24:599-604.
9. Tang Y.Q., Yuan J., Osapay G. et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*. 1999, 286: 498-502.
10. Tran D., Tran P., Roberts K. et al. Microbicidal properties and cytotoxic selectivity of rhesus macaque theta defensins. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008, 52: 944-953.
11. Tsvetkova E.V., Aleshina G.M., Shamova O.V. et al. α -Defensins from blood leukocytes of the monkey *Papio hamadryas*. *Biochemistry (Moscow)*. 2006, 71: 879-883.
12. Tsvetkova E.V., Leonova L.E., Aleshina G.M. et al. Antimicrobial effects of α -defensins from leukocytes of the hamadryas baboon *Papio hamadryas*. *J. Evolutionary Biochemistry Physiology*. 2016, 52(2): 133-140.
13. Varkey J., Nagaraj R. Antibacterial activity of human neutrophil defensin HNP-1 analogs without cysteines. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005, 49: 4561-4566.
14. Weiss T.M., Yang L., Ding L. et al. Two states of cyclic antimicrobial peptide RTD-1 in lipid bilayers. *Biochemistry*. 2002, 41: 10070-10076.
15. Yamaguchi S., Hong T., Waring A. et al. Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a β -sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry*. 2002, 41: 9852-9862.

Поступила 06.03.18

Контактная информация: Цветкова Елена Викторовна, к.б.н.,
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9, р.т. (812)328-21-82

© Т.А.ЧЕКАНОВА, С.Н.ШПЫНОВ, И.В.ТАРАСЕВИЧ, 2018

Т.А.Чеканова, С.Н.Шпынов, И.В.Тарасевич

АВИДНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IGG К RICKETTSIA PROWAZEKII КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ КРИТЕРИЙ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО СЫПНОГО ТИФА И ЕГО РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ФОРМЫ — БОЛЕЗНИ БРИЛЛЯ-ЦИНССЕРА

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

Цель. Исследование диагностической значимости индекса авидности (ИА) антител класса G к *R. prowazekii* наряду с определением специфических IgG и IgM. *Материалы и методы.* В ИФА определяли IgG/IgM к *R. prowazekii*, их титры и ИА IgG в 112 образцах сывороток крови (47 сывороток от вакцинированных против сыпного тифа лиц и 65 образцов от больных и/или переболевших эпидемическим сыпным тифом и/или болезнью

Брилья, включая 18 сывороток, собранных во время расследования вспышки сыпного тифа в 1998 г. в Липецке). *Результаты.* Определены методологические подходы для оценки ИА IgG к *R. prowazekii*. Начальный период (возможно, разгар) эпидемического сыпного тифа серологически доказан в 8 случаях: в двух сыворотках выявлением только IgM к *R. prowazekii*, в 6 образцах наряду с IgM были определены IgG к *R. prowazekii* с низкими или средними значениями ИА. В 19 образцах одновременно выявлены IgM и высокоавидные IgG к *R. prowazekii*, что серологически свидетельствовало о болезни Брилья. В 2 из 47 сывороток вакцинированных установлен низкий ИА при значимых титрах IgG. *Заключение.* ИА IgG к *R. prowazekii* имеет высокую прогностическую ценность, прежде всего, для проведения дифференциальной диагностики эпидемического сыпного тифа и болезни Брилья-Цинссера.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 73—80

Ключевые слова: *Rickettsia prowazekii*, авидность антител, специфические IgG и IgM, эпидемический сыпной тиф, болезнь Брилья-Цинссера, дифференциальная диагностика

T.A.Chekanova, S.N.Shpynov, I.V.Tarasevich

AVIDITY OF IGG TO *RICKETTSIA PROWAZEKII* AS AN ADDITIONAL CRITERION FOR THE SEROLOGICAL DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF THE EPIDEMIC TYPH AND ITS RECRUDESCENT FORM — BRILL-ZINSSER DISEASE

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

Aim: to investigate the diagnostic significance of avidity index (AI) for IgG to *R. prowazekii* with the determination of specific G and M class antibodies. *Materials and methods.* IgG/IgM to *R. prowazekii*, their titers and AI of IgG were measured in ELISA in 112 serum samples (47 sera from typhus-vaccinated individuals and 65 samples from patients and/or convalescents of epidemic typhus and/or Brill-Zinsser disease, including 18 sera collected during Lipetsk epidemic typhus outbreak in 1998). *Results.* Methodological approaches for estimation of AI for IgG to *R. prowazekii* have been determined. The initial period (or acute) of epidemic typhus we serologically detected in 8 cases by identifying of IgM to *R. prowazekii* only in two sera and IgM as well as IgG to *R. prowazekii* with low or medium values of AI in 6 samples. In 19 samples from patients we indicated Brill-Zinsser disease due to the presence in them specific IgM and IgG to *R. prowazekii* with high values AI. In 2 sera from vaccinated persons was established a low AI of IgG at significant diagnostic titers. *Conclusion.* AI of IgG to *R. prowazekii* has high prognostic information for differential diagnosis of epidemic typhus and Brill-Zinsser disease.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 73—80

Key words: *Rickettsia prowazekii*, avidity of antibodies, specific IgG and IgM, epidemic typhus, Brill-Zinsser disease, differential diagnosis

ВВЕДЕНИЕ

Способность *Rickettsia prowazekii* к латентной персистенции в организме переболевшего эпидемическим сыпным тифом (ЭСТ) и активации его метаболических процессов вследствие различных стрессовых ситуаций, приводящей, даже спустя многие годы, к развитию рецидива заболевания, известного как болезнь Брилья-Цинссера (болезнь Брилья, возвратный сыпной тиф), обеспечивает не только длительное сохранение возбудителя в популяции, но и потенциальную возможность возникновения спорадических случаев и вспышек ЭСТ при благоприятных для этого условиях (наличие переболевших ЭСТ, платяной педикулез, ухудшение экономических и социальных условий, высокая миграционная активность населения) [2, 4, 5].

Дифференциальная диагностика ЭСТ и болезни Брилья (ББ) является важной составляющей эпидемиологического расследования вспышек или спорадических случаев, а также мониторинга за заболеваемостью этими двумя нозологическими формами. В настоящее время методологические подходы и рекомендации для диф-

ференциации ЭСТ и бБ, предложенные еще в 60-е годы прошлого столетия, имеют ряд противоречий. Традиционно считается, что при ЭСТ наблюдается формирование на ранних этапах иммуногенеза макроглобулиновых 19S-антител (IgM), а позднее — 7S-антител (IgG), в то время как при бБ уже с первых дней выявляются только 7S-антитела [2, 8, 16, 20]. Вместе с тем, в работах ряда исследователей [12] представлены убедительные лабораторные данные выявления IgM к *R. prowazekii* наряду со специфическими IgG у больных бБ в диагностически значимых титрах, что оставляет вопрос о дифференциальной диагностике ЭСТ и бБ, основанный на разграничении 19S и 7S-антител, открытым.

В последние годы появились многочисленные публикации, свидетельствующие о целесообразности дополнительного изучения avidности специфических антител к различным патогенам для разграничения первичной острой формы, рецидива и пастинфекции. Оценка индекса avidности (ИА) IgG в качестве индикатора срока первичного инфицирования впервые предложена в 1989 г. Hedman K. M. et al. [13]. Во время раннего иммунного ответа IgG нацелены на множественность различных эпитопов патогена с относительно низкой avidностью, дальнейший клональный отбор приводит к формированию высокоавидных антител, направленных, в основном, на ограниченное число иммунодоминантных эпитопов белков возбудителя. ИА возрастает по мере увеличения длительности инфекции. На сегодняшний день разработаны, по большей части, в формате иммуноферментного анализа (ИФА) тесты для определения avidности антител к вирусам (краснухи, гепатитов, иммунодефицита человека, Зика, денге, кори, клещевого энцефалита, парвовирусу В19, герпесвирусам), простейшим (*Toxoplasma gondii*), возбудителям инфекций бактериальной природы (коклюша, дифтерии, Лайм-боррелиоза) [6, 9, 11, 14, 15, 17, 18]. Вместе с тем, нет работ, посвященных анализу avidности специфических антител при риккетсиозах.

Принимая во внимание факт, что этиологически обе нозологические формы (ЭСТ и бБ) обусловлены одним возбудителем, без изменения его иммунобиологических свойств [4], представляет несомненный интерес проведение сравнительного анализа ИА IgG к *R. prowazekii* в сыворотках крови больных ЭСТ и бБ.

Целью работы явилось пилотное исследование диагностической значимости ИА антител класса G к *R. prowazekii* наряду с определением специфических IgG и IgM в сыворотках крови больных/переболевших ЭСТ и бБ, а также вакцинированных против сыпного тифа лиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследованы 112 лиофилизированных сывороток крови людей из рабочей коллекции лаборатории экологии риккетсий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, содержащие по данным первичного скрининга в ИФА специфические антитела классов G и/или M к *R. prowazekii*: 47 сывороток крови от вакцинированных против сыпного тифа лиц и 65 образцов от больных и/или переболевших ЭСТ и/или бБ, включая 18 сывороток крови, полученных в январе-феврале 1998 г. от больных во время эпидемиологического расследования последней официально зарегистрированной в России вспышки ЭСТ в психоневрологическом диспансере Липецка. Лиофилизированные образцы непосредственно перед исследованием были восстановлены добавлением изотонического раствора.

Первичный скрининг сывороток с целью выявления IgG и IgM к *R. prowazekii* проводили в ИФА с помощью разработанной нами экспериментальной тест-системы. Для получения иммуносорбента использовали высокоочищенный растворимый протективный антиген вирулентной культуры *R. prowazekii* (штамм Брейнль) из коллекции лаборатории экологии риккетсий, полученный по Голинович Е.М. и др. [1], который разводили до концентрации 4-5 мкг/мл по основному белку в 0,02M карбонат-бикарбонатном буфере, pH-10,8 и сорбировали в полистироловых планшетах. Состав тест-системы включал многокомпонентный раствор для разведения образцов и концентрата конъюгата (РРОК); контрольные положительные (К+) и отрицательные (К-) образцы, содержащие и не содержащие соответственно анти-

тела к *R. prowazekii*; конъюгаты антител козы против IgG и IgM человека, меченных пероксидазой хрена (ПХ) производства ООО «Имтек», Россия в подобранных разведениях; фосфатно-солевой раствор с добавлением 0,1% твина-20 (ФСР-Т); однокомпонентный водный раствор 3',5'-тетраметилбензидаина (ТМБ) производства ЗАО «Иммунотех», Россия; стоп-реагент (0.75 М серная кислота).

Схема проведения ИФА включала последовательные стадии: разведение на РРОК испытуемых и контрольных образцов 1:100, их инкубирование в лунках иммуносорбента в течение 1 ч при 37 °С, 6-кратную промывку иммуносорбента ФСР-Т, 1-часовую экспозицию при 37 °С с конъюгатами (для определения антител класса G к *R. prowazekii* вносили конъюгат анти-IgG человека с ПХ в рабочей концентрации, для определения антител класса M к *R. prowazekii* — рабочее разведение конъюгата анти-IgM человека с ПХ). После 6-кратной промывки иммуносорбента ФСР-Т вносили ТМБ на 15-20 мин, реакцию останавливали добавлением стоп-реагента, проводили измерение оптического поглощения (ОП) в лунках с помощью ридера при длине волны 450 нм. Для каждого вида исследования (определение IgG и IgM) рассчитывали ОПкрит добавлением к среднему значению ОП (К-) коэффициента 0.2. Если ОП исследуемого образца превышала или была равной ОПкрит, его считали положительным на наличие IgG и/или IgM к *R. prowazekii*. Дополнительно оценивали конечные титры IgG и IgM к *R. prowazekii*.

Образцы, содержащие антитела класса G к *R. prowazekii*, были изучены в тесте на avidность IgG в ИФА с применением экспериментальной тест-системы с небольшой модификацией в постановке анализа. Сыворотки крови в разведении 1:100 вносили параллельно в две лунки иммуносорбента и инкубировали 1 ч при 37 °С. После стандартной однократной промывки иммуносорбента в одну лунку (контроль) вносили ФСР-Т, в другую (опыт) — ФСР-Т с добавлением денатурирующего раствора (мочевины в конечной концентрации 8 М) и выдерживали 10 мин при комнатной температуре. Нами были проведены предварительные исследования по влиянию различных концентраций мочевины и времени экспозиции раствора в опытных лунках (стандартное 6-кратное промывание или выдержка денатурирующего раствора в течение 5, 10, 15 мин при комнатной температуре) и выбраны оптимальные условия для эффективного разрушения низкоавидных антител. После заключительной стандартной двукратной промывки всего планшета ФСР-Т во все лунки вносили рабочее разведение конъюгата анти-IgG человека с ПХ и инкубировали 1 ч при 37 °С. На присутствие в образце низкоавидных антител или с переходной (средней) avidностью указывало снижение ОП в лунке, обработанной денатурирующим раствором, по сравнению с контрольной. Индекс avidности (ИА) антител рассчитывали по формуле: $IA = \frac{OP_{опыт}}{OP_{контроль}} \times 100 \%$, где $OP_{опыт}$ — ОП образца в опытной лунке, $OP_{контроль}$ — ОП образца в контрольной лунке.

Для оценки влияния на ИА IgG антител класса M проводили дополнительные исследования по редукции последних в сыворотках крови, содержащих IgM к *R. prowazekii* с помощью 0,2 М раствора 2-меркаптоэтанолa [10], приготовленному на изотоническом растворе, добавленном в равном объеме к сывороткам (опытная группа). Контрольная группа представляла собой те же сыворотки, смешанные в равном объеме с изотоническим раствором. Пробы опытной и контрольной групп инкубировали 1 ч при 37 °С. Полноту редукции IgM оценивали в ИФА. В лунки планшета, сорбированным *R. prowazekii*, вносили сыворотки контрольной и опытной групп, разведенные 1: 50 РРОК (конечное разведение с учетом преаналитического — 1:100). Оценивали IgG и IgM к *R. prowazekii*, ИА IgG.

Статистическую обработку данных проводили в Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам первичного скрининга в ИФА только в двух образцах из 112 исследуемых были выявлены исключительно IgM к *R. prowazekii* в титрах 1:800. Сыворотки крови получены от двух пациентов психоневрологического диспансера Липецка, заболевших во время вспышки ЭСТ. Отсутствие IgG к *R. prowazekii* наряду

с клинической картиной, характерной для ЭСТ, безусловно, свидетельствует о раннем периоде заболевания эпидемическим сыпным тифом.

В 26 образцах были выявлены антитела к *R. prowazekii* двух классов — IgG и IgM, а в 84 сыворотках крови детектировали только иммуноглобулины класса G. Сыворотки, содержащие IgG к *R. prowazekii* (n=110), были оценены на ИА специфических антител класса G.

Учитывая ограниченность выходных данных для большинства образцов (клинический диагноз — ЭСТ или ББ; сроки взятия крови, прошедшие со дня инфицирования или вакцинации), в нашей работе мы приняли следующие критерии, которые впоследствии, по мере накопления опытных наблюдений, могут быть уточнены: низкоавидными считали антитела класса G при ИА ≤ 50%, антитела с переходной (средней) авидностью, если показатель ИА антител находился в диапазоне 51 — 69%, высокоавидными считали IgG при ИА ≥ 70%.

Распределение ИА антител класса G к *R. prowazekii* в группах сывороток, содержащих по данным скрининга оба класса иммуноглобулинов IgG + IgM (n=26) — 1 группа или только IgG (n=84) — 2 группа, представлены в табл. 1. В обеих группах чаще определяли высокоавидные антитела. Процентное содержание низкоавидных антител класса G было выше в группе образцов, в которых наряду с IgG к *R. prowazekii* были выявлены специфические IgM, а антител со средней авидностью — в образцах из группы 2. Процентное содержание сывороток крови, в которых IgG имели ИА с низкой или средней авидностью, в обеих группах было приблизительно одинаковым, как и образцов с высокоавидными иммуноглобулинами. Низкоавидные IgG к *R. prowazekii*, выявленные одновременно со специфическими IgM в 6 образцах, вероятнее всего, свидетельствуют об ЭСТ в его начальном периоде.

Нами была также проведена сравнительная оценка ИА IgG и титров специфических иммуноглобулинов обоих классов (табл. 2 и 3).

Результаты, приведенные в табл. 2, свидетельствуют, что в группе образцов, содержащих оба класса иммуноглобулинов к *R. prowazekii*, по мере нарастания авидности IgG, диапазон их титров сдвигается в сторону увеличения. Однако мы отмечали, что две сыворотки с низкой авидностью IgG имели титр 1: 3200, как и в трех образцах среди 19 с высокими показателями ИА. В сыворотках крови, содержащих только иммуноглобулины класса G к *R. prowazekii* (табл. 3), с ростом ИА отмечалось и увеличение титров IgG в большинстве случаев при некоторых исключениях. Таким образом, судить о давности срока инфицированности, полагаясь на их титры без оценки их динамического изменения, некорректно в силу особенностей иммунной системы пациента (сопутствующие иммунодефицитные состояния, аутоиммунные заболевания, иммуносупрессивная терапия и прочее).

Для оценки возможного влияния на показатели

Таблица 1. Распределение в группах исследованных сывороток (n=110) ИА IgG к *R. prowazekii*

Группы образцов	Количество образцов с разными ИА IgG (% содержание образцов в группе)		
	ИА ≤ 50%	51% < ИА < 69%	ИА ≥ 70%
1 группа	6 (23,1%)	1 (3,8%)	19 (73,1%)
2 группа	4 (4,8%)	16 (19,0 %)	64 (76,2 %)

Таблица 2. Оценка ИА IgG и титров антител к *R. prowazekii* в сыворотках крови, содержащих специфические иммуноглобулины классов G и M (n=26)

Группы образцов по величине ИА (число образцов)	Оценка средних значений ИА IgG и титров IgG/IgM		
	ИА IgG, % (M ± m)	Диапазон титров IgG	Диапазон титров IgM
≤ 50 % (n = 6)	39,7 ± 5,1	1:100 — 1:3200	1:100 — 1:800
51% < ИА < 69% (n=1)	60,3	1:800	1:00
≥ 70% (n = 19)	96,4 ± 6,3	1:3200 — 1:51200	1:100 — 1:800

Таблица 3. Оценка ИА и титров IgG к *R. prowazekii* в сыворотках крови, содержащих только специфические иммуноглобулины класса G (n=81)*

Группы образцов по величине ИА (число образцов)	Оценка средних значений ИА и титров IgG	
	ИА IgG, % (M ± m)	Диапазон титров IgG
≤ 50 % (n = 4)	42,9 ± 3,7	1:100 — 1:1600
51% < ИА < 69% (n=16)	59,3 ± 6,3	1:100 — 1:6400
≥ 70% (n = 61)	89,4 ± 8,0	1:200 — 1:51200

Примечание. * 3 образца были исключены из рассмотрения, т.к. ОП образцов в разведении 1: 100 превышала ОПкрит менее чем в 1,2 раза.

Таблица 4. ИА и титр IgG в образцах после редукции IgM 2-меркаптоэтанолом (n=26)

Образцы, распределенные на группы по величине ИА (число образцов)	ИА IgG, % (M ± m)	Диапазон титров IgG
≤ 50 % (n = 6)	36,5 ± 6,1	1:100 — 1:1600
51% <ИА< 69% (n=1)	57,9	1:800
≥ 70% (n = 19)	92,1 ± 5,1	1:3200 — 1:51200

выявления IgM к *R. prowazekii* при параллельном тестировании на одном иммуносорбенте образцов после обработки 0,2 М раствором 2-меркаптоэтанолом (опытная группа) и без обработки (контроль). Средние значения ОП необработанных сывороток составили $0,983 \pm 0,102$, в то время как предварительно обработанные 2-меркаптоэтанолом образцы достоверно стали серонегативными, со средними значениями ОП $0,154 \pm 0,011$ (различия между группами достоверны, $p < 0,05$). Было установлено, что вышеуказанная преаналитическая обработка практически не затрагивала ИА IgG и их титр (табл.4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Безусловно, методологический подход серологической дифференциальной диагностики ЭСТ и бБ, основанный на предварительной редукции 19S-антител в сыворотках крови больных с последующей оценкой титров в специфических реакциях с *R. prowazekii*, заслуживает внимания и имеет практическое значение. Впервые такая дифференциация была осуществлена Murray E. et al. в 1965 г. в реакции связывания комплемента (РСК) с использованием 2-меркаптоэтанолом [16], затем З.А.Вороновой в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с применением цистеина [20]. Однако эффективность такого подхода отмечалась на ранних сроках инфицирования, в среднем, до 20 дня, после которого она снижалась и практически утрачивала свою целесообразность [2]. Необходимо отметить, что помимо тотального разрушения 19S-антител (IgM) сульфгидрилредуцентами (мочевина, цистеин, 2-меркаптоэтанол, диэтиламин и другие), их короткое действие в определенных концентрациях и условиях оказывает также влияние на разрыв или ослабление связей антигена с «ранними» иммуноглобулинами (низкоавидными), практически не затрагивая комплекс с высокоавидными антителами. Широкое изучение авидности антител нашло развитие в клинической лабораторной диагностике инфекционных заболеваний лишь в конце прошлого столетия. Кроме того, только в 1965 г. в соответствии с первой классификацией иммуноглобулинов, принятой Всемирной Организацией Здравоохранения, 19S-антитела были признаны IgM, а 7S-антитела — IgG. Применение методов (РСК, РНГА и другие) длительное время в диагностике риккетсиозов без отдельного определения классов специфических антител способствовало укреплению мнения, что в организме больного бБ, в отличие от ЭСТ, определяются только IgG к *R. prowazekii*, независимо от стадии заболевания.

В свете современных знаний об авидности антител, установленного рядом исследователей факта выявления специфических IgM к *R. prowazekii* при бБ и полученных нами данных мы предполагаем, что:

в начальный период эпидемического сыпного тифа количество специфических IgM превалирует над суммарным количеством IgG (или же последние отсутствуют), редукция 19S-антител (IgM) закономерно приведет к снижению титров сывороток после обработки по Вороновой З.А. или Murray E. et al.; в последующем, при появлении низкоавидных IgG, происходит их превалирование над IgM, и это возможно верифицировать в тесте на авидность;

при болезни Брилля специфические IgG преобладают в количественном соотношении над имеющими место IgM, по аналогии с другими латентно персистирующими инфекциями в стадии рецидива;

при эпидемическом сыпном тифе авидность IgG нарастает постепенно, при этом в разгар заболевания и даже в период реконвалесценции (первые 1-2 месяца) они не будут высокоавидными; при болезни Брилля специфические IgG являются высокоавидными с начала заболевания;

ИА IgG макроглобулиновых антител (19S, IgM) были проведены исследования по редукции IgM 2-меркаптоэтанолом в 26 сыворотках крови, содержащих по данным скрининга антитела обоих классов к *R. prowazekii* с последующей оценкой ИА и титров IgG. Полная редукция антител класса М была доказана в ИФА в тесте для

выявление высокоавидных IgG в отсутствии IgM к *R. prowazekii* свидетельствует о перенесенном ЭСТ или бБ (более 3-6 месяцев назад) или о протективном поствакцинальном иммунном ответе;

выявление антител класса G с переходной (средней) авидностью в присутствии IgM требует дополнительного подтверждения характера иммунного ответа через некоторое время и может свидетельствовать о более позднем периоде заболевания или формировании поствакцинального ответа;

выявление антител класса G с переходной авидностью в отсутствии IgM требует дополнительного подтверждения характера иммунного ответа через некоторое время, может свидетельствовать о более позднем периоде заболевания или наблюдаться у вакцинированных лиц в период формирования антител или у давно вакцинированных лиц с динамикой к снижению защитных свойств антител.

Полученные нами данные позволили сделать предположение о наличии 19 случаев бБ среди 112 исследуемых с помощью предлагаемого подхода: во всех этих сыворотках наряду со значимыми диагностическими титрами IgM определялись высокоавидные антитела класса G. Достоверно известны архивные сведения только по двум образцам сывороток крови больных бБ с подтвержденным клиническим диагнозом, которые мы также серологически верифицировали не иначе как болезнь Брилля. В структуре этой группы следует выделить 2 образца, полученных от двух пациентов во время липецкой вспышки, где наряду со значимыми титрами IgM — 1:400 и 1:800, были выявлены высокие титры IgG 1:25600 — 1:51200 с ИА, близкими к 100%.

Отдельного внимания заслуживает ретроспективный анализ 18 образцов сывороток, собранных в январе-феврале 1998 г. при эпидемиологическом анализе вспышки ЭСТ в психоневрологическом диспансере Липецка, который позволил нам сделать определенные выводы в контексте изначально ограниченных и противоречивых сведениях о ней. Известно, что своевременную информацию по факту появления первого случая заболевания получить не представилось возможным. Проведенное эпидемиологическое расследование позволило предположить начало неблагополучия по сыпному тифу в диспансере в конце 1997 г. Однако анализ движения больных показал, что за 2 месяца до официальной регистрации вспышки (в декабре 1997 г.) из стационара были выписаны 50 человек, причем трое из них переболели сыпным тифом [7,8]. Следовательно, не исключена возможность ее начала еще в октябре 1997 г. и даже раньше на фоне отдельных спорадических случаев. Сведения о количестве бБ противоречивы, но чаще фигурировали в сообщениях об одном-двух таких пациентах. Расходятся также цифры о количестве заболевших ЭСТ [5, 7, 8, 19].

Как мы уже отмечали, 2 пациента, по нашим последним экспериментальным данным, на момент взятия крови имели рецидив сыпного тифа (бБ). У двух больных мы детектировали только специфические IgM. В пяти образцах наряду с IgM определили низкоавидные IgG к *R. prowazekii*, еще в одном случае — IgG с переходной авидностью. Таким образом, 8 сывороток крови могли принадлежать больным ЭСТ в начальном периоде или в периоде его разгара (вероятно, не более 1-2 месяцев с момента заболевания). В остальных 8 сыворотках из 18 изученных при отсутствии IgM к *R. prowazekii* нами были выявлены высокоавидные IgG, что, скорее, свидетельствует о более раннем инфицировании сыпным тифом сроком более 3 месяцев.

В 47 образцах от вакцинированных против сыпного тифа лиц не были выявлены IgM к *R. prowazekii*. Образцов, содержащих высокоавидные антитела класса G, было большинство (n=32), а со средними показателями ИА — 13 сывороток. Два образца содержали низкоавидные IgG, по одному из которых нам была доступна информация об отмечаемом снижении титров антител к *R. prowazekii* в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) и РСК на протяжении 3 лет. На момент забора крови титр в РНИФ — 1:20, РСК с антигеном *R. prowazekii* — 0. Титр IgG в экспериментальной иммуноферментной тест-системе — 1:800, ИА IgG — 34,8%. Имеются исследования, доказывающие необходимость изучения ИА поствакцинальных антител для оценки их защитных свойств от некоторых вакциноуправляемых инфекций и принятия решения о ревакцинации [3, 9].

