

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

СОЮЗ ПЕДИАТРОВ РОССИИ

ООО «С-ИНФО»

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

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

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

1

январь—февраль

МОСКВА 2016

«С-ИНФО»

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

АДАМБЕКОВ Д.А. (Бишкек), БРУСИНА Е.Б. (Кемерово), ЗУЕВА Л.П. (Санкт-Петербург), КОРОЛЮК А.М. (Санкт-Петербург), МАГАЗОВ Р.Ш. (Уфа), МЕЛЬНИЧЕНКО П.И. (Москва), МИНИН Г.Д. (Уфа), ПРИСАКАРЬ В.И. (Кишинев), СОЛОДОВНИКОВ Ю.П. (Москва), ТИТОВ Л.П. (Минск), ФРОЛОВ А.Ф. (Киев), ШАРКОВА В. (Владивосток), ШВАГЕР М.М. (Ростов), ШЕНДЕРОВ Б.А. (Москва), ШКАРИН В.В. (Н. Новгород), ШУРАТОВ И.Х. (Алматы), ЯСТРЕБОВ В.К. (Омск)

Адрес редакции и издателя:
121059, Москва, ООО «С-инфо», а/я 88,
редакция ЖМЭИ (для отправки статей и запросов о прохождении статей)
Телефон редакции: (495) 796-92-91 (не для справок о прохождении статей)

Зав. редакцией Л.В.Иваничева

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.
Свидетельство ПИ № ФС77-36745

Индексы $\begin{matrix} 71436 \\ 16729 \end{matrix}$: 1 111 р. 44 к. (цена за полугодие)

Журнал входит в базу данных: PubMed, Scopus, Web of Science, Chemical Abstract.
Журнал входит в перечень ВАКовских изданий.

<http://www.jmicrobiol.com>

Подписано в печать 20.01.16. Выход в свет 09.02.16. Формат 70x108 1/16
Печать офсетная. Тираж 1000. Заказ 22-2016

Отпечатано в АО «Красная Звезда»
123007, Москва, Хорошевское шоссе, д. 38
Тел.: (495)941-28-62, (495)941-34-72, (495)941-31-62
www.redstarph.ru
E-mail: kr_zvezda@mail.ru

© «С-инфо», 2016

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Н.А.Селянская, И.В.Архангельская, А.С.Водопьянов, С.О.Водопьянов,
В.Д.Кругликов, С.Ю.Водяницкая, Л.М.Веркина, Н.Б.Непомнящая*

ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* НЕ O1/НЕ O139, ИЗОЛИРОВАННЫХ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2014 ГОДУ

Ростовский-на-Дону противочумный институт

Цель. Сравнительное изучение антибиотикорезистентности и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae* не O1/не O139, выделенных на территории Ростовской области в 2014 г. *Материалы и методы.* Антибиотикограммы штаммов определяли методом серийных разведений в плотной питательной среде в соответствии с МУК 4.2.2495-09 (2009). Общепринятыми методами проводили фено-, серо-, VNTR-типирование. *Результаты.* Изученные штаммы принадлежали к виду *V.cholerae*, не агглютинировались сыворотками O1 и O139, являлись атоксигенными, гемолизположительными, не содержали генов холерного токсина и токсинорегулируемых пилей адгезии, содержали гены гемагглютинин/протеазы, протеазы PrtV, коллагеназы, цитотонического фактора Cef, белка наружной мембраны OmpW, tol- и vps-кластеров, регуляторные гены toxR и hapR. Антибиотикограммы штаммов показали наличие культур, устойчивых к ампициллину, цефтазидиму, фуразолидону, триметоприму/сульфаметоксазолу с промежуточной резистентностью к стрептомицину, канамицину, гентамицину, амикацину, нетилмицину. Около 20% изолятов обладали множественной лекарственной устойчивостью. Данные VNTR- и генотипирования подтвердили вероятность водного пути передачи инфекции. *Заключение.* Для своевременного выявления изменений генетических характеристик, антибиотикорезистентности необходимо проведение мониторинга свойств культур из объектов окружающей среды.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 3—9

Ключевые слова: холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп, антибиотикорезистентность, VNTR-генотип

*N.A.Selyanskaya, I.V.Arkhangel'skaya, A.S.Vodopianov, S.O.Vodopianov,
V.D.Kruglikov, S.Yu.Vodyanitskaya, L.M.Verkina, N.B.Nepomnyaschaya*

TYPING OF *VIBRIO CHOLERAЕ* NON O1/NON O139 STRAINS, ISOLATED IN ROSTOV REGION IN 2014

Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Russia

Aim. Comparative study of antibiotics resistance and VNTR-typing of *Vibrio cholerae* non O1/non O139 strains, isolated on the territory of Rostov region in 2014. *Materials and methods.* Antibiotograms of strains were determined by serial dilution method in dense nutrient medium according to MG 4.2.2495-09 (2009). Pheno-, sero- and VNTR-typing was carried out by conventional methods. *Results.* The studied strains belonged to *V. cholerae* species, did not agglutinate with O1 and O139 sera, were atoxigenic, hemolysis-positive, did not contain genes of cholera toxin and toxin-coregulating pili of adhesion, contained genes of hemagglutinin/tease, protease PrtV, collagenase, cytotonic factor Cef, outer membrane protein OmpW, tol- and vps-clusters, regulatory genes toxR and hapR. Antibiotograms of the strains have shown the presence of cultures, resistant to ampicillin, ceftazidime, furazolidone, trimethoprim/sulfamethoxazole with intermediate resistance to streptomycin, kanamycin, gentamycin, amikacin, netilmicin. Approximately 20% of isolates had multiple drug resistance. Data of VNTR- and geno-typing

confirmed a possibility of water transmission route of the infection. *Conclusion.* Execution of monitoring of cultures from environmental samples is necessary for timely detection of genetic characteristics, antibiotics resistance.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 3—9

Key words: non O1/non O139 serogroup cholera vibrios, antibiotics resistance, VNTR-genotype

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания, вызываемые холерными вибрионами не O1/не O139 серогрупп, регистрируются ежегодно как на различных территориях Российской Федерации, так и в других странах мира. Чаще всего это гастроэнтериты различной степени тяжести, реже заболевания с внекишечной локализацией у лиц с ослабленным иммунитетом. Больные с диагнозом «острые кишечные инфекции» выявляются, как правило среди лиц, проживающих на побережьях различных водоемов. На территории Ростовской области только в 2014 г. от госпитализированных больных с диагнозом «гастроэнтерит» было выделено 11 штаммов *Vibrio cholerae* не O1/не O139. Ранее нами было показано, что клинические штаммы *V. cholerae* не O1/не O139, выделенные в Ростовской области с 2000 по 2014 гг., лишены генов холерного токсина и имеют генетическую неоднородность. В то же время, представляется интересным сравнение этих штаммов с холерными вибрионами, изолированными из морской воды Азовского моря и балластных вод судов в это же время для выяснения родственных связей между ними, что возможно с помощью применения VNTR-генотипирования.

Настораживает факт появления в последнее время штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, устойчивых к ряду антибиотиков, во многих странах. Так, среди клинических изолятов, выделенных в 1968 — 2009 гг. в России и за рубежом, выявлено расширение спектра антибиотикорезистентности штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, присутствие у возбудителя одновременно до 5 различных маркеров резистентности и разнообразие их сочетаний [5]. В странах Юго-Восточной Азии среди штаммов холерных вибрионов, выделенных от госпитализированных больных в Калькутте (Индия) в 1989 — 1991 гг., ни один не обладал устойчивостью к налидиксовой кислоте [10], а среди *V. cholerae*, выделенных там же с 2002 по 2010 гг., резистентность к этому антибиотику уже составила 57,6% [6]. В Таиланде (1993 — 1995) 58% клинических штаммов холерных вибрионов были резистентны к тому или иному антибиотику, а 41% обладали множественной устойчивостью к 4 и более антибиотикам [7].

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение антибиотикорезистентности и VNTR-типирование штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, выделенных из различных объектов на территории Ростовской области в 2014 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы штаммы *V. cholerae* не O1/не O139, изолированные в июле и августе 2014 г. Из них 11 — от больных, госпитализированных в инфекционное отделение г. Таганрог, 8 — из воды Таганрогского залива Азовского моря и 10 — из балластных вод судов. Антибиотикочувствительные штаммы *V. cholerae* O1 P-5879 $ctx^+tcpA^+toxR^+$ (1972 г., г. Таганрог) и *V. cholerae* не O1/не O139 P-9741 (KM 162) (ctx^-tcp^-) служили в качестве контроля.