Таким образом, дополнительное изучение авидности специфических антител может предоставить много прогностически ценной информации для эпидемиологов

и инфекционистов в диагностике риккетсиозов. Данная пионерская работа позволяет по-новому представить решение проблемы серологической дифференциальной диагностики ЭСТ и бБ. Изучение avidности IgG наряду с выявлением антител классов G и M к R. prowazekii позволит дополнить существующий диагностический алгоритм при ведении больных ЭСТ и бБ с верификацией нозологической формы, успешно проводить ретроспективный анализ вспышек и спорадических случаев сыпного тифа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голиневич Е.М., Воронова З.А., Гудима О.С., Фрязинова И.Б., Бочарова Т.В. Химическая сыпнотифозная вакцина. Сообщение I. Иммуногенная субстанция риккетсий *Proxazekii* Провачека, ее получение и характеристика. Вестник АМН СССР. 1969, 10: 63-77.
2. Здродовский П.Ф., Голиневич Е.М. Учение о риккетсиях и риккетсиозах. М., Медицина, 1972.
3. Краева Л.А., Алексеева Е.А., Ценева Г.Я., Липатова Л.А. Беспаслова Г.И. Современные подходы к комплексным лабораторным исследованиям на дифтерию. Инфекция и иммунитет. 2012, 2(4):729-734.
4. Лукин Е.П., Воробьев А.А., Махлай А.А. Элементы патогенеза риккетсиозов в свете современных данных. Вестник РАМН. 1999, 12:7-13.
5. Лукин Е.П. К 100-летию открытия возбудителя эпидемического сыпного тифа — *Rickettsia prowazekii* (H. da Rocha Lima, 1916). Вернется ли сыпной тиф в Россию и Европу? Журнал инфектологии. 2015, 7(3):5-21.
6. Марданлы С.Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH-группы на основе современных технологий лабораторной диагностики. Автореф. дисс. д.м.н. М., 2016.
7. Савельев С.И., Шукина И.А., Мищук В.И., Зубова Н.Ю., Бондарев В.А., Герман К.М., Слюсарева Г.П., Иванова А.А., Фетисова Н.Ф., Комарова А.И., Умнова Н.С., Тарасевич И.В. Вспышка эпидемического сыпного тифа в Липецкой области. ЗНиСО. 1998, 1:7-11.
8. Тарасевич И.В., Боев Б.В. Сыпной тиф и математическое моделирование эпидемического процесса. Смоленск: МАКМАХ, 2013.
9. Caborij R.N., Maertens K., Dobby A. et al. Influence of maternal vaccination against diphtheria, tetanus, and pertussis on the avidity of infant antibody responses to a pertussis containing vaccine in Belgium. Virulence. 2017, Oct 3; 8(7):1245-1254.
10. Capel P.J., Gerlag P.G., Hagemann J.F., Koene R.A. The effect of 2-mercaptoethanol on IgM and IgG antibody activity. J. Immunol. Methods. 1980. 36(1):77-80.
11. Gaudy-Graffin C., Lesage G., Kousignian I. et al. Use of an anti-hepatitis C virus (HCV) IgG avidity assay to identify recent HCV infection. J. Clin. Microbiol. 2010 Sep; 48(9):3281-3287.
12. Faucher J.F., Socolovschi C., Aubry C. et al. Brill-Zinsser disease in Moroccan man, France, 2011. Emerg. Infect. Dis. 2012 Jan; 18(1):171-172.
13. Hedman K., Lappalainen M., Soderlund M., Hedman L. Avidity of IgG in serum diagnosis of infection diseases. Rev. Med. Microbiol. 1993, 4:123-129.
14. Lappalainen M., Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. Ann. Ist. Super Santa. 2004, 40(1): 81-88.
15. Lau L., Green A. M., Balmaseda A., Harris E. Antibody avidity following secondary Dengue virus type 2 infection across a range of disease severity. J. Clin. Virol. 2015, Aug; 69: 63-67.
16. Murray E., Gaon J., O'Connor J., Mulahasanovic M. Serological studies of primary epidemic typhus and recrudescent typhus (Brill-Zinsser disease). Differences in complement-fixation antibodies: high antigen requirement and heat lability. J. Immunol. 1965, 94:723-733
17. Rauer S., Beitlich P., Neubert U. et al. Avidity determination of *Borrelia burgdorferi*-specific IgG antibodies in Lyme disease. Scand. J. Infect. Dis. 2001, 33 (11):809-811.
18. Sirin M.C., Agus N., Yilmaz N. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, Rubella virus and Cytomegalovirus among pregnant women and the importance of avidity assays. Saudi Med. J. 2017, Jul; 38(7): 727-732.
19. Tarasevich I., Rydkina E., Raoult D. Outbreak of epidemic typhus in Russia. Lancet. 1998, 352(9125): 353-358.
20. Voronova Z.A. Differentiation of 19S and 7S rickettsial antibodies by passive haemagglutination reaction with cysteine. Acta Virol. 1968, Jan; 12(1):73-77.

Поступила 04.04.18

Контактная информация: Чеканова Татьяна Александровна, к.б.н., 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)193-43-10

А.М.Седов¹, А.Н.Наровлянский¹, А.В.Пронин¹, А.В.Санин¹, И.К.Зубашев¹, А.В.Измestьева¹,
А.М.Иванова¹, Т.М.Парфенова¹, А.Е.Шульженко², И.Н.Зуйкова², Р.В.Шубелко², А.А.Халдин³,
Д.Р.Исаева³, Е.П.Селькова⁴, Е.А.Григорьева¹

МЕХАНИЗМ ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО ПРЕПАРАТА ФОРТЕПРЕН® ПРИ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ГЕНИТАЛЬНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва; ²Государственный научный центр Институт иммунологии, Москва; ³Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии; ⁴Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского

Цель. Изучение механизма противовирусного действия и оценка клинической эффективности, безопасности и переносимости терапии препаратом Фортепрен® у пациентов с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией генитальной локализации. **Материалы и методы.** Клинические исследования проводил лекарственный препарат Фортепрен® (натрия полипренилфосфат) раствор для инъекций, 4 мг/мл, который вводили пациентам, прошедшим базовый курс препарата Ацикловир-Акри® для снятия острой фазы заболевания. Исследование проводили на 80 пациентах мужского и женского пола, отобранных в процессе скрининга с подтвержденным диагнозом хроническая рецидивирующая герпесвирусная инфекция генитальной локализации (ХРГВИ). Было сформировано 2 группы. Пациентам 1 группы (экспериментальной) Фортепрен® в дозе 2 мл (8 мг) вводили внутримышечно на стадии ремиссии трехкратно с интервалом в 21 день на 3±2, 24±2 и 45±2 сутки после окончания 10-дневного базового курса лечения острой фазы заболевания с применением препарата ацикловир таблетки по 400 мг — 13±2, 34±2 и 55±2 день от начала исследования. Пациентам 2 группы (контрольной) раствор плацебо в объеме 2 мл вводили внутримышечно на стадии ремиссии трехкратно на 3±2, 24±2 и 45±2 сутки после окончания базового курса лечения острой фазы заболевания с применением препарата ацикловир таблетки по 400 мг — 13±2, 34±2 и 55±2 день от начала исследования. Для оценки эффективности применения препарата Фортепрен® использовали такие критерии как: увеличение продолжительности межрецидивного периода, уменьшение частоты рецидивов за весь период наблюдения; снижение выраженности рецидивов, оцененное в баллах, изменение иммунологических показателей по динамике изменения продукции основных цитокинов. **Результаты.** В 1 группе пациентов межрецидивный период за весь период проведения исследования статистически значимо увеличился с 29,36±2,16 до 42,98±3,29 суток. В то время как во 2 группе изменения этого показателя не отмечено. Соответственно у пациентов 1 группы отмечено статистически достоверное сокращение частоты рецидивов ХРГВИ с 3,03±0,02 до начала лечения до 1,94±0,19 во время лечения при отсутствии снижения частоты рецидивов в контроле. Оценка в баллах выраженности рецидивов ХРГВИ у пациентов группы 1 указывает на эффективность данной схемы лечения. Сумма баллов средних значений балла выраженности признаков ХРГВИ статистически достоверно снизилась в 1 группе с 7,36±0,35 баллов на 1 визите до начала лечения до 4,75±0,35 баллов во время лечения. Во 2 группе изменений не отмечено. Уровень лейкоцитарного вирус-индуцированного интерферона (ЛВИ—ИФН) у пациентов экспериментальной группы повысился к завершению клинического исследования с 36 до 64% по сравнению с контрольной группой, в которой не наблюдалось прироста титров ЛВИ-ИФН. Оценка продукции ИФН α , ИФН γ , ИЛ-10, ИЛ-12p40, ИЛ-12p70, ИЛ-15, ИЛ-2, ИЛ-4, МИФ-1 α , ФНО α показала увеличение их количества к завершению исследования у пациентов, получавших препарат Фортепрен®, по сравнению с контрольной группой. **Заключение.** Показана эффективность применения препарата Фортепрен® в дозе 2 мл (8 мг) при внутримышечном введении пациентам с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией генитальной локализации на стадии ремиссии трехкратно с интервалом в 21 день на 3±2, 24±2 и 45±2 сутки после окончания 10-дневного базового курса лечения острой фазы заболевания с применением препарата ацикловир.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 81—87

Ключевые слова: генитальный герпес, клинические исследования, Фортепрен®, эффективность, механизм действия, безопасность и переносимость

A.M.Sedov¹, A.N.Narovlyansky¹, A.V.Pronin¹, A.V.Sanin¹, I.K.Zubashev¹, A.V.Izmestieva¹,
A.M.Ivanova¹, T.M.Parfenova¹, A.E.Shulzhenko², I.N.Zuikova², R.V.Shubelko², A.A.Khaldin³,
D.R.Isaeva³, E.P.Selkova⁴, E.A.Grigorieva¹

MECHANISM OF ANTIVIRAL ACTION AND EVALUATION OF THE EFFICACY OF THE NEW PREPARATION FORTEPREN® IN THE COMPLEX THERAPY OF CHRONIC RECURRENT HERPESVIRUS INFECTION OF GENITAL LOCALIZATION

¹Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow; ²State Scientific Centre Institute of Immunology, Moscow; ³Moscow Scientific and Practical Centre of Dermatovenerology and Cosmetology; ⁴Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russia

Aim. The study of the mechanism of antiviral action and evaluation of the clinical efficacy, safety and tolerability of therapy with Fortepren® in patients with chronic recurrent herpesvirus infection of genital localization (CRHVI). *Materials and methods.* Clinical studies were carried out of a drug Fortepren® (0.4% sodium polyprenyl phosphate solution), which was administered to patients who underwent a basic therapeutic course of the drug Acyclovir-Acry® to relieve the acute phase of the disease. The study was performed on 80 male and female patients selected during the screening with a confirmed diagnosis of CRHVI. Two groups were formed. Patients of group 1 (experimental) were intramuscularly injected with Fortepren® at a dose of 2 ml (8 mg) three times at intervals of 21 days by 3 ± 2 , 24 ± 2 and 45 ± 2 days following the 10-day basic course of treatment of the acute phase of diseases with the use of the acyclovir tablets of 400 mg — 13 ± 2 , 34 ± 2 and 55 ± 2 days from the beginning of the study. Patients of the 2nd group (control) were intramuscularly injected with placebo solution at a volume of 2 ml instead of Fortepren®. To evaluate Fortepren® efficacy, the following criteria were used: increase in the duration of the inter-recessive period, a decrease in the frequency of relapses over the entire observation period; decrease in the severity of relapses, estimated in points, changes in immunological parameters according to the dynamics of changes in the production of the main cytokines. *Results.* In patients treated with Fortepren®, the inter-recurrence period for the entire study period increased statistically from 29.36 ± 2.16 to 42.98 ± 3.29 days, while in the control group this indicator have not changed. Accordingly, in patients treated with Fortepren®, a statistically significant reduction in the incidence of recurrence of CRHVI from 3.03 ± 0.02 before treatment to 1.94 ± 0.19 was observed during treatment in the absence of a decrease in the frequency of relapses in the control. Evaluation of the severity of CRHVI relapses in patients treated with Fortepren® indicates the efficacy of this protocol. The sum of the scores of the mean values of CRHVI symptoms signs was statistically significantly decreased in the group 1 from 7.36 ± 0.35 points at the 1 st visit before the start of treatment to 4.75 ± 0.35 points during the treatment. No changes were seen in the control group. The level of leukocyte virus-induced interferon (LVI-IFN) in the patients of the group 1 increased from 36% to 64% in the end of the clinical trial compared to the control group, in which the increase in LVI-IFN titers was not observed. To further justify the possibility of increasing the immune response of cells, establishing possible mechanisms that determine the efficacy of treatment for CRHVI with Fortepren®, evaluation of the production of IFN α , IFN γ , IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15, IL-2, IL-4, MIF-1 α , TNF α was made. In the of the study levels of all these cytokines was increased in patients treated with Fortepren® compared with the control group. *Conclusion.* The efficacy of using Fortepren® in a dose of 2 ml (8 mg) with intramuscular administration to patients with chronic recurrent herpesviral infection of genital localization at the stage of remission three times with an interval of 21 days by 3 ± 2 , 24 ± 2 and 45 ± 2 days after the end of 10 day basic course of treatment of the acute phase of the disease with the use of the drug acyclovir.

Zh.Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 81—87

Key words: genital herpes, clinical studies, Fortepren®, efficacy, mechanism of action, safety and tolerability

ВВЕДЕНИЕ

Генитальный герпес относится к числу повсеместно распространенных, социально значимых вирусных заболеваний, характерными особенностями которых

является пожизненная персистенция вируса в организме [5]. Этиологическим фактором генитального герпеса в большинстве случаев является вирус простого герпеса *Herpes simplex virus* (ВПГ) 2 типа, хотя в последние годы наблюдается повышение частоты генитального герпеса, вызываемого ВПГ 1 типа [3].

По данным ВОЗ за январь 2017 г. во всем мире инфицированы ВПГ-2 около 417 миллионов человек в возрасте от 15 до 49 лет, а ежегодно им заболевают 19,2 миллиона человек [2].

В настоящее время лекарственная терапия и профилактика герпесвирусной инфекции основана на применении химиотерапевтических средств (ацикловир, валацикловир, фамцикловир), иммунотерапии с использованием иммуномодуляторов (имунофан, галавит, иммуномакс, миелопид, ликопад, нуклеинат натрия и др.) и комбинированном использовании этих групп препаратов. Однако применение химиопрепаратов, влияющих на процессы репликации вирусной ДНК, для купирования и предупреждения рецидивов, не обеспечивает полной элиминации вируса из организма и иногда после отмены препаратов возможно продолжение рецидивов заболевания с прежней частотой [6].

Иммуномодуляторы назначают в комплексной терапии одновременно с противовирусными средствами с целью купирования вторичных иммунодефицитов, которые проявляются частыми, рецидивирующими, трудно поддающимися лечению инфекционно-воспалительными процессами разной локализации. Именно к таким процессам и относится хроническая рецидивирующая герпесвирусная инфекция (ХРГВИ), в частности ее генитальная форма [8].

Препарат Фортепрен[®], который представляет собой сумму фосфорилированных полипренолов хвой пихты, обладает выраженным противовирусным и иммуномодулирующим действием, усиливая естественную резистентность организма [1].

Сочетание этих двух свойств препарата Фортепрен[®] позволило предположить его эффективность в отношении инфекции, вызываемой вирусом простого герпеса.

В соответствии с решением Минздрава РФ №150 от 5 марта 2013 г. было проведено клиническое исследование II-III фазы «Многоцентровое плацебо-контролируемое простое слепое исследование по подбору режима дозирования и продолжительности курса лечения, оценке безопасности, переносимости и клинической эффективности препарата «Фортепрен[®]», раствор для инъекций 4 мг/мл при лечении пациентов с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией генитальной локализации».

На I этапе этого исследования в ГНЦ Институт иммунологии на 40 пациентах с ХРГВИ была показана клиническая эффективность Фортепрена[®], произведен подбор оптимального режима дозирования и кратности введения препарата, оценена его безопасность и переносимость пациентами [4].

В итоге была выбрана оптимальная схема применения, которая и легла в основу проведения 2 этапа клинических исследований в трех исследовательских центрах: ГНЦ Институт иммунологии, Московский Центр дерматовенерологии и косметологии и МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского на 80 пациентах с ХРГВИ.

Целью настоящего исследования было изучение механизма противовирусного действия и оценка клинической эффективности, безопасности и переносимости терапии препаратом Фортепрен[®] у пациентов с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией генитальной локализации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат Фортепрен[®] (натрия полипренилфосфат) раствор для инъекций, 4 мг/мл. Производитель — филиал «Медгамал» ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Для сравнения в контрольной группе использовали препарат плацебо — физиологический раствор (раствор натрия хлорида изотонический 0,9% для инъекций).

В качестве базового препарата для снятия острой фазы заболевания применяли противовирусный препарат Ацикловир-Акри[®] производства ОАО «Акрихин».

В исследование были включены 80 пациентов мужского и женского пола с подтвержденным диагнозом ХРГВИ и отобранных в процессе скрининга. Верификацию

диагноза осуществляли на основании обнаружения ДНК-вирусов простого герпеса 1 и/или 2 типа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Пациенты соответствовали следующим критериям включения: возраст 18-55 лет; клинически и лабораторно подтвержденный диагноз ХРГВИ в периоде обострения, не более чем 48 часов от момента высыпаний; частота рецидивов герпеса не менее 10-12 раз в год; продолжительность заболевания не менее 1 года.

На протяжении 3 месяцев пациенты, принимающие участие в данном клиническом исследовании и из которых методом рандомизации было сформировано две группы (экспериментальная и контрольная), сделали по 9 визитов в медицинские центры, где прошли необходимые процедуры.

Всем пациентам, участвующим в исследовании на 1 визите в клинический центр для снятия острой фазы заболевания назначали базовую 10-дневную терапию противовирусным препаратом ацикловир по 1 таблетке 400 мг три раза в день.

На 2 визите проводилась рандомизация и формирование двух групп исследования.

Пациентам 1 группы (экспериментальной) Фортепрен® в дозе 2 мл (8 мг) вводили внутримышечно на стадии ремиссии трехкратно с интервалом в 21 день на 3 ± 2 , 24 ± 2 и 45 ± 2 сутки после окончания базового курса лечения острой фазы заболевания с применением препарата ацикловир — 13 ± 2 , 34 ± 2 и 55 ± 2 день от начала исследования.

Пациентам 2 группы (контрольной) раствор плацебо в объеме 2 мл вводили внутримышечно на стадии ремиссии трехкратно на 3 ± 2 , 24 ± 2 и 45 ± 2 сутки после окончания базового курса лечения острой фазы заболевания с применением препарата ацикловир — 13 ± 2 , 34 ± 2 и 55 ± 2 день от начала исследования.

Для оценки эффективности применения препарата Фортепрен® использовали такие критерии как: увеличение продолжительности межрецидивного периода (удлинение срока ремиссии) до и после лечения; уменьшение частоты рецидивов за весь период наблюдения; снижение выраженности рецидивов, оцененное в баллах от 0 при отсутствии признака рецидива до 3 при максимальной выраженности признака рецидива (местные признаки рецидива — зуд, жжение, болезненность, покалывание, гиперемия, отек, регионарный лимфаденит; общие признаки рецидива — слабость, головная боль, озноб, невралгия, миалгия, температура тела; количество очагов поражения; площадь поражения; число элементов поражения кожи или слизистой — везикулы, эрозии, корочки).

Изменение иммунологических показателей производили на основе изучения интерферонового статуса и динамики изменения продукции основных цитокинов.

Интерферон-продуцирующую способность лейкоцитов определяли в биологическом тесте по способности лейкоцитов крови продуцировать интерфероны под действием вируса болезни Ньюкасла (лейкоцитарный вирус-индуцированный интерферон ЛВИ-ИФН).

Для изучения динамики изменения продукции основных цитокинов, участвующих в иммунном ответе на вирус простого герпеса, на этапе скрининга (визит 1), а также в конце исследования (через 90 суток после скрининга, визит 9) у пациентов 1 и 2 групп брали кровь, получали мононуклеарные клетки, которые стимулировали вирусом болезни Ньюкасла (ВБН) или фитогемагглютинином (ФГА). Супернатанты стимулированных клеток исследовали на содержание основных цитокинов, участвующих в иммунном ответе на вирус простого герпеса, с помощью мультиплексного анализа MILLIPLEX® map Kit: Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel [9].

Оценка безопасности и переносимости препарата Фортепрен® производилась на протяжении всего периода его использования и последующего наблюдения (частота нежелательных явлений; частота изменений клинического состояния, частота клинически значимых изменений результатов лабораторных и инструментальных методов обследования).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническое исследование показало эффективность применения препарата «Фортепрен®» в дозе 2,0 мл (8 мг) трехкратно с интервалом в 21 день при лечении пациентов с ХРГВИ по показателю «продолжительность межрецидивного периода (удлине-

ние срока ремиссии) до и после лечения». В 1 группе пациентов, получавших препарат «Фортепрен®», межрецидивный период за период проведения исследования статистически значимо ($p=0,0002$) увеличился с $29,36\pm 2,16$ (за 3 месяца до начала исследования) до $42,98\pm 3,29$ суток (в период исследования). В то время как во 2 группе (плацебо) межрецидивный период изменился статистически незначимо ($p=0,37$) с $28,51\pm 1,98$ (за 3 месяца до начала исследования) до $32,83\pm 19,12$ (в период исследования).

Также во время лечения выявлено статистически достоверное сокращение частоты рецидивов заболевания. Если до начала лечения среднее количество рецидивов составляло $3,03\pm 0,02$; $p<0,05$, то во время лечения оно снизилось до $1,94\pm 0,19$. Напротив, у 2 группы пациентов снижения частоты рецидивов не отмечено — $3,13\pm 0,05$ за 3 месяца до начала лечения и $2,75\pm 0,34$ за время исследования ($p=0,27$).

Следующим критерием оценки эффективности применения препарата Фортепрен® являлось снижение выраженности рецидивов (табл.1).

Проведенная оценка в баллах выраженности рецидивов ХРГВИ у пациентов группы 1 свидетельствует об эффективности схемы лечения.

Сумма баллов средних значений балла выраженности признаков ХРГВИ статистически достоверно снизилась в 1 группе с $7,36\pm 0,35$ баллов на 1 визите (скрининге) до начала лечения до $4,75\pm 0,35$ баллов во время лечения ($p=0,0002$) (табл. 1).

В группе 2 пациентов, получавших плацебо по той же схеме, разница средних значений балла выраженности признаков рецидива на 1 визите и во время лечения была статистически недостоверна — $6,91\pm 0,44$ на 1 визите и $5,95\pm 0,42$ во время лечения при $p=0,24$ (табл. 1).

Анализ уровня лейкоцитарного вирус-индуцированного интерферона (ЛВИ—ИФН) показал, что после проведенного курса лечения происходит более выраженное повышение интерферон-продуцирующей способности лейкоцитов к завершению клинического исследования с 36 до 64% по сравнению с контрольной группой, в которой не наблюдалось прироста титров ЛВИ-ИФН ($p<0,05$).

Для дополнительного обоснования возможности повышения иммунного ответа клеток, установления возможных механизмов, определяющих эффективность лечения хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекции с использованием препарата Фортепрен®, была проведена оценка продукции основных цитокинов (ИФН α , ИФН γ , ИЛ-10, ИЛ-12p40, ИЛ-12p70, ИЛ-15, ИЛ-2, ИЛ-4, МИФ-1 α , ФНО α) лейкоцитами, выделенными из крови пациентов экспериментальной и контрольной групп (табл. 2).

Установлено, что в ответ на ВБН лейкоциты пациентов 1 группы значимо сильнее продуцировали интерфероны ИФН α и ИФН γ по сравнению с клетками пациентов 2 группы. Такая же закономерность выявлена и при исследовании продукции интерлейкина ИЛ-12p40.

Напротив, продукция лейкоцитами интерлейкина ИЛ-17A, основного цитокина Th17-клеток, участвующих в развитии аутоиммунных и аллергических реакций, а также в защите от внеклеточных патогенов, резко усиливается к 9 визиту у пациентов контроль-

Таблица 1. Средние значения балла выраженности рецидивов в экспериментальной и контрольной группах

Выраженность рецидивов	Экспериментальная группа			Контрольная группа		
	Скрининг (1 визит)	Во время лечения	p	Скрининг (1 визит)	Во время лечения	p
Местные признаки	1,63±0,09 *	1,03±0,09 *	0,0001	1,28±0,11	1,23±0,11	0,79
Общие признаки	0,62±0,10 *	0,42±0,09 *	0,049	0,50±0,18	0,53±0,14	0,86
Температура	0,23±0,06	0,17±0,07	0,48	0,13±0,09	0,19±0,11	0,65
Количество очагов	1,21±0,07 *	0,84±0,10 *	0,002	1,25±0,14	1,00±0,12	0,06
Площадь поражения	1,13±0,15 *	0,59±0,11 *	0,003	1,06±0,21	0,75±0,16	0,24
Число элементов	2,53±0,14 *	1,71±0,19 *	0,001	2,69±0,15	2,25±0,27	0,14
Сумма	7,36±0,35 *	4,75±0,35 *	0,0002	6,91±0,42	5,95±0,42	0,24

Примечание. * Статистически достоверные отличия.

Таблица 2. Продукция цитокинов лейкоцитами больных экспериментальной и контрольной групп (M±m)

Показатель	Визит 1		Визит 9	
	Контроль	Эксперимент	Контроль	Эксперимент
ИФН α , ВБН	211,28±74,89	241,0±70,88	139,25±47,08	592,79±57,9
ИФН γ , ВБН	12,72±7,97	11,56±3,76	20,12±12,65	40,04±12,82
ИЛ-12p40, ВБН	4,42±1,1	4,34±1,13	5,7±2,0	9,66±2,21
ИЛ-12p40	4,25±0,11	3,15±0,8	14,35±8,12	25,58±4,9
ИЛ-17a	0,1±0,16	0,37±0,09	6,46±4,9	0,77±0,16
ИЛ-1 β ВБН	1,14±0,7	0,95±0,7	40,95±28,96	181,49±18,02
ИЛ-1 β ФГА	17,36±0,92	9,56±2,93	53,04±35,06	203,14±55,02
ИЛ-1 β	2,67±1,88	1,16±1,06	71,5±50,56	223,38±40,0
ИЛ-6, ВБН	27,07±2,58	15,94±4,52	291,16±129,07	835,67±149,06
ИЛ-6, РНА	487,07±103,66	297,28±108,04	466,97±204,92	1837,7±112,9
ИЛ-6	13,29±8,95	7,47±5,17	184,7±82,51	1045,64±250,74
МИФ-1 α , ВБН	268,86±31,73	209,58±51,98	1143,29±498,02	2503,95±149,06
ФНО α , ВБН	22,84±5,71	16,89±5,52	229,88±99,97	444,42±71,19
ФНО α	6,19±2,61	3,38±0,68	97,05±68,02	223,85±77,02

ной группы, тогда как после лечения Фортепреном® ИЛ-17A практически не обнаруживается в супернатантах лейкоцитов крови.

ИЛ-1, ИЛ-6, МИФ-1 α и ФНО α также усиленно продуцировались лейкоцитами пациентов 1 группы, полученными во время завершающего визита 9, по сравнению с группой 2. Этот эффект регистрировался как с неактивированными лейкоцитами, так и с лейкоцитами, активированными ВБН или ФГА (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО α) [9].

Препарат Фортепрен® в дозе 2,0 мл (8 мг), вводи-

мый внутримышечно, трехкратно с интервалом в 21 день, показал хороший профиль безопасности и удовлетворительный уровень переносимости.

Эффективность применения препарата Фортепрен® при лечении пациентов с ХРГВИ считали установленной в случае снижения частоты рецидивов, соответственно увеличения продолжительности межрецидивного периода, снижения выраженности рецидивов, изменения иммунологических показателей на основе оценки цитокинового статуса пациентов.