Чувствительность/устойчивость штаммов холерных вибрионов к 11 антибактериальным препаратам изучали методом серийных разведений в плотной питательной среде (агар Мюллера-Хинтона, pH 7,5, HIMEDIA, Индия). Посевная доза взвесей 16 — 18-часовых агаровых культур составляла 10^6 м.к.

по отраслевому стандарту мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ОСО-42-25-59-86 П).

Интерпретацию результатов проводили в соответствии с [4].

Доверительные интервалы для частот и долей рассчитывали по методу Вальда с коррекцией по Агрести-Коуллу с вероятностью 95% [1].

Фенотипические свойства определяли общепринятыми методами. Серотипирование проводили с помощью набора сывороток к 80 серогруппам, полученных в Ростовском противочумном институте, VNTR-типирование — по [2] с использованием специфических праймеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ

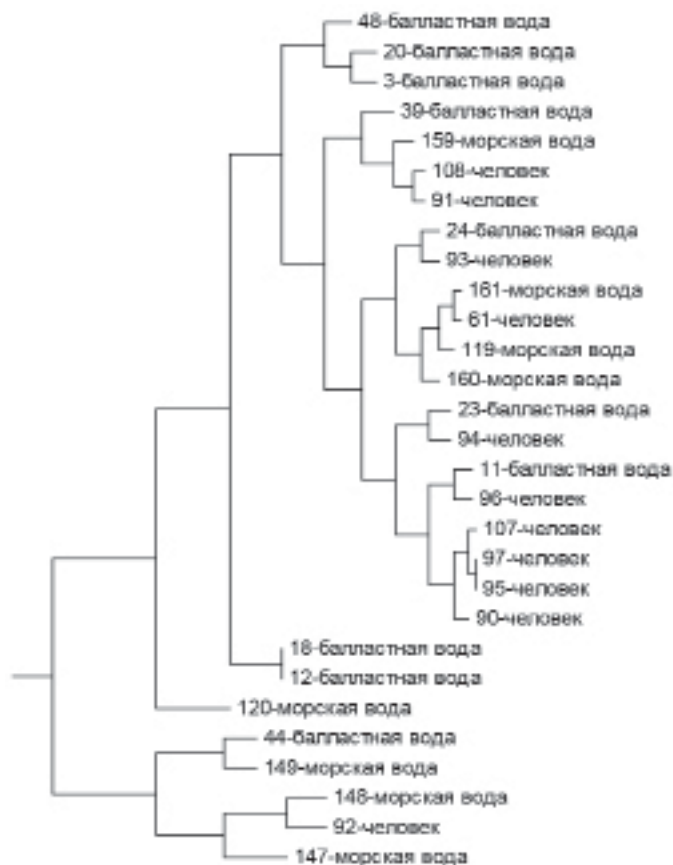
В 1960 — 1970-е годы в Ростовской области наблюдались вспышки острых кишечных инфекций (ОКИ), вызванные холерными вибрионами не O1/не O139 серогрупп, после чего в тех же районах периодически регистрировались спорадические заболевания. С 2000 по 2014 гг. в инфекционные отделения стационаров Ростовской области поступили 30 больных, зараженных *V.cholerae* не O1/не O139, из которых 11 были выявлены в 2014 году. Среди заболевших с 2000 г. преобладали дети от 1 до 9 лет — 63,4% (19 из 30), а в 2014 году их было 90,1% (10 из 11).

Для сравнения с 11 клиническими изолятами 2014 года были отобраны культуры холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенные при мониторинговых исследованиях на этой же территории в этот же промежуток времени.

По фенотипическим и генотипическим свойствам все изученные штаммы принадлежали к виду *V.cholerae*, но не агглютинировались сыворотками O1 и O139 в реакции слайд-агглютинации, являлись атоксигенными, гемолиз-позитивными и не содержали генов холерного токсина и токсинкорректируемых пилей адгезии. При серотипировании клинических штаммов серогруппа установлена у 5 (45,5%), выявлено по одному штамму O2 и O8 серогрупп и 3 штамма O39 серогруппы.

Для выяснения родственных связей между исследуемыми штаммами были проведены VNTR-анализ и ПЦР-типирование штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, выделенных из балластных вод, воды Азовского моря и от больных (рис.).

Все штаммы содержали гены гемагглютинин/протеазы, протеазы PrtV, кол-



Дендрограмма, построенная на основе кластерного анализа распределения VNTR-штаммов *V. cholerae* не O1/не O139.

лагеназы, цитотонического фактора Cef, белка наружной мембраны OmpW, tol- и vps-кластеров (кодирующих факторы персистенции), регуляторные гены toxR и harR, структурные гены T6SS и не содержали генов холерного токсина, профага RS1, регулятора ToxT (входящего в состав VPI), термостабильного, шигаподобного токсинов, прямого термостабильного и родственного ему гемолизина, использованных в качестве мишеней гена острова патогенности VPI — ген токсинорегулируемых пилей tcrA классического типа, а также tagA, tor и acfB при отсутствии toxT и aldA. Остальные гены содержались в различных сочетаниях. Выявить коррелятивные связи между разными методами не удалось, однако данные VNTR- и гено-типирования подтверждают, что, несмотря на то, что основная масса водных изолятов отличалась от клинических, в то же время, в один кластер попали некоторые штаммы с разным источником выделения: по данным VNTR: 23 и 94; 96 и 11; 148 и 92, а по набору генов: 93; 94 с 3 и 11. Это еще раз свидетельствует о вероятном водном пути передачи инфекции и диктует необходимость дальнейшего мониторинга свойств культур из объектов окружающей среды для своевременного выявления изменений как генетических характеристик, так и антибиотикорезистентности.

Антибиотикограммы штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, выделенных в Ростовской области в 2014 г., показали наличие культур, устойчивых к ампициллину (МПК=16,0 — 64,0 мг/л), цефтазидиму (МПК=8,0 мг/л), фуразолидону (МПК=16,0 мг/л), триметоприму/сульфаметоксазолу (МПК=64,0/320,0 мг/л), с промежуточной резистентностью к стрептомицину (МПК=32,0 мг/л), канамицину (МПК=32,0 мг/л), гентамицину (МПК=8,0 мг/л), амикацину (МПК=16,0 мг/л), при сохранении чувствительности к тетрациклинам (МПК=0,25 — 1,0 мг/л), левомицетину (МПК=0,5 — 1,0 мг/л), рифампицину (МПК=1,0 — 2,0 мг/л), налидиксовой кислоте (МПК=0,5 — 1,0 мг/л), нетилмицину (МПК=2,0 — 4,0 мг/л) и фторхинолонам (МПК=0,001 мг/л) (табл. 1).

Наибольшее количество холерных вибрионов проявляло устойчивость к ампициллину: 45,5 (21,2 — 72)% штаммов, выделенных от людей, и 57,9 (36,2 — 76,9)%,

Таблица 1. Антибиотикограммы штаммов *V.cholerae* не O1/не O139, выделенных в Ростовской области в 2014 г.

Антибактериальный препарат	Пограничные значения МПК, мг/л		Значения МПК для контрольных штаммов, мг/л		Диапазон значений МПК	
	S	R	P-9741	P-5879	От людей (11)	Из внешней среды (18)
Доксициклин	≤2,0	>8,0	0,25	0,25	0,25—0,5	0,25—0,5
Тетрациклин	≤4,0	>8,0	1,0	1,0	0,5—1,0	0,5—1,0
Левомецетин	≤4,0	≥16,0	2,0	2,0	0,5—1,0	0,5—1,0
Налидиксовая кислота	≤4,0	≥16,0	2,0	1,0	0,5—1,0	0,5—1,0
Ципрофлоксацин	<0,1	≥1,0	0,002	0,001	0,001	0,001
Стрептомицин	≤16,0	>32,0	4,0	2,0	4,0—16,0	8,0—32,0
Гентамицин	≤4,0	>8,0	2,0	0,5	2,0—8,0	2,0—8,0
Канамицин	≤16,0	>32,0	4,0	2,0	4,0—32,0	8,0—32,0
Амикацин	≤8,0	>16,0	4,0	2,0	2,0—16,0	4,0—16,0
Нетилмицин	≤4,0	>8,0	4,0	2,0	2,0—4,0	2,0—4,0
Ампициллин	≤4,0	≥16,0	4,0	2,0	4,0—16,0	4,0—64,0
Цефтазидим	<1,0	≥8,0	0,04	0,01	1,0—8,0	1,0—4,0
Рифампицин	≤4,0	≥16,0	2,0	1,0	1,0—4,0	1,0—2,0
Фуразолидон	≤4,0	≥16,0	2,0	2,0	2,0—16,0	2,0—16,0
Триметоприм/сульфаметоксазол	≤2,0/38,0	≥8,0/152,0	1,0/5,0	2,0/10,0	1,0/5,0—64,0/320,0	0,5/2,5—64,0/320,0

Примечание. S — чувствительный; R — устойчивый.