Сравнивая данные, полученные на 1 этапе клинических исследований препарата Фортепрен® с результатами 2 этапа исследования по показателю частота рецидивов (обострений) за 3 месяца наблюдения обнаруживается та же закономерность, а именно заметное ее снижение: на 1 этапе с 3,52±0,09 до 2,89±0,08 после лечения (p<0,001), на 2 этапе с 3,03±0,02 до 1,94±0,19 после лечения (p<0,05).

Напрямую связанным с показателем частота рецидивов (обострений) является показатель продолжительность межрецидивного периода (срока ремиссии) у пациентов, получивших лечение исследуемым препаратом Фортепрен®, который в данном исследовании значительно увеличился с 29,36±2,16 суток (до начала лечения) до 42,98±3,29 суток после его окончания (p=0,0002).

Суммарное значение баллов выраженности рецидивов по местным, общим признакам рецидива, температуре тела, количеству очагов поражения, площади очагов поражения, числу везикулезно-эрозивных элементов в очаге поражения в 1 группе снизилось с 7,36±0,35 баллов на 1-м визите (скрининге) до начала лечения до 4,75±0,35 баллов во время лечения (p=0,0002).

Анализ приведенных выше критериев оценки состояния принимавших участие в исследовании позволяет сделать заключение о том, что препарат Фортепрен® эффективен при лечении пациентов с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией генитальной локализации.

Известно, что главной мишенью применения иммуномодулирующих препаратов, к числу которых относится и Фортепрен®, служат вторичные иммунодефициты, которые проявляются частыми, рецидивирующими, трудно поддающимися лечению инфекционно-воспалительными процессами разной локализации [7]. Именно к таким процессам, требующим иммунокоррекции, и относится ХРГВИ. Иммуномодуляторы назначают в комплексной терапии одновременно с противовирусными средствами [8].

В данном исследовании было установлено, что применение препарата Фортепрен® способствовало восстановлению параметров противовирусного иммунитета, определяемому по ИФН-продуцирующей способности лейкоцитов перифе-

рической крови (ЛВИ-ИФН) у 64% пациентов, получивших лечение по сравнению с контрольной группой (плацебо) в течение 3 месяцев наблюдения.

Кроме того, показано, что препарат Фортепрен® стимулирует продукцию таких основных цитокинов, как ИФН α , ИФН γ , ИЛ-10, ИЛ-12p40, ИЛ-12p70, ИЛ-15, ИЛ-2, ИЛ-4, МИФ-1 α , ФНО α , лейкоцитами, выделенными из крови пациентов 1 экспериментальной и 2 контрольной групп, из чего можно предположить, что в основе лечебного эффекта препарата Фортепрен®, в первую очередь, лежит восстановление цитокинового статуса пациентов с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией генитальной локализации.

Работа выполнена при поддержке Министерства промышленности и торговли Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по государственному контракту № 124111.1008799.13.120 и финансовой поддержке ООО «ГамаВетФарм».

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А.Н., Ожерелков С.В., Козлов В.В. Противовирусная и иммуномодулирующая активность полипренилфосфатов при вирусных инфекциях. Антибиотики и химиотерапия. 2008, 53 (3-4): 3-8.
2. ВОЗ. Вирус простого герпеса. Информационный бюллетень. Январь 2017 г. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/ru/>.
3. Кузнецова И.В., Хлыстова Е.А. Генитальный герпес: современные подходы к решению проблемы (обзор литературы). Эффективная фармакотерапия. Дерматовенерология и дерматокосметология. Спецвыпуск. 2016, 1: 30.
4. Наровлянский А.Н., Седов А.М., Пронин А.В. Лечение больных с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией генитальной локализации: клиническое исследование препарата Фортепрен®. Журн. микробиол. 2015, 4: 112-118.
5. Семенова Т.Б. Принципы лечения простого герпеса. РМЖ, 2002 (20): 924-930.
6. Халдин А.А., Игнатъев Д.В. Новый индуктор интерферона Кагоцел в терапии простого герпеса: возможности и перспективы. Эффективная фармакотерапия. Дерматология и венерология. 2011, 2: 14-18.
7. Шульженко А.Е. Герпетические инфекции человека. Перспективы диагностики и противовирусной терапии. СПб, Цитокины и воспаление. 2005, 4 (3): 76-81.
8. Шульженко А.Е., Зуйкова И.Н. Подходы к иммунотерапии рецидивирующего простого герпеса. Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии. 2010, 3: 10-15.
9. Pronin A.V., Narovlyansky A.N., Shulzhenko A.E., Sanin A.V., Sedov A.M. New polyprenyl phosphate based preparation Fortepren® as promising cytokine regulation antiviral remedy. Cytokine and Growth Factor Reviews. 2016, 30: 119-126.

Поступила 04.04.18

Контактная информация: Седов Александр Михайлович, к.б.н., 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)190-58-51

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.М.Бурмистров¹, Т.Н.Рыбалкина¹, Н.В.Каражас¹, Р.Е.Бошьян^{1,3}, П.А.Веселовский¹, М.Ю.Лысенкова¹, Е.Р.Мескина², Т.В.Сташко²

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ПОЛУГОДИЯ ЖИЗНИ

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, ²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, ³Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Цель. Оценить возможную роль герпесвирусов в патогенезе различных инфекционных заболеваний детей первого полугодия жизни, в том числе острых гастроэнтеритов, и опре-

делить, маркеры каких герпесвирусных инфекций встречаются наиболее часто. *Материалы и методы.* Были исследованы образцы биологических материалов (сыворотки крови и клетки крови, грудное молоко, моча, кал) 35 детей в возрасте от 14 дней до 5 месяцев, находящихся на лечении в МОНКИ им. М.Ф.Владимирского с диагнозами «острый инфекционный гастроэнтерит неуточненной этиологии» (n=24), «инфекция мочевыводящих путей» (n=6), «внутриутробная инфекция» (n=5), и их матерей. Для определения IgM, IgG в сыворотках крови был использован иммуноферментный анализ, для выявления общих антигенов вирусов в клетках крови, моче, грудном молоке — непрямая реакция иммунофлюоресценции, для обнаружения ранних антигенов вирусов и их репродукции — быстрый культуральный метод. *Результаты.* Инфицированность герпесвирусами была установлена у 85% детей и у 91% матерей, причем наиболее часто выявляли маркеры активных форм инфекции, вызванных вирусом простого герпеса. У детей с диагнозом «острый инфекционный гастроэнтерит неуточненной этиологии» не было выявлено возбудителей вирусных и бактериальных кишечных инфекций при большом количестве активных форм герпесвирусных инфекций как у детей, так и их матерей (33,0% и 91% случаев соответственно). Также как у матерей, так и у их детей были отмечены случаи микст-инфекций, вызванных ассоциациями герпесвирусов, наиболее часто с ВПГ. *Заключение.* Выявление активных форм герпесвирусных инфекций при отсутствии положительных результатов в исследованиях на вирусные и бактериальные кишечные инфекции дают возможность предполагать, что ГВ могут участвовать в этиологии этих заболеваний и быть причиной инфекционных осложнений при данной патологии, а также нередко выступать в роли ко-инфекции. Важное эпидемиологическое значение имеет большое количество выявленных латентных форм герпесвирусных инфекций, поскольку при воздействии неблагоприятных факторов они могут перейти в активные формы.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 87—92

Ключевые слова: герпесвирусы, инфекционный гастроэнтерит, острые кишечные инфекции, дети

E.M.Burmistrov¹, T.N.Rybalkina¹, N.V.Karazhas¹, R.E. Boshyan^{1,3}, P.A.Veselovsky¹, M.Yu.Lysenkova¹, E.R.Meskina², T.V.Stashko²

DETECTION OF HERPESVIRUS INFECTIONS IN CHILDREN OF THE FIRST SIX MONTHS OF LIFE

¹Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology; ²Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute; ³Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Aim. To evaluate a possible role of herpes viruses in the pathogenesis of various infectious diseases of children in the first six months of life, including acute gastroenteritis and identify the markers of herpesvirus infections which occur most frequently. *Materials and methods.* Samples of biological materials (blood serum and blood cells, breast milk, urine, feces) were studied in 35 children aged 14 days to 5 months who are being treated in MRRCI Vladimirsky with diagnoses of «acute infectious gastroenteritis of unspecified etiology» (n=24), «urinary tract infection» (n=6), «intrauterine infection» (n=5) and of their mothers. To determine the antibodies of IgM, IgG in serum, an enzyme immunoassay was used, to detect common antigens of viruses in blood cells, urine, breast milk — an indirect reaction of immunofluorescence, to detect early antigens of viruses and their reproduction — a rapid cultural method. *Results.* Infection with herpesviruses was found in 85% of children and 91% of mothers, with the most often identified markers of active forms of infection caused by the herpes simplex virus. In children with a diagnosis of acute infectious gastroenteritis of unspecified etiology, no pathogens of viral and bacterial intestinal infections were detected in a large number of active forms of herpesviral infections in both children and their mothers (33% and 91%, respectively). As well as mothers and their children, there have been cases of mixed infections caused by associations of herpesviruses, most often with HSV. *Conclusion.* Detection of active forms of herpesviral infections in the absence of positive results in studies on viral and bacterial intestinal infections make it possible to assume that herpesviruses can participate in the etiology of these diseases and cause infectious complications in this pathology, as well as often act as a co-infection. An important epidemiological importance has a large

number of identified latent forms of herpesvirus infections, because when exposed to adverse factors they can go into active forms.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 87—92

Key words: herpesviruses, infectious gastroenteritis, acute intestinal infections, children

ВВЕДЕНИЕ

В структуре детской заболеваемости в нашей стране и, в частности, в Московской области, инфекционная патология всегда занимала значительное место. Среди инфекционных болезней новорожденных чаще встречаются гнойно-септические заболевания, инфекции респираторного и желудочно-кишечного трактов, мочевыводящих путей, а также внутриутробные инфекции. По данным Департамента мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения Министерства здравоохранения Российской Федерации, в период с января по октябрь 2017 года в стране зарегистрировано 175 312 случаев кишечной инфекции и токсикоинфекции установленной этиологии у детей в возрасте 0-17 лет и 280 681 случаев неуточненной этиологии. Эти данные указывают на то, что проблема инфекционных заболеваний, поражающих желудочно-кишечный тракт, остается уже на протяжении многих лет всё ещё актуальной [8,9]. Новорожденные, безусловно, являются наиболее уязвимыми среди всех детей, поскольку их адаптационные механизмы ещё несовершенны и неспособны эффективно компенсировать патологические процессы в их организме, вызываемые возбудителями инфекционных заболеваний [4,7]. Наиболее опасен для новорожденных синдром дегидратации, являющийся следствием потери большого количества воды и электролитов из-за рвоты и диареи, ведущий к нарушениям кислотно-щелочного равновесия крови и других жидких сред организма ребенка. Не менее опасен синдром интоксикации и его осложнение — инфекционно-токсический шок.

На данный момент большинство этиологических агентов бактериальной (таких, как сальмонеллы, шигеллы, ишерихии), протозойной (амёбы) и вирусной (ротавирусы, норовирусы, энтеровирусы) природы достаточно хорошо изучены, проведено множество исследований на предмет наиболее эффективной диагностики и последующего лечения, а также профилактики указанных заболеваний [1,5,6]. Более 60% всех инфекционных гастроэнтеритов, в частности, у новорожденных, вызваны ротавирусами [3,6,10]. Однако до сих пор нередко случаи возникновения инфекционных гастроэнтеритов у детей, этиологию которых установить не удается. Возможность герпесвирусов вызывать данную патологию в литературе была освещена недостаточно, и внимание авторов, главным образом, было уделено поражениям желудка и гастродуоденальной зоны [2,10]. Ввиду наличия в желудочно-кишечном тракте большого количества лимфоидной ткани, представленной диффузно или в виде обособленных скоплений, таких, как пейеровы бляшки, а также принимая во внимание лимфотропность большинства ГВ, можно предполагать, что герпесвирусы могут принимать участие в патогенезе гастроэнтеритов у детей.

Цель работы — оценить возможную роль герпесвирусов в патогенезе различных инфекционных заболеваний детей первого полугодия жизни, в том числе острых гастроэнтеритов, и выявить маркеры наиболее часто встречающихся герпесвирусных инфекций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были обследованы 35 детей первого полугодия жизни возрастом от 14 дней до 5 месяцев, находившихся на лечении в МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского с направляющими диагнозами «острый инфекционный гастроэнтерит неуточненной этиологии» (n=24), «инфекция мочевыводящих путей» (n=6), «внутриутробная инфекция» (n=5), а также их матери как возможные источники инфекции. Всего были обследованы 69 человек, проживающих на территории Москвы и Московской области. Образцы биологических материалов от всех находившихся под наблюдением

Поступавший биологический материал

Пациент	Клетки крови	Сыворотка крови	Молоко	Моча	Кал
Мать	+	+	+	-	-
Ребенок	+	+	-	+	+

сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для этой цели использовали наборы реагентов фирмы «Вектор-Бест»; общих антигенов ГВ в клетках крови, моче ребенка и грудном молоке матери методом непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) с применением человеческих гипериммунных сывороток, ФИТЦ-конъюгата и красителя Эванса синего; ранних антигенов ГВ или репродукции вируса в культуре клеток быстрым культуральным методом (БКМ), для чего в культуру клеток вносили потенциально инфицированный герпесвирусами материал: клетки крови, мочу ребенка, грудное молоко матери. Для проведения БКМ были использованы клетки линии Vero для детекции ВПГ, ВЭБ и ВГЧ-6 и фибробласты человека (M-19) — для ЦМВ.

Также проводили исследования на выявление ДНК ротавирусов в кале ребенка методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и бактериологический посев кала на кишечные инфекции.

Обработку всех данных, полученных при выполнении этого исследования, проводили в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что 85% детей и 91% матерей были инфицированы тем или иным герпесвирусом (ГВ), количество инфицированных вирусом простого герпеса (ВПГ) достигало 74,0% и 91,0% соответственно. Инфекция, обусловленная вирусом герпеса человека шестого типа (ВГЧ-6), встречалась наиболее редко: в 18,0% случаев у детей и 24,0% у матерей. Самой большой группой по количеству обследованных были дети с диагнозом «острый инфекционный гастроэнтерит неуточненной этиологии» и их матери. Обследование детей в этой группе на ротавирус и кишечную группу не выявило возбудителей кишечных инфекций ни в одном случае. Результаты исследований, проведенные на герпесвирусные инфекции (ГВИ), показали, что 75,0% детей и 100% мам имели какие-либо маркеры ГВИ: изолированные или сочетанные IgM и IgG, ранние, поздние и общие антигены ГВ, репродукцию вирусов. Наиболее часто выявляли маркеры инфекции, вызванной ВПГ — у 75,0% детей и 100% матерей, реже всего — маркеры инфекции, вызванной ВГЧ-6 — у 21,0% и 22,0% соответственно. Половина обследованных матерей и четверть детей имели маркеры цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) — 52,0% и 25,0% соответственно. Маркеры Эпштейна-Барр вирусной инфекции (ВЭБИ) определяли примерно в том же соотношении — у 50,0% матерей и 23,0% детей. Следует отметить, что для каждой герпесвирусной инфекции характерно превалирование числа инфицированных матерей над детьми, от отсутствия различий в показателях при ВГЧ-6 инфекции до двукратного отличия при ЦМВИ и ВЭБИ. Большинство выявленных маркеров приходилось на инфекцию, вызванную вирусом простого герпеса, при этом в 8,3% случаев у детей и в 30,2% случаев у матерей имела место микст-инфекция, обусловленная ассоциацией ВПГ с другими герпесвирусами: у детей микст-инфекции были представлены ассоциацией ВПГ с ВЭБ и ВПГ с ВГЧ-6 (по 4,1% случаев в каждом сочетании). У матерей — по 4,3% случаев приходится на ассоциацию ВПГ с ВЭБ и ВГЧ-6, на ассоциацию ВПГ с ЦМВ и ВГЧ-6, ВПГ с ВЭБ и ЦМВ и в 17,3% случаев — ВПГ с ВЭБ.

Наибольшее значение для установления этиологии заболевания и назначения адекватного лечения представляет выявление активных форм герпесвирусных инфекций, диагностируемых на основании изолированного выявления IgM или сочетания их с IgG, а также при обнаружении возбудителя, его антигенов, репродукции вирусов в сочетании с любым классом антител. Маркеры, указывающие на активные ВПГ, ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции, были обнаружены в 33,3%, 4,1% и 4,1% случаев у детей, в 91,3%, 26,1% и 8,6% — у матерей соответственно. Установлено преобладание активных форм ВПГ, ВЭБ и ВГЧ-6

лиц были исследованы на маркеры герпесвирусных инфекций в период с июня 2016 по январь 2018 года (табл.).

Для этой цели был применен комплекс методов, направленных на выявление: IgM и IgG к герпесвирусам (ГВ) в

инфекций у матерей по сравнению с детьми ($t=3,3$; $t=2,3$; $t=2,1$ соответственно). Для цитомегаловирусной инфекции характерна несколько иная картина. Маркеры активной ЦМВИ были обнаружены практически у одинакового числа как детей, так и матерей — 8,3% и 8,6% соответственно. Следует отметить, что все активные ГВИ (ВПГИ, ВЭБИ, ЦМВИ) были диагностированы на основании обнаружения возбудителя и его антигенов в сочетании с IgG в диагностической сероконверсии (четырёхкратное превышение диагностического титра антител), а все случаи активной ВГЧ-6 инфекции были обусловлены сочетанием IgM и IgG и антигенов вируса у 8,6% матерей и 4,1% детей.

Анализ полученных результатов показал, что у значительного числа обследованных как матерей, так и их детей были обнаружены высокие титры IgG, превышающие диагностическую сероконверсию, при отсутствии каких-либо других маркеров инфекции. Это указывает на наступление стадии реконвалесценции у матерей и передаче своих защитных IgG детям. Высокие титры IgG при ВЭБИ и ЦМВИ преобладали среди мам по сравнению с детьми (47,8% и 39,1%; 25,0% и 12,5% соответственно). Для ВГЧ-6 количество реконвалесцентов среди мам и количество детей с высокими титрами антител было одинаково (13,0% и 12,5% соответственно). При ВПГИ процент детей с IgG в высоких титрах (в 4 и более раз превышающих диагностический) был в 7 раз выше, чем процент у матерей (29,1% и 4,3%).

Помимо активных форм и стадии реконвалесценции, у детей и матерей из обследованной группы были обнаружены латентные формы ГВИ, диагностируемые на основании выявления IgG в диагностическом титре, но не превышающем диагностическую сероконверсию, при отсутствии каких-либо других маркеров инфекций. Наши исследования показали, что в отношении каждого возбудителя были выявлены латентные инфекции: ВПГИ — у 12,5% детей и 4,3% матерей, ЦМВИ — у 16,6% детей и 4,3% матерей. Латентные формы ВЭБИ и ВГЧИ-6 были обнаружены только у детей в 4,1% случаев для каждой инфекции.

Проведенные исследования показали высокий уровень инфицирования герпесвирусами как среди матерей, так и их детей во всех обследованных группах, что укладывается в понимание широкого и повсеместного распространения этих вирусов в человеческой популяции. Необходимо подчеркнуть, что инфицирование ГВ происходит в очень раннем возрасте, что нашло подтверждение в наших исследованиях, так как возраст обследованных детей не превышал полугод. Следует отметить, что нельзя исключать вертикальный путь передачи герпесвирусов, принимая во внимание тот факт, что часть детей (14,3%) поступали в МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского с подозрением на внутриутробную инфекцию, что нашло подтверждение в лабораторных исследованиях.

Обследование детей с острыми инфекционными гастроэнтеритами показало отсутствие положительных результатов в исследованиях на вирусные и бактериальные кишечные инфекции при выявлении активных форм ГВИ. Основываясь на полученных данных, мы можем говорить о возможном участии ГВ в этиологии этих заболеваний, которые могут быть причиной инфекционных осложнений при данной патологии, а также нередко выступать в роли ко-инфекции. В свою очередь, обнаружение маркеров активных ГВИ у матерей этих детей указывает на них как на возможные источники инфекций. При этом все случаи активных ВПГИ, ВЭБИ и ЦМВИ у детей были установлены на основании выявления диагностических титров IgG, сочетающихся с обнаружением ранних и общих антигенов в клетках крови, а также с репродукцией вируса в культуре клеток. Отсутствие IgM может быть связано с ещё незрелым иммунитетом новорожденных.

Следует отметить, что при всех герпесвирусных инфекциях, кроме ЦМВИ, установлено преобладание числа активных форм заболеваний у матерей по сравнению с детьми. Выявленные различия свидетельствуют о том, что часть детей остались неинфицированными герпесвирусами, а это требует незамедлительного проведения не только лечебных мероприятий в отношении мам, но и профилактических и противозидемических во избежание заражения детей.

Выявленные случаи латентного течения герпесвирусных инфекций имеют эпидемиологическое значение, так как под воздействием различных неблагоприятных

факторов они могут перейти в активные формы. Необходимо отметить, что для ВПГИ и ЦМВИ характерно преобладание случаев латентной инфекции среди детей по сравнению с матерями в 3 и в 4 раза соответственно. Латентно протекающие ВЭБ и ВГЧ-6 инфекции имели место только среди детей в 4,1% случаев. Важно учесть, что дети с латентными формами ГВИ имели только IgG в титре выше диагностического, но не превышающем диагностическую сероконверсию. При этом какие-либо другие маркеры герпесвирусных инфекций отсутствовали в исследуемых образцах биоматериалов от детей (ранние и общие антигены ГВ), что свидетельствовало лишь о наличии у них материнских антител. В свою очередь, можно говорить о том, что у этих детей этиология гастроэнтеритов по-прежнему не установлена и требует дальнейшего поиска инфекционного агента, вызвавшего это заболевание.

ЛИТЕРАТУРА

1. Еременко С. А. Ротавирусные гастроэнтериты: особенности клинического течения в зависимости от наличия микст-инфекции. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. 2013, 3 (43):124-129.
2. Ибрагимов М.Х., Нурмурадова Т.А., Мавланов К.Х., Чарыева В.Р. Вирусные поражения гастродуоденальной зоны у детей Туркменистана. ЭиКГ. 2015, 117:90.
3. Кудрявцев В.В., Миндлина А. Я., Герасимов А. Н., Груничева Т. П., Каира А. Н., Брико Н. И. Распространенность и основные проявления заболеваемости ротавирусной инфекцией в различных регионах мира. ПФ. 2013, 4:38-44.
4. Маянский Н.А., Маянский А.Н., Куличенко Т.В. Ротавирусная инфекция: эпидемиология, патология, вакцинопрофилактика. Вестник РАМН. 2015, 1:47-54.
5. Пронько Н.В., Лелюкевич И.М., Талатай Е.Г. Характеристика ротавирусной, аденовирусной и энтеровирусной диарей у детей по данным госпитализации в инфекционном стационаре (2006-2010 гг.). Журнал ГрГМУ. 2011, 3 (35): 44-47.
6. Скрипченко Н.В., Матюнина Н.В., Команцев В.Н., Иванова Г.П., Мурина Е.А., Иванова М.В., Вильниц А.А., Горелик Е.Ю., Пульман Н.Ф. Энтеровирусные инфекции и их значение в патологии человека. Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. 2013, 2:613-615.
7. Сурков А.Н. Тактика лечения острых кишечных инфекций у детей. ВСП. 2011, 6:141-147.
8. Тихомирова О.В., Бехтерева М.К., Раздьяконова И.В., Ныркова О.И. Вирусные диареи у детей: особенности клинической картины и тактика диетической коррекции. ВСП. 2009, 1:98-103.
9. Усенко Д.В., Плоскирева А. А., Горелов А.В. Острые кишечные инфекции у детей в практике педиатра: возможности диагностики и терапии. ВСП. 2014, 3:12-16.
10. Ярославцева Н.Г., Грумбкова Л.О., Тихомиров Д.С., Игнатова Е.Н., Романова Т.Ю., Гаранжа Т.А., Туполева Т.А., Филатов Ф.П. ПЦР-маркеры вирусных инфекций при хроническом гастрите у детей. Клиническая лабораторная диагностика. 2014, 6:54-58.

Поступила 04.04.18

Контактная информация: Бурмистров Егор Михайлович, к.б.н., 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)193-43-91

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Ю.С.Шишкова, М.С.Бабикова, А.С.Емелина, О.И.Филимонова, Д.А.Тезиков, И.И.Долгушин

МИКРОФЛОРА ПОЛОСТИ РТА И СОСТОЯНИЕ ФАКТОРОВ ПРОТИВОИНФЕКЦИОННОЙ ЗАЩИТЫ У ЛИЦ, ИСПОЛЬЗУЮЩИХ СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ОРТОПЕДИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ (СОК)

Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск

Цель. Изучить качественный состав, количественное содержание микроорганизмов, оценить жизнеспособность и функциональный статус нейтрофилов в ротовой жидкости пациентов, использующих съемные и несъемные СОК. *Материалы и ме-*

тоды. В настоящем исследовании использовалась свободная ротовая жидкость 100 пациентов в возрасте от 21 до 79 лет. Определение качественного и количественного состава микрофлоры проводилось методом ПЦР с помощью системы «Фемофлор-16» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия). Определение общего числа лейкоцитов проводили в камере Горяева, анализ их жизнеспособности осуществляли при окраске трипановым синим, для исследования показателей лизосомальной активности нейтрофилов использовали акридиновый оранжевый, кислородзависимый метаболизм изучали с помощью НСТ-теста, фагоцитарную функцию определяли по поглощению частиц латекса. *Результаты.* У лиц, использующих зубные протезы, изменяется качественный и количественный состав микрофлоры полости рта. Способ гигиенического ухода за СОК значимым образом не влияет на состав микрофлоры ротовой жидкости пациентов. У лиц, использующих СОК, установлено снижение общего количества лейкоцитов и их жизнеспособных форм в свободной ротовой жидкости, при этом отмечена стабильность функционирования жизнеспособных нейтрофилов у пациентов со съемными СОК и значительное снижение фагоцитарной способности и микробицидного кислородзависимого потенциала нейтрофилов при применении несъемных СОК. *Заключение.* Инородное тело в виде съемной или несъемной СОК изменяет функционирование факторов врожденной противоинойфекционной защиты слизистой оболочки полости рта, что может стать причиной развития инфекционных осложнений при протезировании.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 92—98

Ключевые слова: ротовая жидкость, микрофлора, врожденный противоинойфекционный иммунитет, стоматологическая ортопедическая конструкция

Yu.S.Shishkova, M.S.Babikova, A.S.Emelina, O.I.Filimonova, D.A.Tezikov, I.I.Dolgushin

MICROFLORA OF THE ORAL CAVITY AND CONDITION OF ANTI-INFECTIVE PROTECTION FACTORS IN PERSONS USING DENTAL ORTHOPEDIC CONSTRUCTIONS (DOC)

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Aim. To study the qualitative composition, the quantitative content of microorganisms, to assess the viability and functional status of neutrophils in the oral fluid of patients using removable and non-removable DOC. *Materials and methods.* The present study used a free oral fluid of 100 patients aged 21 to 79 years. The qualitative and quantitative composition of the microflora was determined using the PCR method by means of the Femoflor-16 system (NPO DNA-technology, Russia). Determination of the total number of leukocytes was carried out in Goryaev's chamber, analysis of their viability was carried out with Trypan blue staining. Acridine orange was used to study the indices of lysosomal activity of neutrophils. Oxygen-dependent metabolism was studied using the Nitro Blue-Tetrazolium (NBT) test, and the phagocytic function was determined by the absorption of latex particles. *Results.* In persons using dentures, the qualitative and quantitative composition of the microflora of the oral cavity changes. The method of hygienic care of the DOC significantly does not affect the composition of the microflora of the oral fluid of patients. In persons using DOC, a decrease in the total number of leukocytes and their viable forms in the free oral fluid was established. However we registered the stability of functioning of viable neutrophils in patients with removable DOC and a significant decrease in the phagocytic ability and microbicidal oxygen-dependent potential of neutrophils when using non-removable DOC. *Conclusion.* Foreign body in the form of a removable or non-removable DOC changes the functioning of the factors of congenital anti-infective protection of the oral mucosa, which can lead to the development of infectious complications during dental prosthetics.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 92—98

Key words: oral fluid, microflora, congenital anti-infective immunity, dental orthopedic construction

ВВЕДЕНИЕ

Ортопедическое лечение больных при полном и частичном отсутствии зубов занимает ведущее место в современной стоматологической практике [9]. Для замещения дефектных зубных рядов достаточно широко применяются съемные протезы [17]. При частичной адентии наиболее распространенным видом ортопедического лечения является использование несъемных зубных протезов [12]. Ввиду наличия в полости рта ортопедических конструкций изменяются микробные соотношения и иммунологические показатели ротовой жидкости [4, 18, 21]. Степень данных изменений может существенно варьировать от вида ортопедической конструкции и материала, используемого в качестве основы [1, 20]. Несмотря на это, нарушение состава нормальной микрофлоры полости рта, приводящее к активации пародонтопатогенной микрофлоры и развитию воспалительных заболеваний, регистрируется у лиц, использующих как съемное, так и несъемное стоматологическое протезирование [2, 16, 22]. В связи с чем, основной мерой профилактики инфекционных осложнений остается проведение тщательного гигиенического ухода за ортопедическими конструкциями [17, 19]. Это и предопределило цель — изучить качественный состав, количественное содержание микроорганизмов, оценить жизнеспособность и функциональный статус нейтрофилов в ротовой жидкости пациентов, использующих ССОК и НСОК, в зависимости от вида ортопедической конструкции и способа ее гигиенической очистки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленной задачи было обследовано 2 группы лиц, использующих ССОК и НСОК и 2 группы лиц с интактными зубными рядами (контроль), сопоставимые по возрасту. Средний возраст обследованных в группе лиц, использующих съемные протезы ($n=25$), составил $58,52 \pm 4,62$ лет, в группе контроля ($n=25$) — $61,16 \pm 4,084$ лет, в группе лиц, использующих НСОК ($n=25$) — $38,04 \pm 5,037$ лет и в группе контроля ($n=10$) — $34,7 \pm 4,58$ лет. Дополнительно в ходе исследования при определении иммунологических показателей была увеличена группа контроля для лиц, использующих несъемное протезирование, до 25 человек, средний возраст которых составил $37,64 \pm 1,72$.