Таблица 2. Антибиотикорезистентные фенотипы штаммов *V.cholerae* не O1/не O139, выделенных в Ростовской области в 2014 г.

Объект выделения	Число маркеров устойчивости	Km	Ap	Gm	Am	Sm	Tmp/Smz	Fur	Cz	Число выявленных фенотипов	
										абс.	% (ДИ)
Люди	0	+	+	+	+	+	+	+	+	5	45,5 (21,2—72)
	2	—	+	+	+	+	—	+	+	1	9 (<0,01—39,9)
	2	+	—	+	—	+	+	+	+	1	9 (<0,01—39,9)
	2	+	—	+	+	+	+	—	+	1	9 (<0,01—39,9)
	3	+	—	—	—	+	+	+	+	1	9 (<0,01—39,9)
	3	+	—	+	—	+	+	+	—	2	18,2 (4—48,9)
Внешняя среда	0	+	+	+	+	+	+	+	+	5	26,3 (11,5—49,1)
	1	+	—	+	+	+	+	+	+	4	21 (7,9—43,9)
	1	+	+	+	+	+	—	+	+	4	21 (7,9—43,9)
	2	+	—	+	+	+	—	+	+	1	5,2 (<0,01—26,5)
	2	+	—	+	+	+	+	—	+	1	5,2 (<0,01—26,5)
	3	—	—	+	+	+	+	—	+	1	5,2 (<0,01—26,5)
	3	+	—	+	+	+	—	—	+	1	5,2 (<0,01—26,5)
	4	—	—	—	—	+	+	+	+	1	5,2 (<0,01—26,5)
	5	—	—	—	—	—	+	+	+	1	5,2 (<0,01—26,5)

Примечание. Km — канамицин, Tmp/Smz — триметоприм/сульфаметоксазол, Ap — ампициллин, Am — амикацин, Fur — фуразолидон, Gm — гентамицин, Cz — цефтазидим, Sm — стрептомицин; + чувствительность, — устойчивость к антибактериальным препаратам; ДИ — доверительный интервал.

выделенных из объектов окружающей среды. К представителям аминогликозидов (амикацину, канамицину, гентамицину, стрептомицину) оказалось устойчиво до 31,6 (15,2 — 54,2) % культур, выделенных от людей, и до 10,5 (1,7 — 32,6)%, выделенных из объектов окружающей среды. Среди *V.cholerae* не O1/не O139, выделенных от людей, 9 (<0,01 — 39,9)% имели устойчивость к триметоприму/сульфаметоксазолу (МПК=16,0/80,0 мг/л) и фуразолидону, 18,2 (4 — 48,9)% — к цефтазидиму. Устойчивость к этим препаратам у культур, выделенных из объектов внешней среды, составляла соответственно 31,6 (15,2 — 54,2)%, 15,8 (4,7 — 38,4)% и 0%. Таким образом, из объектов внешней среды чаще выделялись штаммы, устойчивые к ампициллину, триметоприму/сульфаметоксазолу, фуразолидону.

Фенотипы антибиотикорезистентности и распределение штаммов по количеству маркеров устойчивости отражены в табл. 2.

Так, менее половины штаммов, выделенных от людей, и всего 26,3% штаммов из объектов окружающей среды оказались чувствительными к взятым в исследование антибактериальным препаратам. При этом около 27% клинических изолятов были устойчивы к двум антибактериальным препаратам и столько же обладали множественной лекарственной устойчивостью.