Съемные ортопедические конструкции были изготовлены с применением акриловой пластмассы горячей полимеризации, представленной у 68% лиц пластмассой «Фторакс» и у 32% — «Vertex». Основой металлического каркаса для несъемных ортопедических конструкций у 84% лиц являлся кобальт-хромовый сплав с облицовкой керамикой «Duceram plus», у 8% лиц — диоксид циркония с керамикой «Lava» и у 8% лиц протез был представлен только кобальт-хромовым сплавом. Гигиенический уход за съемными протезами у 56% лиц осуществлялся ополаскиванием водой и чистой щеткой с косметическим мылом, а в 44% — чистой щеткой с зубной пастой. У 100% лиц, использующих несъемное протезирование, гигиеническая очистка протезов проводилась специализированной щеткой и зубной пастой.

В день проведения исследования ротовая жидкость забиралась без стимуляции натошак путем сплевывания в пробирку типа Эппендорф, содержащую 1 мл стерильного физиологического раствора. С учетом полученного объема ротовой жидкости проводили ее разведение 1:10 в стерильном физиологическом растворе. Для обнаружения трудно культивируемой анаэробной флоры нами применялся метод полимеразной цепной реакции с помощью тест-систем «Фемофлор-16» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия). Детекцию полученных результатов осуществляли с использованием амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва, Россия). Данная медицинская технология позволяет оценить качественный и количественный состав микрофлоры любого происхождения, в которой могут присутствовать аэробные, факультативно-анаэробные и строгие анаэробные микроорганизмы [13].

Определение общего числа лейкоцитов в ротовой жидкости и анализ их жизнеспособности проводили окраской материала красителем трипановым синим, окончательный подсчет осуществляли в камере Горяева [3]. Изучение показателей лизосомальной активности нейтрофилов выполняли с помощью окрашивания нативного препарата акридиновым оранжевым. После 30-минутной инкубации при

37°C препарат размещали на предметном стекле, накрывали покровным стеклом и изучали под иммерсией в потоке сине-фиолетового света люминесцентного микроскопа «Люмам», далее проводили подсчет числа нейтрофилов (в %), содержащих лизосомальные гранулы [3].

Оценку кислород-зависимой микробоцидности нейтрофилов свободной ротовой жидкости проводили с помощью НСТ-теста в модификации А.Н. Маянского и М.К. Виксмана (1979) [8, 10]. При учете реакции определяли процент НСТ-позитивных клеток и учитывали интенсивность реакции по формуле: Интенсивность НСТ = $A*3 + B*2 + C*1 / 100$, где А, В, С — число клеток соответственно с отложением диформаза, превышающим размеры ядра, занимающим более 1/3 площади цитоплазмы и менее 1/3 площади соответственно [3].

Исследование фагоцитарной функции нейтрофилов свободной ротовой жидкости оценивали по способности поглощать частицы латекса по методу Фрейдлин [15]. При анализе фагоцитоза рассчитывали активность, интенсивность фагоцитоза и фагоцитарное число. Активность фагоцитоза вычислялась как число нейтрофилов, содержащих латексные частицы, на 100 подсчитанных клеток. Интенсивность фагоцитоза определялась числом частиц латекса на 100 клеток в пересчете на 1 клетку. Фагоцитарное число высчитывалось по формуле: $X = \text{Интенсивность фагоцитоза} * 100 / \text{Активность фагоцитоза}$ [3].

Статистическую обработку данных проводили методом описательной статистики и выборочных сравнений пакетами Statistica (v. 8.0, StatSoftInc.) и MedCalc (v. 10.1, MedCalc®). Встречаемость микроорганизмов выражали в виде относительной (в %) частоты. Для определения концентрации микроорганизмов и оценки иммунологических показателей рассчитали медиану и квартили десятичного логарифма концентрации. Сравнения концентраций в независимых выборках проводили с помощью U-критерия Манна—Уитни (2 группы) и H-критерия Краскела—Уоллиса (3 группы). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных исследований нами было определено, что у лиц, использующих ССОК, несмотря на стабильное видовое разнообразие достоверно увеличивается содержание микроорганизмов сем. Enterobacteriaceae, Streptococcus spp., Lactobacillus spp., Prevotella bivia, Porphyromonas spp., Lachnobacterium spp., Clostridium spp., Peptostreptococcus spp. и Candida spp. При применении НСОК зарегистрировано достоверное снижение высеваемости Lactobacillus spp., Streptococcus spp. и Atopobium vaginae, что приводит к уменьшению видового многообразия микрофлоры полости рта, способствуя активному размножению оставшейся флоры микробного спектра, в т.ч. Staphylococcus spp., Candida spp. Таким образом, у лиц, использующих СОК, изменяется качественный и количественный состав микрофлоры полости рта.

Полученные данные подтверждают результаты исследований Ю.У. Эргашева, Э.С. Каливрадзияна, С.Е. Жолудева, что у лиц, использующих съемные зубные протезы в сравнении с нормой до протезирования, наблюдается значительное увеличение количества представителей в ротовой жидкости семейства энтеробактерий, стрептококков, лактобацилл и пародонтопатогенных видов микроорганизмов [7, 22]. В связи с тем, что у лиц, использующих несъемные зубные протезы, в отличие от лиц, использующих съемные зубные протезы, наблюдается меньше частота встречаемости выше перечисленных микроорганизмов, то можно предположить, что это связано с избирательной способностью микроорганизмов к адгезии на материалах, используемых для изготовления ортопедических конструкций. Тем более, что результаты исследований В.Н. Царева, С.Д. Арутюнова подтверждают тот факт, что особенно выраженная колонизация микроорганизмов наблюдается на съемных пластмассовых протезах, чем на несъемных протезах из металлокерамики [1, 19].

В продолжение исследования нами было установлено, что в ротовой жидкости у лиц, использующих съемное протезирование и в качестве способа гигиенической очистки ополаскивание проточной водой и чистку щеткой с мылом у всех регистрировались

среди факультативно-анаэробной микрофлоры *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp., *Leptotrichia* spp., *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp., *Veillonella* spp., *Dialister* spp. и среди облигатно-анаэробной микрофлоры сем. Enterobacteriaceae, Streptococcus spp. У лиц, использующих в качестве способа гигиенической очистки чистку щеткой с зубной пастой, данные представители микрофлоры находились в диапазоне от 90,9% до 100%. При применении несъемного вида протезирования выше перечисленные микроорганизмы регистрировались в пределах 88% — 96%. При этом у лиц, использующих в качестве способа гигиенической очистки ополаскивание проточной водой и чистку щеткой с мылом, в сравнении с лицами, использующими в качестве способа гигиенической очистки чистку щеткой с зубной пастой, чаще выявлялись такие микроорганизмы, как *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. и *Atorobium vaginae*, но без достоверных отличий. В связи с чем, можно заключить, что способ гигиенического ухода за стоматологической ортопедической конструкцией значимым образом не влияет на состав микрофлоры ротовой жидкости пациентов.

По результатам проведенных иммунологических исследований было показано, что в ротовой жидкости у лиц, использующих съемное и несъемное протезирование, в сравнении с сопоставимыми по возрасту контрольными группами общее количество лейкоцитов и число их жизнеспособных форм достоверно ниже. При этом показатель лизосомальной активности нейтрофилов не имел выраженных различий между сравниваемыми группами. При определении кислород-зависимой микробицидности и фагоцитарной способности нейтрофилов свободной ротовой жидкости полученные данные в результате исследования не имели значительных отличий с контрольной группой у лиц, использующих ССОК. При этом у лиц, использующих НСОК, показатель НСТ-теста и фагоцитоза нейтрофилов свободной ротовой жидкости был достоверно ниже, чем в группе сравнения (табл.). Таким образом, у лиц, использующих СОК, установлено снижение общего количества лейкоцитов и их жизнеспособных форм, при этом отмечена стабильность функционирования жизнеспособных нейтрофилов в свободной ротовой жидкости у пациентов с ССОК и

Показатели состояния факторов противoinфекционной защиты у лиц, использующих СОК

Показатель (1)	Лица, использующие ССОК (2)	Лица с интактными зубными рядами (3)	Лица, использующие НСОК (4)	Лица с интактными зубными рядами (5)
Общее число лейкоцитов, $\times 10^9$ кл/л	10,30 (7,10 — 14,60)	27,40 (8,10 — 41,80) p₂₋₃=0,002	6,80 (5,70 — 8,60)	21,80 (8,10 — 41,80) p₄₋₅=0,00007
Жизнеспособность лейкоцитов, $\times 10^9$ кл/л	4,40 (3,00 — 6,30)	12,7 (2,90 — 19,95) p₂₋₃=0,014	2,59 (2,10 — 3,97)	8,90 (2,25 — 18,70) p₄₋₅=0,007
Лизосомальная активность	11,00 (9,00 — 12,00)	8,00 (5,00 — 15,00)	8,00 (6,00 — 11,00)	8,00 (5,00 — 14,00)
НСТ спонтанный	Активность, % (2,00 — 22,00)	8,00 (4,00 — 22,00)	4,00 (2,00 — 8,00)	14,00 (4,00 — 22,00) p₄₋₅=0,005
	Интенсивность, усл.ед (0,02 — 0,24)	0,16 (0,04 — 0,26)	0,04 (0,02 — 0,08)	0,16 (0,04 — 0,26) p₄₋₅=0,001
НСТ индуцированный	Активность, % (4,0 — 30,0)	16,00 (6,00 — 28,0)	10,0 (5,00 — 12,00)	16,00 (6,00 — 28,0) p₄₋₅=0,011
	Интенсивность, усл.ед (0,04 — 0,38)	0,24 (0,06 — 0,32)	0,1 (0,05 — 0,14)	0,20 (0,06 — 0,32) p₄₋₅=0,006
Фагоцитоз	Активность, % (41,0 — 52,0)	46,00 (33,0 — 52,0)	38,00 (31,0 — 41,0)	46,00 (32,0 — 52,0) p₄₋₅=0,032
	Интенсивность, усл.ед (0,92 — 1,40)	1,29 (0,84 — 1,61)	0,79 (0,65 — 0,94)	1,29 (0,73 — 1,61) p₄₋₅=0,004
Фагоцитарное число, усл. ед.	2,40 (2,10 — 2,60)	2,70 (2,35 — 3,10)	2,30 (2,20 — 2,70)	2,70 (2,35 — 3,10)

Примечание. Результаты выражались медианой и 25 и 75 квартилями.

значительное снижение фагоцитарной функции и микробицидного кислородзависимого потенциала нейтрофилов при применении НСОК.

Проведенный анализ литературы по данной тематике тоже показал, что у лиц, использующих СОК, регистрируются изменения иммунологических показателей, в частности, понижается уровень противовоспалительных факторов, таких как интерлейкин-10, секреторный ингибитор протеиназы лейкоцитов, лизоцим, и повышается уровень медиаторов воспаления (интерлейкин-8, интерлейкин-1 β), что может приводить к увеличению количества микроорганизмов в ротовой жидкости и, как следствие, к развитию воспалительных заболеваний [4, 18, 21].

Таким образом, инородное тело в виде ССОК или НСОК изменяет функционирование факторов врожденной противoinфекционной защиты слизистой оболочки полости рта, что может стать причиной развития инфекционных осложнений при протезировании. Мерой предотвращения данных осложнений может выступать повышение качества гигиенического ухода за СОК [5 — 7]. В настоящее время разработано большое количество способов гигиенической очистки СОК, основанных на химических (антисептические растворы и таблетки) и физических (механическая очистка зубной щеткой, ультразвуковое и сверхвысокочастотное воздействие) реакциях [11, 13]. При этом, большинство из них не оказывают полностью должного антимикробного эффекта, некоторые способы являются трудоемкими и сложными в своем применении [7, 15], поэтому до сих пор проблема профилактики инфекционных осложнений при использовании СОК остается актуальной, и поиск нового профилактического решения продолжается [4, 13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнов С.Д., Ибрагимов Т.И., Царев В.Н. и др. Микробиологическое обоснование выбора базисной пластмассы съемных зубных протезов. *Стоматология*. 2000, 3: 4-8.
2. Гожая Л.Д. Заболевания слизистой оболочки полости рта, обусловленные материалами зубных протезов (этиология, патогенез, диагностика, лечение, профилактика). Дис. докт. мед. наук. М., 2008.
3. Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М., Издательство РАМН, 2009.
4. Емелина А.С. Клинико-иммунологическое обоснование применения аутоплазмы в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта у пациентов с несъемными ортопедическими конструкциями. Дис. канд. мед. наук. Челябинск, 2017.
5. Жолудев С.Е., Маренкова О.С., Тарико А.В. и др. Влияние средств гигиены на микробный состав полости рта у пациентов с пародонтитом средней тяжести, пользующихся комбинированными шинирующими конструкциями. *Уральский медицинский журнал*. 2008, 10: 116-119.
6. Жолудев С.Е., Маренкова М.Л. Применение антисептических растворимых таблеток для ухода за полными съемными пластиночными протезами. *Пародонтология*. 2004, 2 (31): 82-88.
7. Каливрадзян Э.С., Голубева Л.Н., Голубев Л.Н. и др. Клинико-лабораторная оценка гигиенической и микробиологической эффективности раствора для очищения и дезинфекции съемных пластиночных протезов. *Вестник новых медицинских технологий* 2013. <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/00.html>.
8. Карпищенко А.И. Медицинские и лабораторные технологии. Санкт-Петербург, Интермедика, 1998.
9. Клемин В.А., Ворожко А.А. Современное состояние вопроса выбора материала для ортопедического лечения больных, нуждающихся в съемном протезировании. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2015, 1: 41-46.
10. Маянский А.Н., Виксман М.К. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: метод. рекомендации. Казань, 1979.
11. Пономарева Н.А. Эффективность применения фитосодержащих средств для ухода за полостью рта и съемными зубными протезами у лиц пожилого и старческого возраста. Дис. канд. мед. наук. М., 2008.
12. Семенюк В.М., Жеребцов В.В., Жеребцова О.Е. Состояние органов, тканей и сред полости рта у лиц, пользующихся длительно несъемными зубными протезами. *Институт стоматологии*. 2008, 2(39): 48-51.

13. Тезиков Д.А. Оптимизация гигиенического ухода за съёмными ортопедическими конструкциями на основе изучения влияния ультрафиолетового облучения на микрофлору съёмных зубных протезов. Дис. канд. мед. наук. Челябинск, 2014.
14. Третьякова И.Е. Регуляторная функция нейтрофилов в норме и в условиях механической травмы. Дис. канд. мед. наук. Челябинск, 1991.
15. Узбеков Р.М. Микроволновая дезинфекция эластичных вспомогательных и конструкционных материалов в клинике ортопедической стоматологии. Дис. канд. мед. наук. М., 2008.
16. Филимонова О.И., Емелина А.С. Изучение клинической эффективности при включении в комплексное лечение воспалительных заболеваний пародонта плазмотерапии у пациентов с несъёмными зубными протезами. Проблемы стоматологии. 2016, 2: 65-69.
17. Филимонова О.И., Шишкова Ю.С., Липская А.Д. и др. Поиск оптимального метода гигиенического ухода за съёмными зубными протезами. Уральский медицинский журнал. 2013, 5 (110): 81-83.
18. Хасанова Д.М., Липская А.Д., Емелина А.С. Содержание секреторного ингибитора протеиназы лейкоцитов в слюне у лиц, использующих стоматологические ортопедические конструкции. Российский иммунологический журнал. 2014, 8(3;17): 469-471.
19. Царев В.Н., Абакаров С.И., Умарова С.Э. Динамика колонизации микробной флорой полости рта различных материалов, используемых для зубного протезирования. Стоматология. 2008, 1: 55-57.
20. Шишкова Ю.С., Бабикова М.С. Сравнительный анализ микрофлоры слюны у лиц, использующих съёмные и несъёмные стоматологические ортопедические конструкции, с учетом возраста обследуемых и материала, применяемого в качестве основы для протеза и импланта. Человек. Спорт. Медицина. 2015, 15(1): 59-63.
21. Шишкова Ю.С., Филимонова О.И., Емелина А.С. Изучение содержания интерлейкина-1β в слюне у пациентов с несъёмными зубными протезами. Известия Самарского научного центра РАН. 2014, 16(5;4): 1251-1253.
22. Эргашев Ю. У. Гигиеническая оценка влияния зубных протезов на состояние полости рта. Дис. канд. мед. наук. Иркутск, 2002.

Поступила 04.04.18

Контактная информация: Бабикова Марина Сергеевна, 454048, Челябинск, ул. Блюхера, 42, р.т. (351)729-22-49

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.Л.Савлевич¹, М.А.Иванова², М.А.Мокроносова³, С.А.Горбунов¹, А.П.Якушенкова⁴

СЕЗОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА НЕБНЫХ МИНДАЛИН У ЗДОРОВЫХ СТУДЕНТОВ

¹Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента, ²Центр нейрокоммуникативных исследований управления научной деятельности Гос. ИРЯ им. А.С.Пушкина, ³НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ⁴Клиническая больница Управления делами Президента, Москва

Цель. Характеристика микропейзажа небных миндалин у здоровых студентов в зависимости от времени года. *Материалы и методы.* Обследованы 40 студентов без патологии ротоглотки в возрасте 17-30 лет ($23 \pm 3,5$) при отсутствии хронического тонзиллита при фарингоскопии, признаков острой респираторной инфекции, приема антибиотиков в течение 1 месяца до проведения исследования и перенесенной ангины в анамнезе в течение последних 5 лет. Обследование проводилось трехкратно, раз в сезон:

осенью с 16.10 по 02.11, зимой с 27.01 по 06.03, весной с 02.04 по 19.04. *Результаты.* Для нормального микрорейзажа здоровых лиц в возрасте 17-30 лет характерно присутствие *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Neisseria*, *Micrococcus*, *Bacillus* и *Pseudomonas aeruginosa* как постоянных представителей. Присутствие *S. pyogenes* и *P. aeruginosa* в структуре микрорейзажа небных миндалин не сопровождалось какими-либо клиническими симптомами со стороны их носителей. Существует сезонная динамика увеличения частоты встречаемости условно патогенной флоры на небных миндалинах в весенний период и снижение роста всех микроорганизмов зимой.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 98—103

Ключевые слова: хронический тонзиллит, микрофлора, небные миндалины, носительство, сезонность

*E.L.Savlevich*¹, *M.A.Ivanova*², *M.A.Mokronosova*³, *S.A.Gorbunov*¹, *A.P.Yakushenkova*⁴

SEASONAL FEATURES OF THE MICROBIAL LANDSCAPE OF PALATINE TONSILS IN HEALTHY STUDENTS

¹Central State Medical Academy of Department for Presidential Affairs, ²Centre of Neuro-Communicative Research State Russian Language Institute, ³Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ⁴Clinical Hospital of Department for Presidential Affairs, Moscow, Russia

Aim. To find out microbial landscape characteristics of the palatine tonsils in healthy students, depending on the season. *Materials and methods.* It were examined 40 students without any oropharyngeal pathology aged 17-30 (23 ± 3.5). There were no signs of chronic tonsillitis at pharyngoscopy, no signs of acute respiratory infection; they did not take antibiotics for one last month prior to the study and had no tonsilitis for the last 5 years. Examination was made three times, once in a season: autumn from October 16 till November 2; winter from January 27 till March 6; spring from April 2 till April 19. *Results.* The normal microlandscape in healthy individuals aged 17-30 years permanently had *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Neisseria*, *Micrococcus*, *Bacillus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Presence of *S. pyogenes* and *P. aeruginosa* in the structure of microlandscape of the palatine tonsils did not cause any clinical symptoms in their carriers. We also revealed a seasonal dynamics expressed by the frequency of the increase of conditionally pathogenic flora on palatine tonsils in spring and the decrease in all microorganisms growth in winter.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 98—103

Key words: chronic tonsillitis, microflora, palatine tonsils, carriage, seasonality

На тему хронического тонзиллита (ХТ) в последнее время ведутся интенсивные дискуссии на конференциях и съездах оториноларингологов различного уровня в связи с необходимостью формирования новых подходов к диагностике и лечению этого заболевания. В связи с тем, что для установления диагноза ХТ в клинической практике чаще всего используются субъективные критерии (например, казеозные пробки в лакунах небных миндалин, гиперемия и отёчность передней небной дужки и т.д.), большинство из которых в настоящий момент оспариваются на предмет возможных проявлений других заболеваний, например, ларингофарингеального рефлюкса (ЛФР), современные эпидемиологические исследования по распространенности ХТ в России отсутствуют [2]. Открытым остается вопрос о лечении ХТ и целесообразности удаления небных миндалин. Windfuhr J.P. на основании принципов доказательной медицины выполнил критический анализ различных показаний к тонзиллэктомии, где сделал вывод, что чрезмерный радикализм по отношению к небным миндалинам в большинстве случаев не оправдан и рекомендовал сократить рекомендации к оперативному лечению [16]. Популярный в нашей стране метод определения антител к стрептолизину О (АСЛО) также является малоинформативным и невалидным для определения тактики лечения ХТ [6]. Также нет однозначного мнения о роли различных

микроорганизмов в поддержании персистирующего воспалительного процесса в небных миндалинах. Согласно мнению ряда исследователей, небные миндалины как в норме, так и при хроническом тонзиллите могут быть носителями разнообразной, в том числе патогенной, флоры, а данные бактериологических исследований не имеют конкретного значения при диагностике хронического тонзиллита [3, 4].

Взаимоотношения микробиома и человека является сложным процессом. Количественное выделение различных микробных колоний часто является бессимптомным носительством и не является показанием к проведению лечебных мероприятий. Микробный пейзаж небных миндалин при ХТ отличается большим многообразием, наряду с патогенной флорой выявляются условно патогенные и сапрофитные виды микроорганизмов. По данным культурального исследования 668 пациентов с ХТ Енина И.П. и др. бета-гемолитический стрептококк (БГСА) выявлен в 53%, *Mycoplasma pneumoniae* в 24,5%, *S. aureus* в 26,8%, чаще всего в ассоциациях с микоплазмами [1]. В Казахстане при исследовании 189 детей и взрослых с ХТ у 140 пациентов лидирующее место занял *S. aureus* в 33%, часто в ассоциациях с *S. albicans*. При этом высеивалось 18 видов различных микроорганизмов [7]. Большой интерес представляют сравнительные бактериологические исследования между группами здоровых людей и при патологии миндалин. В Москве были выполнены культуральные исследования микрофлоры задней стенки глотки относительно здоровых детей, пациентов с ангиной, инфекционным мононуклеозом, ОРВИ и пневмонией. Во всех группах лидирующей микрофлорой были альфа-гемолитические стрептококки и нейссерии, при этом максимальное их количество присутствовало в группе здоровых. На третьем месте во всех группах по частоте встречаемости был *S. aureus* [8]. В Турции при перспективном исследовании удаленных небных миндалин у 111 пациентов было выявлено 604 бактериальных штамма. Наиболее распространены были коагулазо-отрицательные стафилококки, альфа-гемолитические стрептококки и дифтероиды. Не было получено достоверной разницы в микрофлоре в зависимости от возраста и степени гипертрофии миндалин [11].

Микробный состав слизистой оболочки миндалин относительно постоянен, независимо от состояния здоровья, по сравнению с полостью носа. Нормальная флора преобладает и сохраняется в течение длительного периода у здоровых людей, тогда как у лиц после острого тонзиллита оппортунистические штаммы с высокой активностью увеличивают патогенное воздействие в течение длительного времени [Soboleva I. et al., 2012]. Van Staaij V. et al. сравнивали микрофлору с поверхности миндалин у группы здоровых и пациентов с ХТ. Выявлено, что потенциальные респираторные патогены присутствуют у 54% пациентов с ХТ и у 41% здоровых. *Haemophilus influenzae* обнаруживали у 41% больных и 34% здоровых детей. *Moraxella catarrhalis* встречался в 7% случаев больных с ХТ и отсутствовал у здоровых. *H. influenzae* обнаруживался у 32% детей с ХТ и 48% детей с симптомами тонзиллярной гипертрофии. Автор предположил, что вариации микробной флоры не играют существенной роли в предрасположенности к заболеваниям миндалин [13]. Согласно проведенному Vista M. et al. исследованию, наиболее часто высеивающимися бактериями при остром тонзиллите являются *S. viridans*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* и БГСА. Тот же результат показали и посева с миндалин, не пораженных тонзиллитом [9]. По данным Swidsinski A. et al. предшествующие курсы антибиотикотерапии не позволяют избавиться от патогенных штаммов с поверхности небных миндалин [15]. При сравнении микрофлоры с поверхности миндалин у пациентов с рецидивирующим тонзиллофарингитом и пациентов с синдромом обструктивного апноэ сна не выявлено значимой разницы в составе микрофлоры как со стороны аэробов, так и анаэробов [14]. В исследовании Kuhn J. et al. концентрация *S. aureus* и *H. influenzae* была выше обнаружена в гипертрофированных миндалинах по сравнению с хроническим тонзиллитом [12]. При сравнении микрофлоры с поверхности и глубины небных миндалин и аденоидной ткани у пациентов с ХТ выявлено, что наиболее частыми видами аэробных микроорганизмов являются *S. viridans* и *Neisseria* spp. Число поверхностных аэробных микроорганизмов из аденоидной ткани значительно превышает число микробов из глубоких структур. Количество микробов из глубоких структур

было одинаковым в небных миндалинах и аденоидах [10]. Сравнение микрофлоры с поверхности и лакун небных миндалин у пациентов с ХТ и здоровых показало видовую идентичность высеваемой микрофлоры, однако разница присутствует в количественном составе. По мнению Н.А. Рыбак, острый инфекционный процесс в миндалинах (ангина) стартует и реализуется за счет моноинфекции, а прогредиентный патологический процесс формируется в результате постоянной контаминации миндалин ассоциированными микробными агентами, проникающими в иммунный орган посредством экзогенных и эндогенных механизмов, опосредованных в последующем аутоиммунными реакциями [5]. Таким образом, нет полного понимания о роли конкретных микробных ассоциаций в патогенезе хронического тонзиллита.