Антибиотикорезистентный фенотип холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды, был более разнообразен и включал одновременно до 5 маркеров (5,2%), а число штаммов с множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам составило 20,8%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о чрезвычайном разнообразии биологических свойств холерных вибрионов как изолированных от людей, так и из водных объектов окружающей среды. Генетическая неоднородность популяции вибрионов не O1/не O139 серогрупп, циркулирующих на одной территории, свидетельствует, с одной стороны, о наличии огромного числа клонов микроорганизмов с разным набором генетической информации, а с другой сто-

роны, о высокой скорости изменчивости вибрионов. Разнообразие генетических характеристик, пластичность генома, присутствие важнейших факторов вирулентности в различных штаммах *V. cholerae* не O1/не O139 позволили некоторым исследователям сделать вывод о том, что холерные вибрионы являются резервуаром генов вирулентности во внешней среде [9] и существует реальная возможность появления новых серогрупп этих возбудителей, способных вызывать тяжелую диарею [11]. Так, В.Ж. Halty et al. [8], изучив токсигенные штаммы *V. cholerae* O75 и O141 серогрупп, выделенные от больных в США в 2010 — 2011 гг. и ранее, сделали предположение о существовании некой неизученной ветви штаммов, вызывающих холеру с высоким уровнем заболеваемости.

При сравнительном анализе полученных данных нами не было выявлено существенных коррелятивных связей между серогрупповой принадлежностью *V. cholerae* не O1/не O139, VNTR- и ПЦР-генотипами. У одних штаммов наблюдался больший, у других — меньший набор генов факторов патогенности. Тем не менее, даже содержащие минимальный набор генов штаммы оказались способными вызвать заболевания. На сегодняшний день у холерных вибрионов выявлен целый ряд токсических субстанций, и полидетерминантный характер патогенности вида *Vibrio cholerae* уже не вызывает сомнений [3].

Продолжающаяся на протяжении нескольких десятилетий регистрация ОКИ, вызванных вибрионами не O1/не O139 серогрупп, и постоянное выделение их из объектов окружающей среды позволяют сделать вывод о том, что на территории Ростовской области сложились благоприятные условия, способствующие циркуляции возбудителя и (в определенных случаях) проявлению им патогенных свойств.

Выявление среди штаммов, выделенных в Ростовской области в 2014 гг., множественной антибиотикоустойчивости говорит о необходимости постоянного контроля изменений их чувствительности/устойчивости к антибактериальным препаратам. С одной стороны, основой выбора средств этиотропной терапии должна быть антибиотикограмма (резистограмма) выделенного от больного возбудителя с учетом клинических проявлений инфекции (кишечная или внекишечная локализация возбудителя). С другой стороны, результаты антибиотикочувствительности штаммов, циркулирующих в водных объектах окружающей среды на определенной территории, должны быть учтены при рекомендации основных и дополнительных антибактериальных препаратов для лечения заболеваний, вызываемых *V.cholerae* не O1/не O139.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гржибовский А.М. Доверительные интервалы для частот и долей. Экология человека. 2008, 5: 57-60.
2. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2007620389. Холера. Штаммы-VNTR. 2007.
3. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации (обзор). Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 4: 60-68.
4. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. Метод.указ. МУ 4.2.2495-09. М., 2009.
5. Селянская Н.А., Рыжко И.В., Веркина Л.М., Тришина А.В., Миронова А.В., Акулова М.В. Антибиотикограммы штаммов *Vibrio cholerae* не O1/O139, выделенных от людей в 1968-2009 гг. Антибиотики и химиотерапия. 2011, 1-2: 18-21.
6. Dalsgaard A., Forslund A., Boddhidatta L. et al. A high proportion of *Vibrio cholerae* strains isolated from children with diarrhoea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogenous не-O1, не-O139 O-serotypes. Epidemiol. Infect. 1999, 122: 217-226.

7. Dutta D. , Chowdhury G., Pazhani G. P. et al. Vibrio cholerae не-O1, не-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Calcutta, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19: 464-467.
8. Halty B.J., Choi S.Y., Grim C.J. et al. Genomic and phenotypic characterization of V. cholerae не-O1 isolates from a US Gulf Coast cholera outbreak. *PLoS One.* 2014, 9 (4): 86264.
9. Jagadeeshan S., Kumar P., Ambraham W.P., Thomas S. Multiresistant Vibrio cholerae не O1/не O139 from waters in South India: resistance patterns and virulence-associated gene profiles. *J. Basic Microbiol.* 2009, 49 (6): 538-544.
10. Ramamurthy T., Bag P.K., Pal A. et al. Virulence patterns of Vibrio cholerae не-O1 strains isolated from hospitalised patients with acute diarrhea in Calcutta, India. *J. Med. Microbiol.* 1993, 39 (4): 310-317.
11. Tobin-D'Angelo M., Smith A.R., Bulens S. et al. Severe diarrhea caused by cholera toxin-producing Vibrio cholerae serogroup O75 infections acquired in the Southeastern United States. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 47 (8): 1035-1040.