С учетом возрастания антибиотикорезистентности условно патогенных микроорганизмов, изменением популяционного микропейзажа небных миндалин у здоровых людей, динамическими изменениями в композиционном составе микрофлоры актуально проведение исследований, направленных на изучение микробного состава небных миндалин у здоровых лиц.

Цель работы — характеристика микропейзажа небных миндалин у здоровых студентов в зависимости от времени года.

Были обследованы 40 студентов без патологии ротоглотки в возрасте 17–30 лет ($23 \pm 3,5$), 20 мужчин и 20 женщин. Критериями включения были — отсутствие хронического тонзиллита при фарингоскопии (слизистая небных миндалин нормальной окраски, лакуны чистые), отсутствие увеличения подчелюстных лимфоузлов, отсутствие признаков острой респираторной инфекции, отсутствие приема антибиотиков в течение 1 месяца до проведения исследования и отсутствие в анамнезе перенесенной ангины в течение последних 5 лет. Исследование проводили в лаборатории микробиологии Института биологии и химии МПГУ. Ватным тампоном натошак был взят мазок с правой и левой небных миндалин на питательную среду в чашке Петри. В качестве питательной среды использовался мясопептонный агар (пептон, агароза, мясной бульон из говяжьего сердца, дистиллированная вода с добавлением 15% сыворотки крови крупного рогатого скота. рН среды 7,2–7,6 достигался добавлением NaCl). Обследование проводилось трехкратно, раз в сезон: осенью — с 16.10 по 02.11, зимой с 27.01 по 06.03, весной с 02.04 по 19.04. При этом учитывалась уличная температура и осадки — при проведении исследования в каждом сезоне эти показатели были примерно одинаковые. Культивация штаммов осуществлялась в термостате при температуре 37,3–37,7°С в течении 24 часов. Для определения серогруппы стрептококков использовался набор реактивов СТРЕП-ТЕСТ А, В, С, G (ООО «Научно-производственное объединение Аквапаст», Санкт-Петербург), т.к. бактериальный гемолиз на данном агаре виден нечётко. Окрашивание препаратов проводилось несколькими способами: использовались методы простой окраски (генцианвиолет либо фуксин), сложные (по Граму для выявления Грам+ и Грам- организмов, по Бурри-Гинсу для выявления капсул); для детального определения микроорганизмов использовался метод иммерсионной микроскопии. Микроорганизмы оценивались как диагностически значимые при высевах колоний в количестве более 10^3 КОЕ.

Для статистического анализа данных использовались свободные программы AtteStat версия 10.2.1. Все количественные признаки тестировались на соответствие их распределению нормальному критерием Шапиро-Уилка. Сравнительный анализ параметрических признаков проводился с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим поиском межгрупповых различий критерием Шеффе. Анализ непараметрических количественных признаков проводился с помощью критерия Крускала-Уоллиса с последующим поиском межгрупповых различий критерием Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Качественные признаки сравнивались точным критерием Фишера-Фримана-Холтона.

В ходе исследования у здоровых людей во всех трех сезонах, когда проводились посевы, наиболее частыми представителями микрофлоры небных миндалин были следующие виды микроорганизмов: *S. viridans*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, *Neisseria*, *Micrococcus*, *Bacillus* и *P. aeruginosa*. При этом прослеживалась

определенная динамика встречаемости всех обнаруженных микроорганизмов в разные периоды времени года. Резкий активный рост микроорганизмов весной, несомненно в меньшем количестве они были выявлены в осеннее время без статистически значимых различий между этими 2 группами. В зимнее время количество обнаруженных микроорганизмов было практически в 2 раза меньше, чем в весеннее и осеннее время, что было подтверждено статистическими методами.

При сравнении встречаемости отдельных микроорганизмов в разные сезоны получены следующие результаты. Род *Staphylococcus* был представлен *S. aureus* и *S. epidermidis*. Высев этой микрофлоры наблюдали от 4 до 30% в зависимости от сезона (17 и 30% осенью, 13 и 4% зимой, 22 и 26% весной соответственно). Рост дрожжеподобных грибов рода *Candida* был более выраженным в осенне-весенний период (48 и 39%) со снижением зимой до 17%. Представители условно патогенной флоры рода *Neisseria* встречались в 43-52% с небольшим диапазоном их сезонной вариабельности. Микроорганизмы рода *Bacillus* активно высевались в осеннее время (39%) и весной (13%) и полностью отсутствовали зимой. Также был отмечен достоверный рост бактерий рода *Micrococcus* (61%) весной по сравнению с зимним (43%) и осенним (39%) сезоном. Интересен был факт высева *P. aeruginosa* с поверхности миндалин у здоровых людей при полном отсутствии жалоб и клинических симптомов со стороны ротоглотки. Обращает на себя внимание, что активный рост синегнойной палочки был отмечен в осенний период у 43% человек, в зимний и весенний период была обнаружена тенденция к снижению носительства *P. aeruginosa* до 4% и 13% соответственно. *S. viridans* и *S. pyogenes* высевались осенью в 43 и 26%, зимой в 22 и 22%, весной в 74 и 52% соответственно.

Полученные результаты показали, что небные миндалины у здоровых людей не являются стерильными. В течение всех исследуемых сезонов на них были обнаружены представители патогенной, условно патогенной и нормальной микрофлоры, при этом их количественный состав изменяется в зависимости от времени года. Максимальный рост микроорганизмов обнаружен весной, в особенности *S. viridans*, *S. pyogenes* и *Micrococcus*. В осеннее время года также был активный рост всех выявленных нами в процессе исследования возбудителей, при этом отмечался максимальный процент встречаемости *P. aeruginosa*, микроорганизмов рода *Bacillus* и *C. albicans* при полном отсутствии у этих людей признаков кандидоза ротоглотки. Зимой отмечалось достоверное снижение роста всех микроорганизмов, хотя при этом не было получено не одного абсолютно стерильного посева. Также наблюдалось разнообразие микробного состава небных миндалин у каждого пациента в течение 3 сезонов, не отмечалось стагнации их видового разнообразия. Существует сезонная динамика увеличения частоты встречаемости условно патогенной флоры в весенний период и снижение роста всех микроорганизмов зимой, что может быть обусловлено различной степенью влажности воздуха и различием температурного режима окружающей среды. Наши данные позволяют сделать выводы о необходимости дальнейшего изучения микрофлоры небных миндалин, возможно, путем сравнения разных возрастных групп, у лиц, проживающих в разных регионах России, и влияния состояния местного врожденного иммунитета, заболеваний желудочно-кишечного тракта на динамику микробиоценоза слизистой ротоглотки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Енин И.П., Батулин В.А., Шетинин Е.В. и др. Микрофлора небных миндалин при хроническом тонзиллите. Вестник оториноларингологии. 2013,4:21-22.
2. Косяков С.Я., Анготоева И.Б., Мулдашева А.А. Противоречивость современных представлений о проблеме хронического тонзиллита. Медицинский совет. 2015,3:35-39.
3. Мальцева Г.С. Особенности стрептококковой инфекции при хроническом тонзиллите. Consilium Medicum. 2010,11:26-29.
4. Полякова Т.С. Гуров А.В. Современный взгляд на проблему терапии тонзиллофарингитов. Русский медицинский журнал. 2007,2:146-150.
5. Рыбак Н.А., Цыркунов В.М., Рыбак Р.Ф. Микробиоценоз небных миндалин при хроническом тонзиллите. Здравоохранение (Минск). 2014,12:2-7.

6. Савлевич Е.Л., Жарких М.А., Козлов В.С. и др. Неоднозначность диагностической ценности некоторых методов лабораторной диагностики при хроническом тонзиллите. Медицинский совет. 2016,9:54-57.
7. Сагандыкова Н.С. Особенности микрофлоры небных миндалин при хроническом воспалении. Вестник КазНМУ. 2015,2:105-107.
8. Феклисова Л.В, Мескина Е.Р, Галкина Л.А. и др. Современные подходы к коррекции микробиоценоза ротоглотки. Лечащий врач. 2009,10:71-74.
9. Bista M., Amatya R.C., Basnet P. Tonsillar microbial flora: a comparison of infected and non-infected tonsils. Kathmandu Univ. Med. J. 2006,4(1):18-21.
10. Brook I., Foote J. Comparison of the microbiology of recurrent tonsillitis between children and adults. Laryngoscope. 1986,96(12):1385-1388.
11. Develioglu O.N., Ipek H.D., Bahar H. et al. Bacteriological evaluation of tonsillar microbial flora according to age and tonsillar size in recurrent tonsillitis. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 2014,271(6):1661-1665.
12. Kuhn J.J., Brook I., Waters C.L. et al. Quantitative bacteriology of tonsils removed from children with tonsillitis hypertrophy and recurrent tonsillitis with and without hypertrophy. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 1995,104(8):646-652.
13. Van Staaij B.K., Van Den Akker E.H., De Haas Van Dorsser E.H. et al. Does the tonsillar surface flora differ in children with and without tonsillar disease? Acta Otolaryngol. 2003, 123(7): 873-878.
14. Stjernquist-Desatnik A., Holst E. Tonsillar microbial flora: comparison of recurrent tonsillitis and normal tonsils. Acta Otolaryngol. 1999,119(1):102-106.
15. Swidsinski A., Durffel Y., Loening-Baucke V. et al. Biomorphology of the bacterial invasion in chronic pharyngotonsillitis. Laryngorhinootologie. 2008,87(11):776-782.
16. Windfuhr J.P. Indications for tonsillectomy stratified by the level of evidence. GMS Curr. Top. Otorhinolaryngol. Head. Neck. Surg. 2016,15:Doc09.doi: 10.3205/cto000136. eCollection 2016. Review. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5169082/>.

Поступила 28.02.18

Контактная информация: Савлевич Елена Леонидовна, к.м.н.,
121359, Москва, ул. Маршала Тимошенко, 21

ЗАМЕТКА ИЗ ПРАКТИКИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.Б.Файзулов, Е.Р.Корчевая, Д.В.Марков, О.А.Петруша, В.В.Зверев

ПРОБЛЕМА КОНТАМИНАЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ОРТОРЕОВИРУСАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

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

Обязательным требованием к культурам клеток, используемым в научных исследованиях и биотехнологическом производстве, является отсутствие их контаминации вирусами. Нами описан случай незапланированного выделения в культуре клеток почки эмбриона макаки-резуса МА-104 ортореовируса млекопитающих. ПЦР-анализ на наличие реовирусной РНК всех вероятных источников реовируса (трипсин, эмбриональная сыворотка коров, клинические образцы, культура клеток) не выявил вирусной РНК ни в одном из образцов. Важным условием активации репродукции реовируса в культуре клеток МА-104 являлось наличие в культуральной среде трипсина. Полученные результаты подчеркивают актуальность контроля на наличие контаминации реовирусами реактивов животного происхождения и клеточных культур. Поскольку реовирусы ассоциированы

с заболеваниями человека, такой контроль на фармацевтическом производстве представляется обязательным.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 104—107

Ключевые слова: культура животных клеток, вирусная контаминация, орторевовирус млекопитающих, трипсин

E.B.Faisuloev, E.P.Korchevaya, D.V.Markov, O.A.Petrusha, V.V.Zverev

THE PROBLEM OF CELL CULTURES CONTAMINATION WITH MAMMALIAN ORTHOREOVIRUSES

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

A mandatory requirement for cell cultures used in scientific researches and biomanufacturing is the absence of their contamination by viruses. We have described the case of adventitious isolation of mammalian orthoreovirus in the rhesus macaque embryo kidney cells MA-104. PCR analysis for the presence of reovirus RNA of all probable sources of reovirus (trypsin, fetal bovine serum, clinical samples, cell culture) revealed no viral RNA in any of the samples. An important condition for the activation of the reovirus reproduction in the MA-104 cells was the presence of trypsin in the culture medium. The obtained results underscore the urgency of control for the reovirus contamination of chemicals of animal origin and cell cultures. Since reoviruses are associated with human diseases, such control in pharmaceutical production is mandatory.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 104—107

Key words: animal cell culture, viral contamination, mammalian orthoreovirus, trypsin

Культуры животных клеток широко применяются в научных исследованиях, эпидемиологическом мониторинге, лабораторной диагностике вирусных инфекций и в фармацевтической промышленности для наработки биологически активных веществ и вирусов. Важным требованием, предъявляемым к культурам клеток, является отсутствие их контаминации вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами [2, 5]. В лабораторной и производственной практике наиболее вероятными источниками контаминации вирусами являются эмбриональная сыворотка коров (ЭСК) и трипсин, получаемый из поджелудочной железы свиней. Также не исключена реактивация вируса из самой клеточной линии при возникновении перmissive для вируса условий. В большинстве случаев контаминантами клеточных культур являются вирусы зоонозного происхождения, не патогенные для человека [2, 5].

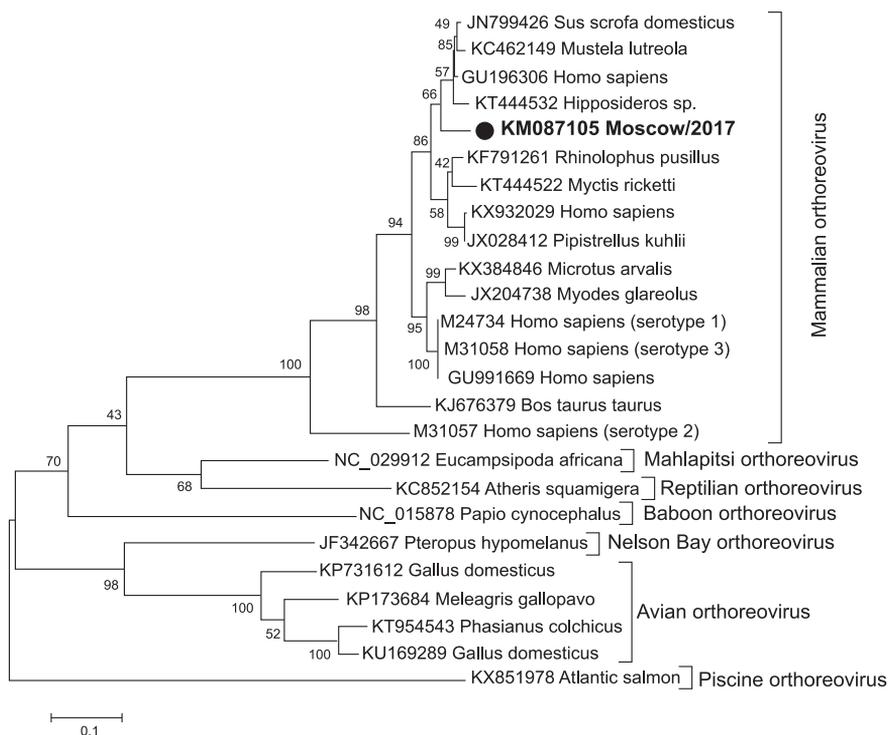
Поводом для написания данной статьи послужил случай незапланированного выделения в культуре клеток почки эмбриона макаки-резуса (МА-104) орторевовируса млекопитающих (далее — реовируса). С целью изоляции ротавирусов человека группы А клетки МА-104 инокулировали фекальными экстрактами от 12 детей с подтвержденной ротавирусной инфекцией и проводили слепые пассажи в поддерживающей среде ДМЕМ с трипсином. Для контроля условий культивирования ротавирусов использовали лабораторные штаммы ротавирусов группы А человека Wa, DS-1 и W161, полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Лабораторные штаммы ротавирусов вызывали в культуре клеток выраженное цитопатогенное действие (ЦПД), а его специфичность подтверждалась в ПЦР-РВ с ротавирусспецифичными праймерами. Из числа 12 исследуемых клинических образцов на уровне 5-9 пассажей пять образцов вызвали выраженное ЦПД. Поскольку в процессе пассирования вируса концентрация ротавирусной РНК в образцах снизилась на несколько порядков (в ряде случаев до предела чувствительности ПЦР), был сделан вывод, что причиной ЦПД была репродукция не ротавируса, а какого-то другого вируса. Экстракция вирусного материала хлороформом не снижала способность выделенного вируса вызывать в культуре клеток ЦПД, что свидетельствовало об отсутствии у вируса липидной оболочки. В опыте по пассированию вируса в от-

сутствие трипсина после второго пассажа все образцы вирусов перестали вызывать ЦПД, что свидетельствует о зависимости репродукции вируса от наличия в питательной среде трипсина. Проведенный гель-электрофорез геномной РНК вируса (ПААГ по Laemmly) выявил 10 генных сегментов, которые распределились по схеме 3:3:4, что соответствует электрофоретипу генома реовирусов. Для сравнения, геном ротавирусов состоит из 11 генных сегментов, которые распределяются в ПААГ по схеме 4:2:3:2. ПЦР-анализ с праймерами к ортореовирусу млекопитающих подтвердил наличие в исследуемых образцах реовирусной РНК в высокой концентрации.

С целью видовой идентификации реовируса методом ПЦР был получен фрагмент генного сегмента L1, кодирующего РНК-полимеразу (координаты 3100-3854 для GenBank №KM087105) и определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена размером 656 п.н. (депонирована в GenBank, № MN170361). По месту выделения штамм вируса назван Moscow. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей всех 5 исследуемых изолятов вирусов выявило их 100% гомологию. Таким образом, реовирус-контаминант представлен одним штаммом, что позволяет предположить его попадание в культуру клеток из одного источника — ЭСК или трипсина, но не из клинических образцов. Также нельзя исключать присутствия реовируса в самой культуре клеток MA-104, в которой он мог латентно персистировать и активироваться при проведении пассажей в присутствии трипсина. Однако ПЦР-анализ ЭСК, трипсина, клеток MA-104, ротавирусосодержащих клинических образцов, использованных для инокуляции клеток, не выявил наличия в них реовирусной РНК. Вероятно, концентрация вируса-контаминанта в источнике заражения была ниже предела чувствительности ПЦР. BLAST-анализ частичной последовательности гена РНК-полимеразы показал до 94% нуклеотидной и до 99,5% аминокислотной идентичности с наиболее близкими штаммами ортореовирусов млекопитающих, выделенными от свиньи, человека, норки и рукокрылых (GenBank № JN799426, GU196306, KC462149, DQ997719, KT444552). Проведённый в программе MEGA5 филогенетический анализ позволил с высокой надёжностью отнести выделенный вирус к семейству Reoviridae, подсемейству Spinareovirinae, роду Reovirus, виду Mammalian orthoreovirus. Анализ проводили в программе Mega5, используя метод максимального правдоподобия и 2-параметрическую эволюционную модель Kimura. Надёжность внутренних узлов дерева оценивали с помощью «бутстреп»-анализа путем построения 500 альтернативных деревьев. В качестве референсных использовали штаммы разных представителей рода Reovirus. В описании штаммов реовирусов указан идентификационный номер последовательности в GenBank и вид животного-хозяина, от которого выделен вирус. Квадратными скобками выделены группы вирусов, относящиеся к одному виду рода Reovirus. Черным кружком отмечен исследуемый штамм реовируса. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 нуклеотидов (см. рис.).

Описанный нами случай неожиданного выделения в культуре клеток реовирусов не является единичным. Так, в работе Колпакова С.А. [1] культуру перевиваемых клеток эмбриона свиньи (СПЭВ) заражали фекальными экстрактами от детей с ротавирусной инфекцией. После проведения четырех слепых пассажей в присутствии трипсина все образцы начали вызывать ЦПД, выражавшееся в полной деструкции монослоя клеток. На уровне 10-16 пассажа урожай вируса достигал $1 \cdot 10^9$ — $6 \cdot 10^9$ вирионов в 1 мл культуральной жидкости. Размер и морфология вирионов, а также зависимость вируса от трипсина соответствовали свойствам ротавирусов, однако электрофоретическая подвижность генных сегментов оказалась характерной для реовирусов — 10 генных сегментов, которые распределялись в ПААГ по схеме 3:3:4. Важно отметить, что в реакции непрямо́й гемагглютинации на ротавирусы группы А ни один из адаптированных штаммов вируса не дал положительного результата. К сожалению, идентификацию вируса методом ПЦР или секвенирования авторы не проводили.

Культуры клеток животных обладают разной чувствительностью к реовирусам. При заражении перmissive культур клеток реовирусами, таких как линия мышечных фибробластов L929, на начальном этапе проникновения в клетку вирус попадает в эндосому или лизосому, где вирусные поверхностные белки $\sigma 3$ и $\mu 1$ подвергаются



Филогенетический анализ частичной последовательности генного сегмента L1 с целью установления таксономической принадлежности вируса.

расщеплению эндогенной протеазой катепсин L с образованием инфекционных субвирионных частиц, способных проникать в цитоплазму клетки [4]. При заражении некоторых непермиссивных культур клеток (в том числе МА-104) для активации реовируса требуется обработка вируса экзогенной протеазой, например, трипсином.

Орторевовирусы млекопитающих представлены четырьмя типами, способны заражать людей и отличаются высокой устойчивостью к физико-химическим воздействиям [3, 10]. Реовирусы эффективно выделяются из клинических образцов в различных клеточных культурах, включая клетки почек обезьян [3]. Реовирусы встречаются повсеместно, а штаммы, серологически идентичные реовирусам человека, были выделены у самых разных животных, включая мышей, шимпанзе, собак, кошек, крупный рогатый скот, овец, свиней, лошадей и обезьян [3]. Описаны высоковирулентные для млекопитающих, в том числе домашних свиней, штаммы реовирусов [6, 10]. Реовирусная инфекция часто встречается у людей, но в большинстве случаев протекает в субклинической форме. Вирус часто обнаруживается в фекалиях, носовых или носоглоточных секретах, моче, крови, спинномозговой жидкости и в различных органах при вскрытии. Название *reovirus* представляет собой акроним, предложенный Sabin A.V. [8] (**r** — respiratory, **e** — enteric, **o** — orphan), то есть вирус, который обнаруживается в респираторном тракте и кишечнике, но при этом называется «сиротским», так как не связан с конкретным заболеванием. Реовирусная инфекция наблюдалась у пациентов с различными состояниями, такими как лихорадка, экзантема, болезни верхних и нижних дыхательных путей, кишечные заболевания, гепатит, кератоконъюнктивит, менингит, энцефалит и другие [3, 7, 9]. Однако этиологическая роль реовирусов в возникновении этих заболеваний остается неясной, поскольку убедительные доказательства вовлеченности вируса в патогенез заболеваний отсутствуют.

Полученные результаты подчеркивают актуальность контроля на наличие контаминации реовирусами не только реактивов животного происхождения, применяемых при выращивании культур клеток, но и самих клеточных культур. Поскольку реовирусы

ассоциированы с заболеваниями человека, такой контроль в фармацевтическом производстве представляется обязательным. Условием повышенного риска активации реовирусной репродукции в клетках является их культивирование в среде с трипсином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колпаков С.А., Колпакова Е.П. Новая группа ротавирусов человека семейства Reoviridae. Электронное периодическое издание ЮФУ «Живые и биокосные системы». 2014, 10.
2. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 89.
3. Dermody T.S. et al. Chapter 44. Orthoreoviruses. *In*: Fields Virology. David M. Knipe, Peter M. Howley. (ed.). 2013.
4. Golden J.W., Linke J., Schmechel S. et al. Addition of exogenous protease facilitates reovirus infection in many restrictive cells. *J. Virol.* 2002, 76(15): 7430-7443.
5. Hawkes P.W. Fetal bovine serum: geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. *Bioresour. Bioprocess.* 2015, 2: 34.
6. Lelli D., Beato M.S., Cavicchio L. et al. First identification of mammalian orthoreovirus type 3 in diarrheic pigs in Europe. *Virol. J.* 2016, 13: 139.
7. Ouattara L.A., Barin F., Barthez M.A. et al. Novel human reovirus isolated from children with acute necrotizing encephalopathy. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, 17(8): 1436-1444.
8. Sabin A.B. Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science.* 1959, 130(3386): 1387-1389.
9. Steyer A., Gutierrez-Aguire I., Kolenc M. et al. High similarity of novel orthoreovirus detected in a child hospitalized with acute gastroenteritis to mammalian orthoreoviruses found in bats in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51(11): 3818-3825.
10. Thimmasandra Narayanappa A., Sooryanarain H., Deventhiran J. et al. A novel pathogenic Mammalian orthoreovirus from diarrheic pigs and Swine blood meal in the United States. *MBio.* 2015, 6(3): e00593-00515.

Поступила 31.05.18

Контактная информация: Файзулов Евгений Бахтиерович, к.б.н., 105064, Москва, М. Казенный пер., 5А, р.т. (495)674-45-84

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Н.А.Михайлова, Д.А.Воеводин, А.В.Поддубиков

КОРРЕКЦИЯ ДИСБИОЗА — ОСНОВА РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

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

Эффективность регенерации обеспечивается нормальным течением обменных и регуляторных реакций, поэтому регенеративная терапия должна быть направлена на выявление и устранение причин дисметаболизующих воздействий. Микробиоценоз является неотъемлемой частью целостного организма человека, принимает участие в реализации всех обменных реакций носителя. Коррекция дисбиоза способствует восстановлению регенеративных процессов, для развития этого направления необходима разработка нового поколения пробиотических препаратов.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 107—113

Ключевые слова: регенеративная медицина, микробиоценоз, дисбиоз, пробиотики, метабиотики

DISBIOSIS CORRECTION — THE BASIS OF REGENERATIVE MEDICINE

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

The effectiveness of regeneration is provided by normal over exchange and regulatory responses, so the regenerative therapy should be directed at identifying and addressing the causes of dismetabolic influences. Mikrobiocenosis is an integral part of holistic human organism takes part in realization of all metabolic reactions of the media. Correction of disbiosis helps restore regenerative processes, for the development of this direction is necessary to develop a new generation of probiotic preparations.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 107—113

Key words: regenerative medicine, microbiocenosis, dysbiosis, probiotics, metabiotics

Регенеративный процесс — фундаментальная основа существования биологических систем, обеспечивающий непрерывное обновление (физиологическая регенерация) и купирование травматических повреждений (репаративная регенерация), без этой способности невозможно сколь-нибудь длительное существование организма. В медицине понятие «излечение» неразрывно связано с понятием «регенерация», любая медицинская манипуляция, будь то хирургическая обработка раны или вакцинация (профилактика, минимизация травмирующего воздействия инфекта), прямо или опосредованно, направлена, в конечном итоге, на восстановление регенеративного процесса.