Поступила 12.05.15

Контактная информация: Селянская Надежда Александровна, к.м.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40, р.т. (863)234-23-11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Е.Д.Савилов^{1,2}, С.И.Малов³, И.В.Малов³, D.Gantulga⁵, И.А.Мирошниченко⁴,
N.Erdenebayar⁶, Л.С.Орлова³, P.Nyamadawa⁷, B.Dulguun³*

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ЕВРОПЕОИДНОЙ И МОНГОЛОИДНОЙ РАС

¹НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека, ²Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования; ³Государственный медицинский университет; ⁴Областной клинический консультативно-диагностический центр, Иркутск; ⁵National Centre Communicable Diseases, ⁶National Centre for Transfusion Medicine, ⁷Mongolian Academy of Medical Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

Цель. Дать сравнительную эпидемиологическую характеристику вирусного гепатита С в Монголии и Иркутской области с учетом расовой принадлежности населения в изучаемых популяциях. *Материалы и методы.* Исследования проводились с 2009 по 2014 гг. на территории Иркутской области и Монголии. Изучена распространенность вирусного гепатита С на основании серологического мониторинга, выявления РНК вируса, факторов риска, изменения структуры циркулирующих генотипов, заболеваемость гепатоцеллюлярной карциномой. *Результаты.* Эпидемиологические проявления вирусного гепатита С в Монголии, в отличие от Иркутской области, характеризуются более широкой распространенностью заболевания, преобладанием доли серопозитивных лиц в возрастной категории старше 50 лет и преобладанием в циркуляции 1 генотипа вируса. В течение последних лет произошла эволюция разнообразия циркулирующих генотипов вируса в сторону уменьшения доли 1 генотипа в Монголии и в России за счет увеличения доли 3 генотипа. Выявлены выраженные различия в среднемноголетних значениях заболеваемости гепатоцеллюлярной карциномой, которые более чем в 10 раз были выше среди монголоидов по сравнению с европеоидами. *Заключение.* Выявлены выраженные различия в проявлениях эпидемического процесса вирусного гепатита С в Монголии и азиатской части России, представленной Восточной Сибирью, которые связаны с этническими, социальными и культурными условиями проживания коренного населения.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 9—17

Ключевые слова: гепатит С, гепатоцеллюлярная карцинома, европеоиды, монголоиды

*E.D.Savilov^{1,2}, S.I.Malov³, I.V.Malov³, D.Gantulga⁵, I.A.Miroshnichenko⁴,
N.Erdenebayar⁶, L.S.Orlova³, P.Nyamadawa⁷, B.Dulguun³*

EPIDEMIOLOGIC MANIFESTATIONS OF VIRAL HEPATITIS C IN REPRESENTATIVES OF CAUCASIAN AND MONGOLOID RACES

¹Scientific Centre of Problems of Family Health and Human Reproduction, Irkutsk; ²Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education; ³Irkutsk State Medical University; ⁴Irkutsk Regional Clinical Consultative-Diagnostics Centre, Russia; ⁵National Centre of Communicable Diseases, ⁶National Centre for Transfusion Medicine, ⁷Mongolian Academy of Medical Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

Aim. Present comparative epidemiologic characteristics of viral hepatitis C in Mongolia and Irkutsk Region taking into account racial origin of the studied populations. *Materials and methods.* The studies were carried out in 2009 — 2014 on the territory of Irkutsk Region and Mongolia. Prevalence of viral hepatitis C based on serological monitoring, virus RNA detection, risk factors, change in structure of circulating genotypes, hepatocellular carcinoma morbidity were studied. *Results.* Epidemiologic manifestations of viral hepatitis C in Mongolia, in contrast to Irkutsk Region, are characterized by a wider prevalence of the disease, predominance of the fraction of seropositive individuals in age category of above 50 years and predominance of genotype 1 virus in circulation. In recent years an evolution of diversity of circulating virus genotypes took place towards a reduction of the fraction of genotype 1 in Mongolia and Russia due to an increase of the fraction of genotype 3. Expressed differences in average-annual values of hepatocellular carcinoma morbidity were detected, that were more than 10 times higher among Mongoloids compared with Caucasians. *Conclusion.* Pronounced differences were detected in manifestations of epidemic process of viral hepatitis C in Mongolia and Asian part of Russia, represented by Eastern Siberia, that are associated with ethnic, social and cultural living conditions of the indigenous population.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 9—17