В последние годы сформировалось и бурно развивается новое медицинское направление — регенеративная медицина (РМ). РМ предлагается рассматривать как междисциплинарную область экспериментальных и клинических исследований, ориентированных на восстановление или замену поврежденных клеток, тканей или органов. РМ представляет сочетание различных технологических подходов, включающих генную терапию, трансплантацию стволовых клеток (СК), тканевую инженерию, функциональное перепрограммирование клеток и тканей [13]. Иногда в этот перечень добавляют трансплантацию естественных и искусственных органов и био-электронномеханических устройств, компенсирующих недостаточность функции пораженного органа. В реальной практике большинство клинических и экспериментальных работ, выполненных по теме РМ, посвящены трансплантации СК.

Однако, недостаточная эффективность трансплантации СК в клинической практике послужила основанием к постепенному переосмыслению методологических основ РМ. В 1978 г. Schofield R. было сформировано положение о «нише» СК. По его представлениям ниша, т.е. микроокружение СК, создает пространственную структуру, регулирующую численность и функциональную активность СК [16].

Последующие наблюдения привели к предположению, что именно структурно-функциональные нарушения микроокружения СК могут являться причиной нарушения регенеративных процессов и развития многих патологических состояний [17], поэтому в настоящий момент это направление РМ рассматривается как наиболее перспективное. Согласно современным представлениям ниша СК включает: внеклеточный матрикс, окружающие соматические клетки, цитокины, ростовые факторы, гормоны, механические характеристики ткани [2], т.е. современное представление о нише, учитывая системные показатели (гормоны), постепенно выходит за рамки традиционных представлений о влиянии «микро» окружения на регенерацию и заставляет обратить внимание на роль системных процессов в поддержании регенеративного потенциала в каждом отдельном органе, размывает границы между РМ и традиционными терапевтическими методами. Другими словами, терапевтические препараты, устраняющие травмирующее воздействие и способствующие нормализации обменных процессов, например, антибиотики при пиелонефрите, больше соответствуют понятию РМ, чем трансплантация почки.

Организм человека в условиях нормального функционирования изначально обладает способностью к регенерации и не нуждается в использовании «костылей» в виде заместительной терапии, будь то использование донорских медиаторов (гормоны, цитокины), СК или донорских органов. Эффективность регенерации, как и любого процесса, протекающего в организме, обеспечивается нормальным течением обменных и регуляторных реакций. Поэтому регенеративная терапия должна быть направлена на выявление и устранение причин дисметаболизующих воздействий, что является необходимым, а в ряде случаев достаточным условием восстановления регуляторно-регенеративных процессов организма больного.

Еще более широкий взгляд на проблему РМ предлагается в статье: «Новый взгляд на роль человеческой микробиоты в регенеративной медицине и хирургии» [5]. Обсуждая хост-микробные взаимодействия (от англ. host-хозяин) авторы приходят к выводам: «Современные представления о взаимодействиях на молекулярном уровне между хостом и микробиотой предполагают полный пересмотр человеческой физиологии и иммунологии ...Игнорирование связи между хостом и микробиотой при планировании лечения нужно рассматривать как недальновидное действие...» [5].

Ключевая роль микробиоты в обеспечении физического благополучия носителя привлекает все большее внимание. Специалисты многих областей медицины отмечают важную роль микробиоты в поддержании нормального функционирования различных органов и систем. Как результат, с 2013 года под эгидой института Пастера (Париж, Франция) проводится ежегодный международный конгресс «Таргетирование микробиоты. Путь к клинической революции» («Targeting Microbiota. Towards Clinical Revolution»). В чем же революционность этого направления?

С современных позиций целостный организм человека можно рассматривать как функциональную химеру, состоящую из двух, по сути равноценных, подсистем, организованных по схожему принципу (ауто-/паракринная сетевая регуляция на уровне межклеточных и межбактериальных взаимодействий) и обладающих схожим «языком» коммуникаций, с неизбежным и закономерным, за счет структурно-функционального (филогенетического) родства, перекрестным взаимодействием. Изменения в одной подсистеме неизбежно порождает изменения в другой [8].

Медицинская наука, как первопричину патологического процесса, традиционно рассматривает нарушения в эукариотическом компоненте. Однако, постулированная равноценность подсистем позволяет предположить ведущую роль микробиоты в развитии как приобретенной, так и врожденной патологии человека, а концепцию дисбиоза можно рассматривать как альтернативу концепциям аутоиммунной агрессии и генетической детерминированности в развитии заболевания, т.е. дисбиоз является фактором предрасположенности, инициации и поддержания патологического процесса. Другими словами: корень медицинских проблем конкретного человека, причины негативного развития эпидемиологического процесса в популяции следует искать в нарушениях не эукариотического, а прокариотического компонента организма человека. С этих позиций изучение клинической роли дисбиоза, условий его формирования и коррекции является сверх актуальной проблемой мировой медицины.

Опыт клинических наблюдений предоставляет все больше подтверждений этому положению. Прежде всего, обращает внимание негативная динамика эпидемиологии дисбиоза, регистрируемая за последние шестьдесят лет. Если в середине прошлого века дисбиоз регистрировался как редкое вторичное состояние, то в последующие годы частота его встречаемости неуклонно возрастала и в последнее десятилетие регистрируется как врожденное состояние у 100% (!) детей первого года жизни [3]. Негативная динамика выявляемости дисбиоза прямо коррелирует с увеличением частоты хронических заболеваний и инвалидизации у детей и взрослых. Случайно ли это?

С использованием корригирующих дисбиоз методов в клинике и на экспериментальных моделях показана высокая эффективность данного направления, по результативности превосходящая методы лечения, основанные на более традиционных схемах. Получен клинически значимый результат при использовании пробиотиков в комплексной терапии сахарного диабета 1 типа [6], аутоиммунного тиреоидита [7], аутизма [15], ревматоидного артрита, деформирующего остеопороза, первичной подагры [4], гипертонической болезни [14].

Нет необходимости перечислять все наблюдения, в которых отмечено положительное влияние коррекции дисбиоза на состояние индивида. Обобщение результатов показывает, что коррекция дисбиотических нарушений приводит к системным положительным сдвигам, достигаемым, во многих случаях, без использования специфических, узконаправленных средств. Например, купирование поздних осложнений сахарного диабета 1 типа (СД1) у детей (катаракта, ретинопатия, нефропатия, полинейропатия, липоидный некробиоз) на фоне длительного использования пробиотических продуктов [6]. Такой полиорганный эффект можно объяснить только нормализацией системных регуляторно-регенеративных процессов, проявляемой в результате купирования негативных дисметаболизирующих воздействий дисбиоза, т.е. в модели инсулинорезистентности и осложнений СД1 оказалось достаточным устранить травмирующий дисбиотический фактор для нормализации регенеративных процессов и полного, самопроизвольного (не требующего дополнительного направленного воздействия) разрешения поздних осложнений заболевания, восстановления чувствительности к гормональному агенту.

Однако, помимо положительных отзывов, в литературе достаточно негативных оценок клинической эффективности пробиотиков. Отмечается, что клинический результат может носить временный характер либо полностью отсутствовать [1]. В чем же причина подобных разночтений?

Долгое время пробиотикотерапии не уделялось необходимого внимания, не было выработано должной номенклатуры пробиотических средств и адекватной методологии пробиотикотерапии. Предполагалось, что достаточно пробиотическим микроорганизмам в любой лекарственной форме попасть в кишечник пациента для их активации, приживания и проявления лечебного воздействия. Предположение подтвердилось лишь частично. В результате, исторически, под термином «пробиотики» мы понимаем и используем в клинической и экспериментальной работе различные препараты, включающие: лиофилизированную лекарственную форму, цельные культуры микроорганизмов, используемые в экспериментах на животных, молочно-кислые продукты питания, обогащенные пробиотиками либо приготовленные на основе микроорганизмов, как основного элемента закваски. Эти формы имеют принципиальное отличие — содержание метабиотиков, поэтому результат, полученный с помощью одной формы, будет недостижим при использовании другой. Отсюда разночтения в оценке клинической эффективности пробиотиков.

Молочно-кислый продукт на основе пробиотической закваски — суть та же цельная культура микроорганизмов, в которой в качестве культуральной среды используется молоко с ростовыми добавками. Эти две формы, помимо бактериальных тел, содержат широкий спектр метабиотиков (т.е. действующее начало), через которые и реализуется биологическая активность препарата. Наличие в препарате метабиотиков повышает его терапевтическую активность и минимизирует вероятность развития пробиотикорезистентности: можно заблокировать продуцента, но сложнее заблокировать действующее начало. Поэтому закономерно, что наиболее значимые клинические и экспериментальные результаты были получены с использованием именно этих форм.

Тема метабиотических препаратов набирает все большую популярность и, по мере углубления наших представлений, приобретает различные грани. Обсуждается целесообразность выделения метабиотиков в отдельную лекарственную группу использования безбактериальных препаратов. В работе [9] сообщается, что удаление из культуры среды бактериальных тел во много раз повышает терапевтическую активность препарата, оцениваемую по способности купировать экспериментальный дисбиоз. Пока не совсем понятно, чем обусловлен такой эффект и, соответственно, на сколько эта процедура необходима. Кроме того, с самого начала возникновения пробиотикотерапии в медицине мало кто сомневался, что эффекты микроорганизмов обусловлены продуцируемыми ими медиаторами. Соответственно, если отделить действующее начало от продуцента, то понятие «пробиотики» утратит свое наполнение.

Обобщение материалов по данному вопросу не оставляет сомнений, что клинически значимый результат может быть получен только от препаратов изначально

содержащих метабиотические агенты. Однако, осознание необходимости их наличия в лечебном препарате не исчерпывает в полной мере всю сложность данной проблемы. Совокупный опыт использования пробиотикотерапии показал, что во многом ее эффективность определяется спектром метабиотических агентов, т.е. мало получить активно растущую культуру пробиотических микроорганизмов с активной продукцией метабиотиков, необходимо заставить их (выявить и создать условия) продуцировать нужные(!) метабиотики. Принадлежность микроорганизмов к определенному штамму, на что до сих пор делался особый акцент, может иметь меньшее значение, чем условия культивирования.

Разочарование в коммерческих пробиотических препаратах, но осознание перспективности направления корригирующей дисбиоз терапии заставило искать альтернативные пути решения проблемы. Внимание привлек метод трансплантации фекальной микрофлоры (ТФМ). Логика этой манипуляции очень проста и, по сути, ничем не отличается от логики пробиотикотерапии, в конце концов, изначально пробиотические микроорганизмы тоже когда-то были выделены из кишечника человека: если микробиота обеспечивает физическое благополучие донора, то ее введение реципиенту должно способствовать положительным клиническим изменениям. Клинический эффект ТФМ, также как пробиотиков, реализуется через метабиотические агенты [10]. Интерес к этому направлению продиктован сочетанием методической и методологической простоты процедуры ТФМ и ее клинической эффективности не только при инфекционно-воспалительных поражениях кишечника, что было ожидаемо, но и при тяжелой неинфекционной патологии: аутизме [11], рассеянном склерозе [12], диабете 2 типа [18].

Однако за простоту и эффективность процедуры ТФМ приходится расплачиваться высокой частотой токсико-инфекционных осложнений (свыше 40% при дуоденальном пути введения фекальной взвеси) и смертностью, превышающей 1% [19].

Проблема осложнений ТФМ заложена в самом исходном материале. Микрофлора кишечника включает более тысячи разновидностей микроорганизмов, и адекватная оценка кишечной микрофлоры равноценна решению уравнения, в котором более тысячи переменных. В настоящий момент задача непосильная. Невозможность адекватной оценки микробиологического спектра фекалий приводит к невозможности стандартизации, следовательно, к непредсказуемости клинического результата и формирования осложнений.

Но результативность ТФМ в очередной раз напоминает об известном явлении: функциональная активность микроорганизмов, растущих в адекватных условиях, коренным образом отличается от функциональной активности микроорганизмов, выращенных на искусственных средах. Например, давно известна склонность патогенных микроорганизмов к снижению вирулентности в неоптимальных условиях культивирования. Данное явление целенаправленно используют как метод получения вакцинных штаммов. В основе отмеченной закономерности лежит патофизиологическая (адаптивная) реакция микроорганизмов — обратимая утрата части функций в пользу увеличения способности к выживанию. К сожалению, существующая методология получения пробиотических препаратов не учитывает данного обстоятельства. Можно сделать вывод, что даже самый эффективный пробиотический штамм, но выращенный в неадекватных условиях культивирования, утратит свою терапевтическую активность. Применение такого препарата утрачивает смысл, порождает разочарование врачей в пробиотикотерапии, дискредитирует само направление. Решение задачи адекватного культивирования, по нашему мнению, позволит повысить эффективность пробиотикотерапии.

Длительное отсутствие интереса к проблеме дисбиоза со стороны клинической медицины породило методологический разрыв (непреодоленный в полной мере и сейчас) между микробиологией и клиникой и, как следствие, методологические и методические недочеты в разработке пробиотических препаратов. Микробиологами не были учтены обстоятельства, ставшие очевидными в последнее время с клинической актуализацией проблемы дисбиоза: микробиота — составной элемент единой про-/эукариотической системы; эффекты пробиотикотерапии реализуются не

только через воздействие на микробиоту носителя, но и через возможные прямые эффекты метабитиков на обменные процессы эукариот, а потому антагонистические эффекты пробиотических микроорганизмов к отдельным представителям патогенной и условно патогенной микрофлоры, выявляемые *in vitro*, не могут являться конечной моделью или исключительным критерием отбора перспективных лечебных штаммов и лекарственных форм; коррекция дисбиоза не конечная цель пробиотикотерапии, а путь для купирования патологических состояний, обусловленных микробиотой, поэтому оценку перспективности пробиотических средств следует проводить, в конечном итоге, по результату воздействия на клинические проявления; терапевтические эффекты пробиотических микроорганизмов реализуются через продуцируемые ими медиаторы (метабитики), наличие и спектр которых необходимо учитывать при создании конечных лекарственных форм.

Выявление новых обстоятельств диктует необходимость пересмотра существующих подходов к созданию пробиотических лекарственных средств, т.е. диктует необходимость создания нового поколения пробиотических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ардатская М.Д. Дисбактериоз кишечника: понятия, диагностика, принципы лечебной коррекции. *Consilium medicum*. 2008, 10(8): 86-92.
2. Васильев А.В., Воротеляк Е.А., Терских В.В. Ниши стволовых клеток и регенеративная медицина. *Рос. физиол. журн.* 2016, 102(3): 241-261.
3. Воеводин Д.А., Розанова Г.Н., Поддубиков А.В., Михайлова Н.А. Микробиоценоз, иммунная система и наследственность. *Журн. микробиол.* 2017, (2): 116-126.
4. Зияева Ш.Т., Бектемирова А.А. Особенности микробиоценоза кишечника у больных ревматоидным артритом, деформирующим остеопорозом, первичной подагрой и влияние пробиотикотерапии на клиническое течение болезни. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2016, 12(136): 60-64.
5. Пелегатта Т., Салер М., Бонфанти В., Николетти Д., Фага А. Новый взгляд на роль человеческой микробиоты в регенеративной медицине и хирургии. *Косметика и медицина.* 2017, (2): 48-54.
6. Розанова Г.Н., Воеводин Д.А., Стенина М.А., Кушнарева М.В. Патогенетическая роль дисбактериоза в развитии осложнений сахарного диабета 1 типа у детей. *Бюлл. exper. биол.* 2002, 133(2): 196-198.
7. Розанова Г.Н., Воеводин Д.А., Кушнарева М.В. Целесообразность пробиотикотерапии у больных с заболеваниями щитовидной железы. *Педиатрия.* 2004, (4): 56-59.
8. Розанова Г.Н., Воеводин Д.А. Случай эффективного использования пробиотиков в комплексной терапии тяжелой формы сахарного диабета 1-го типа при кишечном дисбактериозе. *Клин. мед.* 2008, 86(1): 67-68.
9. Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Дармов И.В., Маракулин И.В. Экспериментальный псевдотуберкулез: оценка возможности профилактики, лечения и коррекции дисбиотических нарушений кишечной микрофлоры. *Журн. инфектологии.* 2012, (4): 71-79.
10. Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовский И.А. Дармов И.В., Маракулин И.В. Трансплантация фекальной микробиоты. *Журнал инфектологии.* 2013, 5(2): 82-88.
11. Aroniadis O.S., Brandt L.J. Fecal microbiota transplantation: past, present and future. *Current opinion in Gastroenterology.* 2013, 29: 79-84.
12. Borody T., Leis S.M., Campbell J.T. et al. Fecal microbiota transplantation (FMT) in multiple sclerosis (MS). *Am. J. Gastroenterol.* 2011, 106: 842.
13. Daar A.S. The future of replacement and restorative therapies: From organ transplantation to regenerative medicine. *Transplant. Proc.* 2013, 45: 3450-3452.
14. Dong J.Y., Szeto I.M., Makinen K. Effect of probiotic fermented milk on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Br. J. Nutr.* 2013, 110: 1188-1194.
15. Frye R., Slattery J., MacFabe D. Approaches testing and manipulating the enteric microbiom to improve autism symptoms. *Microb. Ecology in Health and Disease.* 2015, 26(26878): 1-14.
16. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cell.* 1978, 4: 7-25.

17. Visnjic D., Kalajzic Z., Rowe D.W. et al. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*. 2004, 103: 3258-3264.
18. Vrieze A., Van Nood E., Holleman F. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012, 143(4): 913-916.
19. Wang S., Xu M., Wang W. Systematic review: Adverse events of fecal microbiota transplantation. *Public Library of Science ONE* 2016, 11(8) — doi: 10.1371/journal.pone.0161174.

Поступила 25.05.18

Контактная информация: Воеводин Дмитрий Анатольевич, к.м.н., 105064, Москва, М. Казенный пер., д. 5 А, р.т. (495)917-87-41

© В.И.ПУШКАРЕВА, С.А.ЕРМОЛАЕВА, 2018

В.И.Пушкарева, С.А.Ермолаева

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РОЛИ РАСТЕНИЙ В ЭПИДЕМИОЛОГИИ САПРОНОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ

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

С экологических позиций охарактеризована эпидемиологическая специфика природной очаговости сапронозов. Отмечено, что многие патогенные бактерии (сальмонеллы, эшерихии и другие условно патогенные энтеробактерии) связаны с возбудителями сапронозов общей экологической чертой — возможностью автономно существовать во внешней среде. Обзор акцентирован на роли сельскохозяйственных культур как альтернативных хозяев ряда патогенных бактерий (иерсиний, сальмонелл, листерий, энтерогеморрагических кишечных палочек и пр.). Приводятся экспериментальные доказательства способности возбудителей болезней человека и животных проникать и размножаться внутри тканей многих культурных растений, которые вызывают вспышки пищевых инфекций. Обсуждаются альтернативные нестандартные подходы к минимализации этой глобальной проблемы в перспективе: поиск природных растений, устойчивых к энтеропатогенам, и конструирование на их основе трансформированных агрокультур путем использования генов антимикробных пептидов (АМП). Констатированы многочисленные исследования дикорастущих растений медицинского значения, которые с помощью природоподобных биотехнологий могут служить источником для получения новых высокоактивных соединений, способных также преодолевать барьеры полирезистентности ряда антибиотиков. Приводятся собственные результаты по выявлению биологической активности экстрактов ряда дикорастущих растений России в отношении листерий и токсинпродуцирующих эшерихий.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 113—121

Ключевые слова: сапронозы, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7(H4), растения, биологическая активность, пищевая безопасность, антимикробные пептиды

V.I.Pushkareva, S.A.Ermolaeva

EXPERIMENTAL EVIDENCES ON A CROP PLANT ROLE IN EPIDEMIOLOGY OF SAPRONOTIC (SOIL-BORNE) BACTERIAL INFECTIONS

Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Specific epidemiology of sapronotic (soil-borne) bacteria is characterized from the ecological point of view. The characteristic feature of soil-borne pathogens is an ability to exist autonomously in the environment. This analytical review is focused on crops as alternative hosts for a number of soil-borne pathogenic bacteria (*Yersinia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia* etc).

Published experimental results evidence capabilities of human and animal pathogens to colonize plant tissues. Novel approaches are discussed to minimize risks of infection spreading with crops. These approaches include an analysis of wild plant natural resistance to pathogenic bacteria and a construction of transgenic plant crops expressing antimicrobial peptides. Multiple studies are cited that established wild plants used in traditional medicine as a source for obtaining molecules effective against resistant pathogens. The review includes recent author results on activity of wild plant extracts against *Listeria* and toxin-producing *Escherichia*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.5, P. 113—121

Key words: soil-borne pathogens, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7(H4), crop plants, bioactivity, biosafety, antimicrobial peptides

Экологический принцип, заложенный в условное разделение класса сапронозов на почвенные, водные и зоофильные (сапрозоонозы), лишь подчеркивает их выраженную эпидемиологическую специфику, характеризующуюся разными источниками и путями заражения человека. К почвенным сапронозам относятся клостридиозы (столбняк, газовая гангрена, ботулизм), сибирская язва, псевдотуберкулез, листериоз, некоторые микобактериозы, условно патогенные бактерии семейства Enterobacteriaceae, родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и др., для них уже выявлены природные резервуары, первичные из которых — почвы [1,3], а также ряд висцеральных микозов (гистоплазмоз, бластомикоз, актиномикоз и др.). Типичные водные сапронозы — легионеллез, холера и другие вибриозы, мелиоидоз, аэромонозы и др. Впрочем, положение некоторых инфекций не вполне определено: так, псевдотуберкулез, кишечный иерсиниоз, листериоз иногда относят к сапрозоонозам как и чуме. Совершенно очевидно, что сапронозы, возбудители которых — полноправные компоненты естественных экосистем, в полной мере отвечают критерию природноочаговых инфекций [2, 3]. Вместе с тем, они обладают существенными особенностями, из которых основными мы считаем: первичная и основная среда обитания возбудителей сапронозов — почвы и водоемы, откуда они могут проникать в наземные экосистемы, заражая животных, человека, растения; полигостальность возбудителей сапронозов — беспрецедентно широкий круг потенциальных хозяев в почвенных, водных, наземных экосистемах и полипатогенность — для простейших, многих беспозвоночных, позвоночных животных, человека и даже растений [29, 30]; широкие адаптивные возможности микроорганизмов при смене среды обитания.

Реальность растений как резервуаров и источников возбудителей пищевых инфекций была осознана и теоретически обоснована 30 лет назад [8]. Самые крупные вспышки псевдотуберкулеза (дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки) на Дальнем Востоке, зарегистрированные с 50-х годов XX века, в 97,5% возникали после употребления в пищу капусты, моркови либо салатов из свежих овощей. Расшифровка всех случаев заболеваний на протяжении многих лет доказала основную роль овощей как резервуаров и источников возбудителя псевдотуберкулеза. Экологические особенности дальневосточного региона (совокупность климатических, абиотических и биотических факторов) сформировали самый большой ареал природноочаговых сапронозов, где многие возбудители: иерсинии, листерии, псевдомонады и условно патогенные представители семейства Enterobacteriaceae существуют в оптимальных условиях [1-5, 8].

Эпидемиологический анализ многочисленных и постоянных вспышек иерсиниозов в других географических зонах России, а также в странах Западной Европы показал, что при псевдотуберкулезе, реже — при кишечном иерсиниозе, главным фактором передачи возбудителя являются овощные культуры либо салаты, приготовленные из них [4, 5].

Экспериментальные исследования прошлых лет по взаимодействию *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* с сельскохозяйственными растениями выявили проникновение бактерий из ризосферы через корневые волоски в проростки капусты, салата, бобовых, которые не только сохранялись, но и накапливались в высоких концентрациях в стеблях и листьях. Впервые нами была воспроизведена трофическая цепь по скармливанию зараженных побегов кормовых растений зеленоядным грызунам (полевкам), специально отловленным в природных экосистемах, что со-

проводилось неоднократной изоляцией иерсиний из кишечного содержимого и появлением антител в крови животных через 14 суток после кормления. Доказано, что существует принципиальная возможность передачи возбудителя алиментарным путем, а циркуляция иерсиний по цепочке почва — растение — животное вполне реальна в естественной среде обитания грызунов [1, 2].

Наиболее детальное и разностороннее изучение воздействия *Y. pseudotuberculosis* на клеточные культуры (калусы) капусты *Brassica oleracea* проведено Персияновой Е.В. [4], которая выявила быстрое накопление *Y. pseudotuberculosis* в тканях капусты. После инфицирования образцов численность иерсиний возрастала в течение 3 суток в 100 000 раз и сохранялась до 60 суток даже на отмирающих тканях каллусов. Трансмиссионная электронная микроскопия инфицированных каллусов, проведенная в динамике, выявила адгезию бактерий к клеточной стенке капусты на вторые сутки с последующим лизисом и размножением возбудителя в межклеточном пространстве. В более поздние сроки (3 — 5 суток) зарегистрировано очевидное фитопатогенное воздействие иерсиний на клетки-мишени. По мнению авторов, внутриклеточная локализация бактерий в растениях защищает их от воздействия пищеварительных ферментов ЖКТ теплокровных при поедании растительной пищи и позволяет иерсиниям с пищевым комком достигать тонкого кишечника, где переваривается пища, возбудитель при этом высвобождается, проникает в эпителий, и реализуется инфекционный процесс в организме человека или животного.

Возбудители кишечных инфекций *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter* и др., не относящиеся в настоящее время к классу сапронозов, тем не менее, постоянно и длительно выделяются из природных и урбанизированных экосистем (почвы, водоемов, бассейнов, субстратов агрокомплексов, прудов орошения, предприятий пищевой индустрии и пр.), что свидетельствует об их способности к автономному существованию во внешней среде.

Несмотря на традиционные представления о симбиотических связях представителей семейства *Enterobacteriaceae* исключительно с теплокровными животными, растет число публикаций о растениях как потенциальных хозяевах для них. Экспериментальным путем показана динамика размножения бактерий на листовых салатах, проростках злаковых, бобовых, кинзе, капусте и др., однако при этом растения рассматриваются, скорее, в качестве питательной среды, чем как живые организмы [10, 11, 13, 17-22, 25, 34, 36].

Роль агрокультур как источника и фактора передачи при пищевых инфекциях (листериозе, эшерихиозе, сальмонеллезе, кампилобактериозе и др.) принято считать второстепенной, несмотря на регулярную регистрацию «растительных» вспышек в Европе и в Новом Свете, связанных с употреблением листовых салатов, шпината, кинзы, проростков сои, фаст-фуда с их включением и даже бахчевых культур [12, 20].

Крупные резонансные вспышки таких инфекций инициировали разработку нового междисциплинарного направления по изучению растений как альтернативных хозяев энтеропатогенов, обладающих защитными механизмами, иммунитетом и возможностью неоднозначного взаимодействия с энтеробактериями при инфицировании различными путями (контаминация пророщенных семян, листьев, стеблей либо из ризосферы) [4 — 7, 22, 25, 28, 36].

Экспериментальные доказательства способности микроорганизмов, не являющихся фитопатогенными, проникать и размножаться внутри тканей многих культурных растений (изучено более 20 видов) получены в зарубежных странах, в основном, в Америке [10 — 15, 17, 18, 21, 25, 28, 34, 36].

Листерииоз, относящийся по определению ВОЗ к особо важным пищевым инфекциям [41], характеризуется высокой летальностью, достигающей 43%, а у пожилых пациентов — до 90%, обусловлен проникновением в желудочно-кишечный тракт грамположительных бактерий *L. monocytogenes*, убиквитарно распространенных на всех континентах.

Инфекция, занимающая третье место в США после ботулизма и вибриоза (*Vibrio vulnificus*), является фатальной по своим последствиям. Например, вспышка в 2011 году (штат Колорадо, США), возникшая у 147 человек, связанная с употреблением дынь, привела к смерти 33 заболевших, несмотря на лечение антибиотиками. В

Швеции при некоторых вспышках погибало 90% пожилых людей, что свидетельствует о неэффективности стандартных антибиотиков [12, 20].

Глобальный (в 67 странах) эпидемиологический метаанализ заболевания, проведенный впервые специальной группой под эгидой ВОЗ, с количественной оценкой перинатального и неперинатального листериоза, однозначно связал его с трудностью контроля биологической безопасности в пищевой индустрии и выявлением листерий в антропогенно-преобразованной среде. Несмотря на беспрецедентные статистические материалы, вопросы о причинах, механизмах укоренения и путях распространения возбудителей в современных техногенных очагах даже не формулируются [20]. Россия остается белым пятном на эпидемиологической карте мира (статистика по листериозу и энтерогеморрагическому эшерихиозу в материалах ВОЗ отсутствует), и только отдельные научные группы (Москва, Владивосток) занимаются фундаментальными основами этой проблемы.

По данным ВОЗ ежегодно в мире регистрируется около трети миллиарда диарейных заболеваний [41]; лабораторно-подтвержденные вспышки опасного энтерогеморрагического эшерихиоза (ЕНЕС), постоянно встречающиеся в Европе, к 2015 году уже достигли 45% среди токсин-продуцирующих возбудителей. В Северной Америке наблюдаются спорадические случаи на 100 000 населения, Аргентине — до 22 случаев на 100 000, причем, инфекции всегда связывают с животными, однозначно причисляя их к зоонозам, но не с «пищевыми» растениями [12,20].

Эпидемия эшерихиоза, вызванная *Escherichia coli* серовара O157: H7 в Японии (более 10 000 человек), возникшая в результате употребления школьных завтраков с проростками редиса, вызвала серьезные осложнения у детей и инициировала работы по изучению взаимодействий растений с бактериями, патогенными для человека и животных [37].

За последнее десятилетие в мире зарегистрировано более 40 серьезных вспышек эшерихиоза (ЕНЕС), причиной которых были овощи и салаты, не подвергающиеся тепловой обработке [12, 13, 41]. В 2011 году Европу охватила «зеленая эпидемия» (около 4000 человек), вызванная энтерогеморрагической *Escherichia coli* серовара O104:H4. Возбудитель отличался полирезистентностью к нескольким классам антибиотиков, что затрудняло лечение больных, в результате чего засвидетельствован летальный исход у 52 человек, причем в контингент заболевших входили, в основном, здоровые люди работоспособного возраста. Все пациенты употребляли овощи: лук порей, огурцы, сою и др., однако вспышка осталась эпидемиологически нерасшифрованной, с невыясненным резервуаром и источником возбудителя [12, 20].

Как указано выше, многочисленные эпидемические вспышки в разных странах инициировали работы по изучению взаимодействий токсин-продуцирующих эшерихий с агрокультурами. В модельных опытах выявлено, что *E.coli* интенсивно колонизируют филлосферу салата при поверхностной контаминации, длительно сохраняются как в вегетирующих растениях, так и на срезанных листьях [11, 13, 17, 18].

Наш выбор для изучения в качестве приоритетных фито-бактериальных моделей с участием *L. monocytogenes* и энтерогеморрагических *E. coli*, принадлежащих к разным таксономическим группам, обусловлен тем, что они конвергентно связаны общей экологической чертой — возможностью автономно существовать во внешней среде [5 — 7].

Показано, что *L. monocytogenes* EGD при контаминации вегетирующих растений петрушки, листовых салатов, капусты демонстрируют высокую кинетику роста при посевах зеленой массы в течение 7 суток. Углубленные исследования на клеточном и ультраструктурном уровнях клеточных культур (каллусов) через 2 суток выявили цитопатогенное воздействие вирулентных листерий на растительные клетки с разрушением клеточных стенок, локализацией бактерий в вакуолях и последующим некрозом. Гистологические срезы тканей показали глубокое проникновение листерий (до 32 мкм) и их значительные скопления. Потенциал вирулентности возбудителя сохранялся на протяжении опыта [6]. Вегетирующие растения по внешним признакам значительно отличались от интактных: пожелтение, некроз листьев и пр. В контрольных опытах с аттенуированным штаммом *L. monocytogenes* EGD Δhly и свободноживущими *L.innocua*, несмотря на колонизацию растений бактериями,

фитопатогенного воздействия не обнаружено, что подтверждается цитологическими и гистологическими исследованиями.

В сравнительных экспериментах с грамотрицательными энтерогеморрагическими *E. coli*, продуцирующими шигаподобный токсин, и листовыми культурами салатов, капусты, базилика, которые входят в состав фаст-фуда, методами трансмиссионной и сканирующей микроскопии зафиксирована активная колонизация тканей эшерихиями, заполнившими не только поверхностные структуры, но и межклеточные каналы.

Популяционная динамика патогенных *E. coli*, инокулированных в ризосферу базилика, выявила быстрое (2 суток) накопление эшерихий в вегетативных органах до опасных концентраций (10^5 КОЕ/г) и сохранение их на протяжении срока наблюдения. Визуальный ряд, полученный 3-D микроскопией (прибор Quanta), продемонстрировал формирование биопленки на поверхности растительных тканей, при этом, биопленочный матрикс был выражен, на его фоне заметны делящиеся бактерии, что свидетельствует об их максимальной численности в образцах. Полимеразная цепная реакция подтвердила длительное сохранение токсина, что является чрезвычайно опасным при энтерогеморрагических эшерихиозах [5, 7]. В параллельных опытах доказана роль почвы и технологической воды в сохранении эпидемически опасных эшерихий в объектах окружающей среды [7, 12].

Фундаментальные исследования симбиотических связей сельскохозяйственных растений с патогенными бактериями фрагментарны и малочисленны, с констатацией, в основном, что многие энтеропатогены используют их в качестве альтернативных хозяев наряду с человеком и животными [5]. Однако расшифрованы молекулярно-генетические механизмы взаимодействия патогенных бактерий с организмом-хозяином, претендующие на универсальность характера некоторых молекулярных основ патогенности грамотрицательных бактерий, прежде всего, за счет схожести структуры системы секреции III типа (ССТТ) у фитопатогенных бактерий и возбудителей заболеваний человека и млекопитающих животных, которые позволяют реализовать их потенциал патогенности. ССТТ называют «молекулярным шприцем», т.к. эта система секреции состоит из полой «иглы» (пиля), закрепленной на так называемом «базальном теле», пронзающем цитоплазматическую и наружную мембраны бактериальной клетки, и транслокаторного комплекса, который находится на другом конце иглы и встраивается в цитоплазматическую мембрану клетки-мишени. Основной разницей в структуре ССТТ патогенов растений и животных является длина «иглы» — пиля: если для взаимодействия с клетками млекопитающих достаточно длины 40-80 нм, то для преодоления клеточной стенки растительной клетки необходима игла порядка 1 мкм.

Эффекторные и структурные белки ССТТ дают очевидный пример сходства молекулярных основ патогенности у возбудителей болезней человека, животных и растений [14, 15].

У грамположительных листерий основной фактор патогенности — листериолизин O — универсален при взаимодействии патогенных листерий с различными эукариотическими клетками — высшими и низшими (простейшими), а также с растениями [5, 6, 29, 30].

Остается неизвестным, способны ли растения природных экосистем вступать в симбиотические отношения с возбудителями пищевых инфекций? Для корректных экспериментов необходимо конструирование моделей трансформированных агрокультур путем использования генов антимикробных пептидов растений, устойчивых к патогенам человека и животных. Основы для развития этого направления нами заложены [31].

В последние годы по рекомендации ВОЗ [39, 40] во многих странах развернуты интенсивные исследования, связанные с прикладными аспектами взаимодействия энтеропатогенов с дикорастущими растениями (их субстанциями) медицинского значения, поскольку абсолютное доминирование антибиотиков при лечении пищевых и других инфекций порождает глобальную проблему — полиантибиотикорезистентность возбудителей: более 700 000 больных погибают ежегодно от неэффективности стандартной антибактериальной терапии.

Многokrратно констатировано, что сальмонеллы, в частности, устойчивы к фторхинолонам, хлорамфениколу, триметоприму, ампициллину и др. [19]. Обследованные

дети с длительной диареей, обусловленной различными возбудителями кишечных инфекций, не были восприимчивы к этиотропному лечению, а культуры выделенных бактерий (сальмонеллы, эшерихии, холерные вибрионы и др.) обладали полирезистентностью к современным антибиотикам [32].

Существует единичная работа по изучению резистентности *L.monocytogenes* к 19 антибиотикам, широко применяемым в ветеринарии и медицине. На когорте из 120 штаммов, изолированных как из продуктов, так и из окружающей среды, на протяжении всей технологической цепи на пищевых предприятиях выявлено, что от 2,5 до 11,4% культур были устойчивы к традиционным антимикробным препаратам [16].

Следует отметить, что клинические изоляты или культуры, выделенные из объектов (субстратов) внешней среды, имеют значительные отличия от коллекционных штаммов по чувствительности к антибиотикам в тестах, выполненных *in vitro* [40].

Альтернативным путем преодоления проблемы резистентности является изучение антимикробных субстанций растительного происхождения, способных ингибировать популяции патогенных бактерий.

Обзор современной литературы свидетельствует о масштабных исследованиях дикорастущих растений — эндемиков, произрастающих в странах с жарким климатом (Африка, Азия, Латинская Америка) и Европе как ингибиторов патогенных микроорганизмов различных семейств, а также источников для получения антиоксидантных и других биологически активных веществ [23, 24, 27, 32, 33, 35, 38].

Высокой антибактериальной активностью в отношении широкого спектра патогенных бактерий (стафилококков, сальмонелл, эшерихий и других представителей семейства *Enterobacteriaceae*) обладали экстракты из растений, произрастающих в Египте: имбирь, тимьян, кориандр, майоран и ряд других. Имбирь, кориандр, тимофила подавляли рост бактерий на 99% (в диско-диффузионном тесте диаметр границ зоны лизиса составлял 80-90 мм); майоран, мускат и ромашка также были высоко активны (зона ингибции составляла до 70 мм). Наименьший эффект отмечен для солодки и чернушки, которые известны и в России [26]. Размеры зоны задержки роста при воздействии растительных экстрактов на бактерии значительно превосходили данные, приведенные в таблицах стандартов, для выбора антибиотиков в клинической практике.

Эндемичные растения Индии, Египта, Пакистана и других тропических стран: кассия трубчатая (бобовые), холарена пушистая (олеандр), терминалия, паэдерия (листья и кора), известные с древних времен как лекарственные средства при кишечных инфекциях, использовались для получения этанольного, этилацетатного и метанольного экстрактов. Антибактериальную активность препаратов изучали на когорте энтеропатогенов, изолированных из клинического материала больных с длительной диареей. В отличие от коллекционных штаммов, полученные культуры сальмонелл, эшерихий, шигелл и даже холерные вибрионы обладали мультирезистентностью к антибиотикам (макролидам, аминогликозидам, триметоприму, бета-лактамам, цефалоспорином, сульфамидам). Авторы детально изучили фитохимический состав экстрактов, который был представлен алкалоидами, эфирными маслами, гликозидами, терпеноидами, сахарами, сапонинами, таннинами, флавоноидами, индолом (паэдерия). В диско-диффузионном тесте испытали образцы экстрактов на бактериальных изолятах, полученных от больных с тяжелыми случаями диареи. Экстракты показали высокую и среднюю бактерицидную активность: зоны задержки роста патогенов колебались от 16 до 25 мм, что сопоставимо с коммерческими антибиотиками, однако *Vibrio cholerae* слабо ингибировались даже при высоких концентрациях. Рекомендовано включать экстракты лекарственных растений как интегративные компоненты в дополнение к антибиотикотерапии, используемой в алгоритмах ведения больных с острыми кишечными инфекциями [32].

Оставалось неизвестным, способны ли потенциально лекарственные растения разных географических зон России проявлять биологическую активность в отношении значимых возбудителей пищевых инфекций — листерий и токсинпродуцирующих эшерихий.

Для получения экстрактов были использованы дикорастущие растения: *Chenopodium album* (марь белая), *Plantago major* (подорожник), *Elythrigia elongata* (пырей), *Filipendula ulmaria* (таволга), принадлежащие к 4 семействам, произраста-

ющие повсеместно в Московском регионе, и *Nigella sativa* (чернушка, тмин), ареал распространения — Кавказ, Средняя Азия, многие южные страны. Фитохимический анализ выявил у растений наличие биологически активных соединений: алкалоидов, эфирных масел, гликозидов, терпеноидов, редуцированных сахаров, сапонинов, таннинов, флавоноидов.

С помощью жидкостной хроматографии получены различные экстракты — гексановый, этилацетатный, этанольный и 2 фракции уксуснокислого экстракта. Скрининговый анализ 24 препаратов, проведенный диско-диффузионным методом, выявил ингибирующую активность несвязавшейся уксуснокислой фракции подорожника, пырея и таволги на грамположительных листерий; грамотрицательные эшерихии были высокочувствительными к этим же фракциям. Гексановый и этилацетатный экстракты таволги и подорожника также обладали бактерицидным эффектом. В опытах по скорости редукции популяций *E.coli* и *L.monocytogenes* при обработке наиболее эффективными препаратами показано падение численности эшерихий через сутки (подорожник, пырей), листерий — через 2 суток (подорожник, таволга) [31].

Сравнение биологической активности антибиотиков, стандартно применяемых в этиотропной терапии листериоза и энтерогеморрагического эшерихиоза (ампициллина, гентамицина и цефтриаксона) с экстрактами *in vitro*, выявило их дозозависимое 6-кратное преимущество.

В свете новых научных достижений можно заключить: проблема природной очаговости болезней традиционно охватывает вопросы функционирования и эпидемического проявления как природных, так и антропоургических очагов. Техническая цивилизация создает новые места обитания для патогенных бактерий в объектах окружения человека (агрокомплексы, хранилища овощей, предприятия переработки пищевых продуктов), что провоцирует возникновение дополнительных путей их распространения. Эпидемическая опасность «рукотворных» очагов связана с формированием мощных вторичных резервуаров возбудителей.

Не менее важным является минимализация проблемы пищевых инфекций, связанных с растениями путем создания перспективных устойчивых к патогенам человека сельскохозяйственных культур, путем использования генов АМП дикорастущих растений для генетической трансформации; разработка на их основе новых высокоактивных соединений, преодолевающих барьеры полирезистентности ряда антибиотиков, стандартно применяемых в ветеринарии и медицине. Экологическая стратегия, направленная на поиск природных растений, являющихся уникальным источником биологически активных веществ, может быть использована в различных целях: в фармакологии как дополнение к традиционным антимикробным препаратам, для консервации пищевых продуктов, косметической медицине и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарева В.И. и др. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. М., 1998.
2. Литвин В.Ю., Пушкарева В.И. Биоценотические основы природной очаговости сапронозов. Журн. микробиол. 2004, 4: 21-24.
3. Литвин В.Ю., Сомов Г.П., Пушкарева В.И. Сапронозы как природно-очаговые болезни. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 1:10-16.
4. Персиянова Е.В. Характеристика взаимоотношений *Yersinia pseudotuberculosis* с растительными клетками. Автореф. дисс. канд.биол.наук. Владивосток, 2008.
5. Пушкарева В.И., Литвин В.Ю., Ермолаева С.А. Растения как резервуар и источник возбудителей пищевых инфекций. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012, 2:10-20.
6. Пушкарева В.И., Диденко Л.В., Годова Г.В., Овод А.А., Калашникова Е.А., Ермолаева С.А. *Listeria monocytogenes* — взаимодействие с агрокультурами и стадии формирования биопленок. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013, 1:42-49.
7. Пушкарева В.И., Диденко Л.В., Ермолаева С.А. Взаимодействие *Escherichia coli* с растениями на популяционном и клеточном уровнях. Успехи современной биологии. 2015, 135, (3): 297-306.
8. Сомов Г.П., Литвин В.Ю. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий. Новосибирск, Наука, 1988.

9. Abreu A.C., McBain A.J., Simxes M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat. Prod. Rep.* 2012, 29:1007-1021.
10. Barak J. D., Schroeder B.K. Interrelationships of food safety and plant pathology: the life cycle of human pathogens on plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2012, 50:12-26.
11. Berger C.N., Sodha S.V., Shaw K. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* 2010, 12(9): 2385-2397.
12. Boqvist S., Söderqvist K., Vegsholm I. Food safety challenges and One Health within Europe. *Acta Vet. Scand.* 2018, 3; 60(1):11186.
13. Brandl M.T., Amundson R. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74(8):2298-2306.
14. Buttner D., Bonas U. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology.* 2003, 6:312-319.
15. Buttner D., He S.Y. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol.* 2009, 150 (4):1656-1664.
16. Conter M., Paludi D., Zanardi E. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Int. Foodborn Infect.* 2009, 15;128(3):497-500.
17. Dinu L.d., Bach S. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77 (23):8295-8302.
18. Dong Y., Iniguez A.L., Ahmer B.M. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69 (3): 1783-1790.
19. EFSA and ECDC. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal.* 2013.
20. Europe PMC Funders Group. *Lancet Infect. Dis.* 2014, 11: 1073-1082.
21. Heaton J.S., Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behavior of enteropathogens in the phyllosphere. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 104: 613-626.
22. Hernandez-Reyes. *Salmonella*, a cross-kingdom pathogen infecting humans and plants. *FEMS Microbiology Letters.* 2013, 343:1-7.
23. Kim S.Y., Kang D.H., Kim J.K. Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. *J. of Food. Science.* 2011, 76: 41-46.
24. Mardafkan N., Iranmanesh M., Larijani K. et al. Chemical components and antibacterial activities of essential oils obtained from Iranian local *Lavandula officinalis* and *Thymus vulgaris* against pathogenic bacteria isolated from human. *J. Food Biosci. Technol.* 2015, 5:31-36.
25. Martinez J.L. Bacterial pathogens: from natural ecosystems to human hosts. *Environ. Microbiol.* 2013, 15: 325-333.
26. Mohamed H.G., Gaafar A.M., Soliman A.Sh. Antimicrobial Activities of Essential Oil of Eight Plant Species from Different Families Against some Pathogenic Microorganisms. *Res. J. Microbiol.* 2016, 11:28-34.
27. Perestrelo R., Silva C.L., Rodrigues F. et al. A Powerful approach to explore the potential of medicinal plants as a natural source of odor and antioxidant compounds. *J. Food Sci. Technol.* 2016, 53:132-144.
28. Prithiviraj B., Weir T., Bais H.P. Plant models for animal pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 2005, 7:315-324.
29. Pushkareva V.I., Ermolaeva S.A., Litvin Yu. V. Hydrobionts as reservoir hosts for infectious agents of saponoses. *Biology Bulletin.* 2010, 37:1-10.
30. Pushkareva V.I., Ermolaeva S.A. *Listeria monocytogenes* virulence factor listeriolysin O favors bacterial growth with the ciliate *Tetrahymena pyriformis* causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts. *BMC Microbiology.* 2010, 10:26. doi:10.1186/1471-2180-1026.
31. Pushkareva V.I., Slezina M. P., Korostyleva T.V. et al. Antimicrobial Activity of Wild Plant Seed Extracts against Human Bacterial and Plant Fungal Pathogens. *American J. Plant Sciences.* 2017, 8: 1572-1592.
32. Rath S.H., Radhy R.N. Antibacterial efficacy of five medicinal plants against multidrug-resistant enteropathogenic bacteria infecting under 5 hospitalized children. *J. Integrative Medicin.* 2015, 13:45-57.
33. Savoia D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol.* 2012: 979-990.

34. Schikora A., Garcia A.V., Hirt H. Plants as alternative hosts for Salmonella. *Trends in Plant Science*. 2012, 17(5): 245-249.
35. Soni S., Soni U.N. In-vitro Antibacterial and antifungal activity of select essential oils. *Int. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2014, 6: 586-591.
36. Tyler H.L., Triplett E.W. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria *Annual Review of Phytopathology*. 2008, 46: 53-73.
37. Watanabe Y., Ozasa K., Mermin J.H. et al. Factory outbreak of Escherichia coli O157:H7 infection in Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 1999, 5:123-153.
38. Witkowska A.M., Hickey D.K., Alonso-Gomes M., Wilkinson M. Evaluation of commercial herb and spice extract against selected food-borne bacteria. *J. Food Res.* 2013, 2:37-54.
39. World Health Organization (WHO). Critically important antimicrobials for human medicine. Geneva, 2013.
40. WHO. Antimicrobial resistance. *Antimicrob Resist Glob Rep surveillance*. Geneva, 2014.
41. WHO. Estimates of the global burden of foodborne diseases. Geneva, 2015.

Поступила 08.04.18

Контактная информация: Пушкарева Валентина Ивановна, д.б.н.,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (495)193-73-61

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

О.А.Носкова¹, Е.В.Анганова², Г.В.Гвак^{1,3}, Е.Д.Савилов^{2,3}

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СЕПСИСА

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

В течение последних десятилетий значительно возрос интерес мирового сообщества к проблеме сепсиса. Несмотря на достижения современной фундаментальной и клинической медицины, сепсис по-прежнему отличается значительная распространенность и высокая летальность. В статье обсуждены вопросы распространенности сепсиса в различных странах; показано, что ежегодно диагностируются миллионы случаев генерализованных гнойно-септических инфекций, отмечается устойчивый рост регистрируемого сепсиса в индустриально развитых странах, доля тяжелого сепсиса в структуре патологии на различных территориях варьирует от 2 до 43%. Сепсис по-прежнему остается в числе ведущих причин смерти больных, характеризуюсь существенным размахом госпитальной летальности (от 30,6 до 80,4%). Перечислены категории больных, относящиеся к группам высокого риска развития сепсиса. Обращено внимание на эпидемиологические проявления этого патологического синдрома в педиатрии. Показаны особенности этиологического спектра возбудителей сепсиса, возрастающая этиологическая значимость микроорганизмов с множественной антибиотикоустойчивостью (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., MRSA, VRE и др.). Учитывая клинико-эпидемиологическую, социальную и экономическую значимость сепсиса, изучение его эпидемиологических аспектов является важнейшим направлением работы здравоохранения.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 121—126

Ключевые слова: сепсис, эпидемиология, этиология, летальность, дети

О.А.Носкова¹, Е.В.Анганова², Г.В.Гвак^{1,2}, Е.Д.Савилов^{2,3}

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF SEPSIS

¹Irkutsk State Regional Children's Clinical Hospital, ²Scientific Center of Problems Family Health and Human Reproduction, Irkutsk; ³Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education — Branch of Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Russia

Last decades a sepsis problem attracts the increased interest in the world community. In spite of definite achievements of modern fundamental and clinical medicine, sepsis as before is characterized by significant dissemination and high lethality. The problems of sepsis spread in various countries are

discussed. It is shown that annually million cases of generalized purulent-septic infections are diagnosed. Steady sepsis increase is registered in industrially developed countries. Share of severe sepsis in pathology structure varies from 2 to 43% in different territories. Sepsis still remains among leading causes of human death being characterized by essential hospital lethality (from 30,6 to 80,4%). The patient categories belonging to high risk groups of sepsis development are shown. Special attention is directed to epidemiological manifestations of this pathological syndrome in pediatrics. Features of etiologic spectrum of the sepsis causative agents, increasing etiological importance of multi-resistant bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp.*, MRSA, VRE, etc.) are demonstrated. In consideration of clinical-epidemiological, social and economic significance of sepsis, studying of its epidemiological aspects is the major direction of activities for Public Health services.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 121—126

Key words: sepsis, epidemiology, etiology, mortality, children

Со времен Гиппократа, впервые применившего термин «сепсис», и вплоть до настоящего времени менялись суждения о сущности и природе этого патологического состояния. В течение последних десятилетий, благодаря активности авторитетных международных обществ и ассоциаций, занимающихся проблемой сепсиса, о нем сформировались основополагающие представления, но даже предложенные терминология, критерии диагностики и руководящие принципы терапии требуют дальнейшего комплексного и всестороннего обоснования. В современном понимании сепсис — это жизнеугрожающая дисфункция внутренних органов в результате нарушения регуляции ответа макроорганизма на инфекцию [7,9,16]. Несмотря на достижения фундаментальной и клинической медицины, сепсис по-прежнему отличается значительная распространенность и высокая летальность. Среди причин этого феномена можно обозначить расширение спектра инвазивных методов диагностики и лечения, цитостатическую и иммуносупрессивную терапию, проблему возрастающей устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам, отсутствие новых классов антибиотиков, пандемию ВИЧ-инфекции. Безусловно, в практическом значении важность клинических и диагностических подходов, направленных на раннее распознавание сепсиса, когда патологические процессы в организме еще потенциально обратимы, неоспорима. Поэтому современное представление патофизиологии данных состояний, их эпидемиологических особенностей оказывают первостепенное значение на совершенствование лечебно-диагностической методики и тактики ведения больных [9, 16].

По данным ВОЗ, в мире ежегодно диагностируется порядка 20-30 миллионов случаев генерализованных гнойно-септических инфекций [35]. В последние годы отмечается устойчивый рост регистрируемого сепсиса в индустриально развитых странах. Однако обобщенные данные о распространенности этого синдрома в литературе отсутствуют. По результатам исследований, проведенных американскими специалистами, частота сепсиса в США возросла с 82,7⁰/₀₀₀₀ (1979 г.) до 240,4⁰/₀₀₀₀ (2000 г.) с ежегодным приростом более 8% [22,27,33]. В Англии, Уэльсе, Северной Ирландии за восьмилетний период с 1996 г. удельный вес госпитализированного тяжелого сепсиса увеличился с 23,5 до 28,7% [29]. В европейских странах частота сепсиса на 1000 госпитализированных имеет существенные различия — от 79 в Словакии до 295 в Нидерландах [47]. В Германии (2013 г.) исследования, охватившие 75 отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), показали, что тяжелый сепсис и септический шок регистрировались у 12,6% пациентов ОРИТ, госпитальный сепсис составлял 57,2%, а летальность от него — 40,4% [32].

По сведениям зарубежных авторов, доля тяжелого сепсиса в структуре патологии может варьировать от 2 до 43%, при этом, более чем в половине случаев у больных развивается септический шок. Летальность может достигать 19-55%, а при развитии септического шока и синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдрома) риск летального исхода возрастает до 50-80%, несмотря на то, что на современном этапе достигнуты значительные успехи в здравоохранении, совершенствуются медицинские технологии и применяются инновационные методы лечения [16,28]. Мультицентровые исследования, проведенные на более чем семи тысячах больных сепсисом в 24 странах мира, получавших лечение в ОРИТ, свидетельствуют о существенном размахе госпитальной летальности: от 30,6% в Новой Зеландии до 80,4% в Алжире [10,40]. Тем не менее, в последние годы летальность при сепсисе повсеместно имеет тенденцию к снижению, что связано, скорее всего, с внедрением современных подходов к ранней диагностике таких тяжелых состояний и соответственно к раннему началу адекватной терапии [38].

Вплоть до настоящего времени одним из мало освещенных аспектов сепсиса является оценка его проявлений у детей. Эпидемиологические характеристики его инцидентности и смертности имеют существенные различия в разных возрастных группах, что связано с анатомо-физиологическими особенностями и компенсаторными возможностями детского организма, сопутствующей патологией, стратегией лечебных мероприятий [22]. Следует отметить, что у детей раннего возраста вследствие несовершенства терморегулирующей, выделительной и дыхательной систем генерализация инфекционного процесса происходит значительно быстрее, в связи с чем сепсис в 10 раз чаще встречается у детей до года, чем у детей более старшего возраста. По зарубежным данным, распространенность педиатрического сепсиса в США варьировала от 0,56 в 1995 г. до 0,86 на 1000 госпитализированных в 2005 г., а среди новорожденных — от 4,5 до 9,7 на 1000 родившихся соответственно. В ОРИТ детских больниц США в период 2004—2012 гг. отмечалось увеличение количества зарегистрированного тяжелого сепсиса с 6,2 до 7,7% с одновременным снижением смертности от него — с 18,9 до 12% [30,37,44]. По обобщенным данным, от сепсиса в мире умирают более семи миллионов детей в год. Больничная летальность от этого патологического состояния в детском возрасте существенно ниже, чем у взрослых [34]. Исследования S. L. Weiss et al., представленные по данным 128 ОРИТ 26 стран мира, показывают, что летальность от сепсиса у детей значительно варьирует. Например, в Северной Америке она составляет 21%, Европе — 29, Австралии — 32, а в Азии и Африке — по 40% [45]. Педиатрический сепсис в ОРИТ Колумбии в 18 % заканчивался летальным исходом [31], в ОРИТ Японии — в 19% [39].

В Российской Федерации распространенность сепсиса изучена недостаточно и ограничивается отдельными исследованиями частоты его встречаемости в ряде субъектов. При этом официальная регистрация генерализованных гнойно-септических заболеваний не отражает реалии проблемы. Это может быть связано с рядом причин. Во-первых, с отсутствием единообразного применения и соответственно понимания терминов и определений септических состояний и подхода к критериям их диагностики. Во-вторых, уклонением медицинскими работниками от официальной регистрации нозокомиального сепсиса с целью снижения бремени внеплановых мероприятий в рамках эпидемиологического надзора [17]. Многоцентровые двухэтапные исследования В.А. Руднова и др., проведенные по однодневным данным 62 центров в 29 субъектах РФ, показали, что треть пациентов, госпитализированных в ОРИТ, составили больные с инфекцией, у пятой части из которых развился септический шок, доля нозокомиального сепсиса составила 46,6%, а летальный исход наступил у 30,4% пациентов с инфекцией [14].

Анализ данных литературы свидетельствует, что к группам высокого риска развития сепсиса относятся: онкологические, ожоговые больные, пациенты с иммунодефицитными состояниями, длительно получающие кортикостероидные препараты, роженицы, дети с врожденными пороками развития, хромосомными заболеваниями, недоношенные, хирургические больные. Локализация первичного очага инфекции, в свою очередь, может определять риск возникновения и исхода заболевания. По данным зарубежных авторов, вероятность развития пневмониогенного и абдоминального сепсиса выше, и частота их возникновения может составлять 56—71% и 16—21% соответственно. Оперативные вмешательства, особенно объемные, повторные, часто несоизмеримы с компенсаторными возможностями организма, в связи с чем являются высоким травмирующим фактором, зачастую запускающим механизмы системного воспалительного ответа и развитие полиорганной недостаточности [12,20,46]. Среди хирургического сепсиса генерализация инфекционного процесса чаще всего происходит после оперативных вмешательств на брюшной полости. Причем при выполнении условно чистых операций на верхних отделах пищеварительного тракта сепсис возникает в 5% случаев, а при оперативных вмешательствах на толстом кишечнике этот риск возрастает до 30%. Летальность от абдоминального сепсиса занимает ведущее место в общей структуре летальности среди хирургических больных [3,7].

Кроме того, на клинический и биологический фенотип сепсиса влияет также пол, возраст, генетические факторы, окружающая среда, социально-экономические условия, определяющие уровень и доступность оказания медицинской помощи [33,41].

Необходимо отметить, что в контексте рассматриваемой проблемы развитие жизнеугрожающего состояния сопряжено в первую очередь с инфекционным началом. Возбудителями генерализованных инфекций могут выступать различные микроорганизмы: бактерии, вирусы, грибы, простейшие. Ведущая роль в этиологии сепсиса принадлежит бактериям, преимущественно условно патогенным, структура которых в разные годы существенно различалась.

В 40 — 50-е годы прошлого столетия доминирующим фактором выступали стрептококки и стафилококки, периодически сменяющие друг друга в лидерстве среди представителей грамположительной флоры. В 70—80 годы стали преобладать грамотрицательные микроорганизмы, удельный вес которых достигал, по данным ряда авторов, 45—49%. Значимая роль среди них принадлежала представителям семейства *Enterobacteriaceae* — кишечная палочка, протей, клебсиеллы [19,26]. В последние десятилетия вновь возрастает роль грампозитивных микроорганизмов, преимущественно стафилококков — *Staphylococcus epidermidis* и метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) [25,48]. Исследования К.П. Грувера, В.Б. Белобородова, проведенные за период 2000—2007 гг. на примере многопрофильного стационара (Москва), показали наибольшую значимость в развитии сепсиса грамположительной флоры (до 70%), но при утяжелении течения заболевания статистически значимо возростала роль грамотрицательных микроорганизмов. Ряд зарубежных авторов также указывают на преимущественное влияние грамотрицательной флоры на тяжесть течения и летальность от сепсиса. Вместе с тем, в настоящее время отсутствуют доказательные данные о превалировании той или иной группы бактерий, но отмечаются их существенные различия в структуре внебольничного и нозокомиального сепсиса [5,15,16].

Исследования, проведенные в РФ, показали высокую долю эпидемиологически значимых госпитальных штаммов микроорганизмов, выделяемых от пациентов стационаров различного профиля. Результаты многолетнего наблюдения показывают преобладающую роль в этиологии нозокомиальных инфекций, в том числе и сепсиса, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter* spp., микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), ванкомицинрезистентных *Enterococcus faecium*, а также MRSA [1,4,16,18].

В последние годы на фоне массового применения антимикробных препаратов широкого спектра действия возрастает роль микроорганизмов, ранее крайне редко встречавшихся — *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., *Serratia* spp., *E. faecium*, *Flavobacterium* spp. и др. [8,11,15,16]. На современном этапе в развитии тяжелых инфекций большое значение отводится грибам. Кандидемии уже далеко не редкое явление в стационарах, и их распространенность во многом зависит от контингента больных в медицинской организации, применяемого спектра антибактериальных и противогрибковых препаратов. Этиологическим фактором этой нозологической группы преимущественно выступают *Candida albicans*, удельный вес которых может достигать 52%. Однако грибы редко выступают монофактором в развитии септического процесса [2,23], и все чаще сепсис обусловлен микробными ассоциациями. Как правило, такие микст-формы осложняют течение заболевания и ухудшают его исход [21].

В течение последних десятилетий во всем мире особое клиническое значение приобретают микроорганизмы с множественной устойчивостью к антимикробным препаратам. Серьезную угрозу, особенно в ОРИТ, представляют полирезистентные грамотрицательные микроорганизмы, такие как *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. В отечественной литературе приводятся данные, что удельный вес штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих БЛРС, составляет около 80%. Доля *Escherichia coli* достигает 40%, MRSA — 33,5%. В Европе в 1,5 раза чаще отмечается неблагоприятный исход у больных с выделением MRSA. Вместе с тем, по данным европейских исследователей, его доля в структуре грампозитивной флоры заметно снижается [6,13,18].

Основываясь на изученных материалах, следует отметить, что этиологическая структура сепсиса динамична вследствие изменений экологических условий, трансформации патогенных свойств микроорганизмов, изменения реактивности макроорганизма. Спектр возбудителей во многом зависит от типа стационара, нозологической структуры, применяемых лечебно-диагностических методов, адекватности антимикробной терапии.

Расходы на лечение больных сепсисом существенны для здравоохранения любой страны. По данным зарубежных авторов, стоимость лечения пациентов с сепсисом в шесть раз превышает таковую без него. В США эти расходы составляют порядка 17 миллиардов долларов в год со средней стоимостью одного случая в 22,1 тыс. долларов, причем наибольшие затраты отмечаются для новорожденных, пациентов ОРИТ и хирургических больных. В Европе ежегодные расходы на лечение пациентов с сепсисом составляют около 7,6 млрд евро. По данным ВОЗ, стационарное лечение одного больного с сепсисом в этом регионе в 2000 г. составляло 710 евро в день, а в Канаде — 1033 [22,24,36,42]. Вместе с тем, материальные затраты напрямую зависят от продолжительности лечения. Так, в мире средняя длительность стационарного лечения больного с развитием генерализованного

инфекционного процесса, включая и отечественные данные, составляет 29 койко/дней, в ОРИТ — 16. В данном контексте интересны показатели стран Северной Америки — низкая летальность и небольшой средний койко/день в стационаре (16) и ОРИТ (11) [14,43].

Таким образом, анализ отечественных и иностранных научных данных показывает, что, несмотря на достигнутые важные междисциплинарные взаимодействия, касающиеся ключевых критериев диагностики септического процесса, оценки его тяжести и тактики лечебных назначений, изучение эпидемиологических показателей и факторов риска, способствующих развитию сепсиса, являются важнейшими направлениями работы мирового здравоохранения для выработки стратегии профилактики сепсиса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авилова Н.Д., Миронов А.Ю., Митрохин С.Д. Микробиологический мониторинг патогенов гнойно-септических заболеваний у онкологических больных. Человек и его здоровье. 2007, 2: 13-16.
2. Блохина Е.В. Кандидемии при гемобластозах. Дисс. канд. мед. наук. М., 2015.
3. Гельфанд Е.Б. Абдоминальный сепсис при перитоните: клиническая характеристика и эффективность антибактериальной терапии. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 1999.
4. Гончаров А.Д. Эпидемиологические особенности гнойно-септических инфекций, вызванных *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* в ожоговом и реанимационном отделении. Автореф. дисс. канд. мед. наук. СПб, 2005.
5. Грувер К.П., Белобородов В.Б. Клиническое значение бактериемий у больных сепсисом. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2011, 13 (1): 90-97.
6. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Липская Л.В., Коноваленко И.Б., Пясецкая М.Ф. Штаммы энтеробактерий, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра и металло-бета-лактамазу NDM-1, выделенные в стационарах Балтийского региона. Инфекция и иммунитет. 2013, 1: 29-36.
7. Ерюхин И.А., Гельфанд Б.Р., Шляпников С.А. Руководство по хирургическим инфекциям. И.А. Ерюхин (ред.). СПб, 2006.
8. Зузов С.А., Петрова М.М., Кречикова О.И. Анализ этиологии нозокомиальных и внебольничных интраабдоминальных инфекций у пациентов ОРИТ многопрофильного стационара. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2009, 11(4): 348-355.
9. Кевра М.К. Сепсис: новый взгляд на старую проблему. Медицинский журнал. (Беларусь). 2003, 4: 25-32.
10. Лекманов А.У., Миронов П.И. Комментарии к материалам SURVIVING SEPSIS CAMPAIGN-012. Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реанимации. 2013, 3 (2): 48-55.
11. Мартинович А.А. Динамика антибиотикорезистентности и эпидемиология инфекций, вызванных *Acinetobacter spp.*, в России. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010, 12 (2): 96-105.
12. Плоткин Л.В. Абдоминальный сепсис: обоснование выбора мониторинга и интенсивной терапии. Дисс. д-ра мед. наук. Екатеринбург, 2009.
13. Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Фаращук А.Н., Страчунский Л.С. (исследовательская группа РОСНЕТ). Неферментирующие грамотрицательные возбудители нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: проблемы антибиотикорезистентности. Клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия. 2006, 8: 232-248.
14. Руднов В.А., Бельский Д.В., Дехнич А.В. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования. Клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия. 2011, 13 (4): 294-303.
15. Руднов В.А. Сепсис. Современный взгляд на проблему. Клин. антимикробная терапия. 2000, 1: 4-10.
16. Савельев В.С., Гельфанд Б.Р. Сепсис: классификация, клинко-диагностическая концепция и лечение. В.С. Савельев (ред.). М., МИА, 2010.
17. Савина В.А., Колосовская Е.Н., Лебедев В.Ф. Актуальные вопросы эпидемиологии сепсиса. Медицинский альманах. 2014, 4 (34): 20-22.
18. Светличная Ю.С., Колосовская Е.Н., Кафтырева Л.А., Дарьина М.Г. Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за госпитальными инфекциями. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 1(74): 9-14.
19. Сепсисология с основами инфекционной патологии. Бочоришвили В.Г. (ред.). Тбилиси, 1988.
20. Шевченко Ю.Л., Гороховатский Ю.И., Азизова О.А., Замятин М.Н. Системный воспалительный ответ при экстремальной хирургической агрессии. М., РАЕН, 2009.
21. Шпрыкова О.Н. Микробиологические и эпидемиологические особенности микробных ассоциаций при гнойно-септических исследованиях. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Н.-Новгород, 2004.
22. Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit. Care Med. 2001, 29 (7): 1303-1310.

23. Arendrup M., Sulim S., Holm A. et al. Diagnostic issues, clinical characteristic, and outcomes for patients with candidemia. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49: 3300-3308.
24. Chalupka A.N., Talmor D. The economics of sepsis. *Crit. Care Clin.* 2012, 28 (1): 57-76.
25. Chen C.J., Huang Y.C., Chiu C.H. et al. Clinical features and genotyping analysis of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Taiwanese children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2005, 24(1): 40-45.
26. Cybéle L. Abad, Nasia Safdar. Antimicrobial Therapy of sepsis and septic shock— When are two drugs better than one? *Crit. Care Clin.* 2011, 27: 215-227.
27. Danai P., Martin G.S. Epidemiology of sepsis: Recent advances. *Current Infectious Disease Reports.* 2005, 7 (5): 329-334.
28. Fujishima S., Gando S., Saitoh D. et al. A multicenter, prospective evaluation of quality of care and mortality in Japan based on the Surviving Sepsis Campaign guidelines. *J. Infect. Chemother.* 2014, 20 (2): 115-120.
29. Harrison D.A., Welch C.A., Eddleston J.M. The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database. *Critical Care.* 2006, 10: 42.
30. Hartman M.E., Linde-Zwirble W.T., Angus D.C. et al. Trends in the epidemiology of pediatric severe sepsis *Pediatr. Crit. Care Med.* 2013, 14 (7): 686-693.
31. Jaramillo-Bustamante C., Marín-Agudelo A., Fernández-Laverde M. et al. Epidemiology of sepsis in pediatric intensive care units: First colombian multicenter study. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2012, 13 (5): 501-508.
32. Marx G., Litmathe J., Schulz J. et al. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med.* 2016, 42(12): 1980-1989.
33. Martin G.S., Mannino D.M., Eaton S. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *Engl. J. Med.* 2003, 348 (16): 1546-1554.
34. Mathias B., Mira J., Larson S.D. Pediatric sepsis. *Curr. Opin. Pediatr.* 2016, 28(3): 380-387.
35. Patel G.P., Gurka D.P., Balk R. A. New treatment strategies for severe sepsis and septic shock. *Curr. Opin. Crit. Care.* 2003, 9 (5): 390-396.
36. Pittoni G.M., Scatto A. Economics and outcome in the intensive care unit. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 2009, 22 (2): 232-236.
37. Ruth A., McCracken C.E., Fortenberry J.D. et al. Pediatric severe sepsis: current trends and outcomes from the Pediatric Health Information Systems database. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2014, 15(9): 828-38.
38. Sakai A.F., Rocha L.L., Pessoa M.S. et al. Patterns of organ dysfunction in severe sepsis and septic shock patients admitted to the ICU from the emergency department: a 4-year retrospective cohort. *Crit. Care.* 2015, 19: 78.
39. Shime N., Kawasaki T., Saito O. et al. Incidence and risk factors for mortality in pediatric severe sepsis: results from the national pediatric intensive care registry in Japan. *Int. Care Med.* 2012, 38: 1191-1197.
40. Silva E., Biasi Cavalcanti A., Bugano D.D. et al. Do established prognostic factors explain the different mortality rate in ICU septic patients around the world? *Minerva Anesth.* 2012, 78: 1215-1225.
41. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016, 315 (8): 801-810.
42. Tang R., Huang Y., Chen Q. et al. Relationship between regional lung compliance and ventilation homogeneity in the supine and prone position. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 2012, 56 (9): 1191-1199.
43. Vincent J.L., Rello J., Marshal J. et al. International study of prevalence and outcomes of infection in ICU. *JAMA.* 2009, 302: 2323-2329.
44. Watson R.S., Carcillo J.A., Linde-Zwirble W.T. et al. The Epidemiology of Severe Sepsis in children in the United States. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003, 167: 695-701.
45. Weiss S.L., Fitzgerald J.C., Pappachan J. et al. Global epidemiology of pediatric severe sepsis: The sepsis prevalence, outcomes, and therapies study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015, 191(10): 1147-1157.
46. White L.E., Chaudhary R., Moore L.J. et al. Surgical sepsis and organ crosstalk: the role of the kidney. *J. Surg. Res.* 2011, 167 (2): 306-315.
47. Zahore R., Firmment J., Strakova J. et al. Epidemiology of severe sepsis ICU of Slovak Republic. *Infection.* 2005, 33: 125-126.
48. Zaoutis T.E., Toltzis P., Chu J. et al. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among children with risk factors for health care-associated infection: 2001—2003. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2006, 25(4): 343-348.

Поступила 18.01.18

Контактная информация: Носкова Ольга Александровна,
664022, Иркутск, бульвар Гагарина, д.4. р.т. (3952) 24-30-68

СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Балахонov С.В., Войткова В.В., Дубровина В.И., Кoryтов К.М., Корнева А.В., Шкаруба Т.Т.* Иммунофенотипирование клеток крови экспериментальных животных, иммунизированных клеточными стенками *Francisella tularensis* разных подвидов 3
- Balakhonov S.V., Voitkova V.V., Dubrovina V.I., Korytov K.M., Korneva A.V., Shkaruba T.T.* Immunophenotyping of blood cells of experimental animals immunized with cellular walls of *Francisella tularensis* different subspecies
- Жукова Л.И., Рафеенко Г.К., Городин В.Н., Ванюков А.А.* Клинико-эпидемиологическая характеристика энтеровирусных непoliомиелитных инфекций в Краснодарском крае 9
- Zhukova L.I., Rafeenko G.K., Gorodin V.N., Vanyukov A.A.* Clinical-epidemiological characteristics of enterovirus nonpoliomyelitis infections in the Krasnodar territory
- Мочалкин П.А., Мочалкин А.П., Степанов Е.Г., Фарвазова Л.А., Попов Н.В.* Факторы, обуславливающие групповую заболеваемость ГППС в зимний период на территории Республики Башкортостан 15
- Mochalkin P.A., Mochalkin A.P., Stepanov E.G., Farvazova L.A., Popov N.V.* Factors Responsible for cluster HFRS morbidity during winter season in the territory of the Republic of Bashkortostan
- Марцев А.А., Рудакова В.М., Илина А.В.* Эпидемиологическая и эпизоотическая обстановка по природно-очаговым зоонозным инфекциям во Владимирской области 20
- Martsev A.A., Rudakova V.M., Ilina A.V.* Epidemic and epizootic situation of natural-focal zoonotic infections in Vladimir region
- Яковлева И.В., Курбатова Е.А., Ахматова Э.А., Сухова Е.В., Яшунский Д.В., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э., Свиридов В.В.* Получение моноклональных антител к тетрасахариду — синтетическому аналогу капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 14 и их иммунохимическая характеристика 26
- Yakovleva I.V., Kurbatova E.A., Akhmatova E.A., Sukhova E.V., Yashunsky D.V., Tsvetkov Yu.E., Nifantiev N.E., Sviridov V.V.* The production of monoclonal antibodies to tetrasaccharide — synthetic analogue of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* of serotype 14 and their immunochemical characterization
- Фельдблюм И.В., Субботина К.А., Новгородова С.Д., Игнатьев Г.М., Алыева М.Х., Ерофеева М.К., Орловский В.Г., Ленева И.А., Мельников С.Я., Казакова Е.В., Начарова Е.П., Трухин В.П.* Реактогенность, безопасность и иммуногенность отечественной гриппозной инактивированной расщепленной вакцины Флю-М при иммунизации взрослых 18-60 лет 31
- Feldblyum I.V., Subbotina K.A., Novgorodova S.D., Ignatev G.M., Alyeva M.Kh., Erofeeva M.K., Orlovsky V.G., Leneva I.A., Melnikov S.Ya., Kazakova E.V., Nacharova E.P., Trukhin V.P.* Reactogenicity, safety and immunogenicity of domestic Flu-M inactivated split influenza vaccine for the immunization of adults aged between 18 and 60
- Пименова А.С., Борисова О.Ю., Петрова М.С., Власов Е.В., Воронина И.С., Борисова А.Б., Афанасьев С.С., Донских Е.Е., Кафарская Л.И., Аleshкин В.А., Аleshкин А.В., Афанасьев М.С., Караулов А.В.* Оптимизация метода ускоренной генодиагностики коклюша на основе изотермической амплификации (LAMP) 37
- Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Petrova M.S., Vlasov E.V., Voronina I.S., Borisova A.B., Afanasiev S.S., Donskich E.E., Kafarskaya L.I., Aleshkin V.A., Aleshkin A.V., Afanasiev M.S., Karaulov A.V.* Optimization of a method of isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of whooping cough
- Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Милованова А.В., Аммуp Ю.И., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Жаворонок С.В., Зверев В.В.* Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита E 3 генотипа и оценка его антигенных свойств 46
- Alatortseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Luhverchik L.N., Milovanova A.V., Ammur Yu.I., Mikhailov M.I., Kyuregyan K.K., Zhavoronok S.V., Zverev V.V.* Obtaining the recombinant ORF3 protein of hepatitis E genotype 3 and evaluation of its antigenic properties
- Мазурина С.А., Данилина Г.А., Смирнова М.Ю., Осипова Г.Л., Гервазиева В.Б., Конищева А.Ю., Оспельникова Т.П.* Микробиота нижних отделов дыхательных путей при хронических obstructивных заболеваниях легких 53
- Mazurina S.A., Danilina G.A., Smirnova M.Yu., Osipova G.L., Gervazieva V.B., Konischeva A.Yu., Ospelnikova T.P.* The microbiota of lower airways in patients with chronic obstructive lung diseases

- Малыгина О.Г., Бажукова Т.А.* Становление микробиоценоза толстой кишки у недоношенных детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела на первом году жизни. 60
Malygina O.G., Bazhukova T.A. Large bowel microbiocentosis in immature infants with very low and extremely low body weight in the first year of life
- Цветкова Е.В., Алешина Г.М., Леонова Л.Е., Шамова О.В., Романовская Е.В., Кокряков В.Н.* Функциональные свойства θ -дефенсинов из лейкоцитов крови гамадрила *Papio hamadryas*. 66
Tsvetkova E.V., Aleshina G.M., Leonova L.E., Shatova O.V., Romanovskaya E.V., Kokryakov V.N. Functional effects of θ -defensins from blood leukocytes of baboon *Papio hamadryas*
- Чеканова Т.А., Шпынов С.Н., Тарасевич И.В.* Авидность специфических IgG к *Rickettsia prowazekii* как дополнительный критерий серологической дифференциальной диагностики эпидемического сыпного тифа и его рецидивирующей формы — болезни Брилля-Цинссера. 73
Chekanova T.A., Shpyunov S.N., Tarasevich I.V. Avidity of IgG to *Rickettsia prowazekii* as an additional criterion for the serological differential diagnosis of the epidemic typh and its recrudescence form — Brill-Zinsser disease
- Седов А.М., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Санин А.В., Зубашев И.К., Измestьева А.В., Иванова А.М., Парфенова Т.М., Шульженко А.Е., Зуйкова И.Н., Шубелко Р.В., Халдин А.А., Исаева Д.Р., Селькова Е.П., Григорьева Е.А.* Механизм противовирусного действия и оценка эффективности нового препарата Фортепре[®] при комплексной терапии хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекции генитальной локализации 81
Sedov A.M., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Sanin A.V., Zubashev I.K., Izmestieva A.V., Ivanova A.M., Parfenova T.M., Shulzhenko A.E., Zuikova I.N., Shubelko R.V., Khaldin A.A., Isaeva D.R., Selkova E.P., Grigorieva E.A. Mechanism of antiviral action and evaluation of the efficacy of the new preparation Fortepren[®] in the complex therapy of chronic recurrent herpesvirus infection of genital localization
- Бурмистров Е.М., Рыбалкина Т.Н., Каражас Н.В., Бошняк Р.Е., Веселовский П.А., Лысенкова М.Ю., Мескина Е.Р., Сташко Т.В.* Выявление герпесвирусных инфекций у детей первого полугодия жизни 87
Burmistrov E.M., Rybalkina T.N., Karazhas N.V., Boshyan R.E., Veselovsky P.A., Lysenkova M.Yu., Meskina E.R., Stashko T.V. Detection of herpesvirus infections in children of the first six months of life
- Шишкова Ю.С., Бабикова М.С., Емелина А.С., Филимонова О.И., Тезиков Д.А., Долгушин И.И.* Микрофлора полости рта и состояние факторов противoinфекционной защиты у лиц, использующих стоматологические ортопедические конструкции (СОК). 92
Shishkova Yu.S., Babikova M.S., Emelina A.S., Filimonova O.I., Tezikov D.A., Dolgushin I.I. Microflora of the oral cavity and condition of anti-infection protection factors in persons using dental orthopedic constructions (DOC)

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ (SHORT COMMUNICATION)

- Савлевич Е.Л., Иванова М.А., Мокроносова М.А., Горбунов С.А., Якушенкова А.П.* Сезонные особенности микробного пейзажа небных миндалин у здоровых студентов 98
Savlevich E.L., Ivanova M.A., Mokronosova M.A., Gorbunov S.A., Yakushenkova A.P. Seasonal features of the microbial landscape of palatine tonsils in healthy students

ЗАМЕТКА ИЗ ПРАКТИКИ (CLINICAL NOTE)

- Файзулов Е.Б., Корчевая Е.Р., Марков Д.В., Петруша О.А., Зверев В.В.* Проблема контаминации культур клеток ортореврусами млекопитающих 103
Faisulov E.B., Korchevaya E.P., Markov D.V., Petrusha O.A., Zverev V.V. The problem of cell cultures contamination with mammalian orthoreoviruses

ОБЗОРЫ (REVIEWS)

- Михайлова Н.А., Воеводин Д.А., Поддубиков А.В.* Коррекция дисбиоза — основа регенеративной медицины 107
Mikhailova N.A., Voevodin D.A., Poddubikov A.V. Disbiosis correction — the basis of regenerative medicine
- Пушкарева В.И., Ермолаева С.А.* Экспериментальное обоснование роли растений в эпидемиологии сапронозных инфекций 113
Pushkareva V.I., Ermolaeva S.A. Experimental evidences on a crop plant role in epidemiology of sapronotic (soil-borne) bacterial infections
- Носкова О.А., Анганова Е.В., Гвак Г.В., Савилов Е.Д.* Эпидемиологические аспекты сепсиса 121
Noskova O.A., Anganova E.V., Gvak G.V., Savilov E.D. Epidemiological aspects of sepsis