Key words: hepatitis C, hepatocellular carcinoma, Caucasian, Mongoloid

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита С (HCV) является одной из ведущих причин хронического гепатита, исходом которого являются цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) [3, 13]. По данным [Daw M.A. et al., 2012] в мире в настоящее время указанным вирусом инфицированы 180 млн человек, из которых около 100 млн являются жителями стран Азии и Тихоокеанского региона. При этом по оценкам ВОЗ процент серопозитивных лиц на наличие антител к HCV (анти-HCV) постоянно увеличивается и за последние 15 лет вырос с 2,3 до 2,8, значительно варьируя в различных странах мира [11, 15]. Кроме этого, имеет место негативная тенденция изменения структуры парентеральных вирусных гепатитов в сторону их хронизации. В связи с этим, в настоящее время в долевого соотношении вирусный гепатит С (ВГС) в общей структуре всех хронических вирусных гепатитов вышел на первое место и достиг величины 74,4% [12].

Тем не менее, многие вопросы, связанные с изучением этого инфекционного заболевания, остаются не решенными или недостаточно изученными. Например, в Монголии, в отличие от России, не ведется обязательная государственная регистрация заболеваемости хроническими вирусными гепатитами, и для оценки эпидемиологической ситуации проводятся выборочные обследования отдельных контингентов населения. Также весьма скудно представлены сведения о структуре циркулирующих генотипов указанного вируса на территории этой страны [14, 19].

Приведенный анализ побудил нас провести сравнительные эпидемиологиче-

ские исследования на двух крупных сопредельных территориях (Монголия и Иркутская область России, расположенная в ее азиатской части). Указанные обширные регионы характеризуются практически одинаковой численностью населения и близкими климатогеографическими показателями, однако существенно отличаются по этническому составу. В Монголии представители монголоидов составляют достаточно однородную популяцию (96,0%) [5]. На территории сравнения (Иркутская область) преобладают европеоиды — 96,3%. Столь выраженные различия безусловно определяют и присущие данным популяциям фенотипические и генотипические факторы риска.

Подобные исследования имеют несомненный интерес, ибо позволяют раскрыть механизмы формирования эпидемического процесса изучаемых инфекционных заболеваний с учетом такого важнейшего фактора риска как этническая составляющая популяции.

Цель работы — дать сравнительную эпидемиологическую характеристику вирусного гепатита С в Монголии и Иркутской области с учетом расовой принадлежности населения в изучаемых популяциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Представленные исследования проводились с 2009 по 2014 гг. на территории Иркутской области и Монголии. Для расчета частоты выявления анти-НСV были использованы данные Иркутской областной станции переливания крови и Монгольского Национального центра трансфузионной медицины. Всего было оценено 115 407 сывороток крови первичных доноров, из которых 68 512 были жителями Иркутской области, а 46 895 — жителями Монголии. Показатель инфицированности рассчитывали как долю лиц, находящихся в репликативной фазе инфекционного процесса (НСV РНК положительных) среди обследованных лиц с наличием антител к изучаемому вирусу. На предмет присутствия анти-НСV и НCV РНК было выборочно исследовано 3312 сывороток крови первичных доноров, в том числе 2345 из Иркутской области и 967 из Монголии.

Структуру генотипов вируса у серопозитивных лиц анализировали по данным Иркутского областного клинического консультативно-диагностического центра и Национального центра по изучению инфекционных болезней Монголии. Генотипическое разнообразие НCV исследовано на основании анализа 7801 ПЦР-позитивных проб крови соответствующих больных, проживающих в Иркутской области, и 2570 пациентов в Монголии. Для оценки частоты встречаемости ГЦК были использованы данные Иркутского областного онкологического диспансера и Департамента здравоохранения исполнительного агентства Правительства Монголии с 2000 по 2013 гг.

Для сравнительного анализа факторов риска инфицирования НCV использовали метод анкетирования у 392 больных хроническим ВГС в Монголии и у 210 в Иркутской области.

Статистическую обработку первичных материалов проводили с использованием общепринятых параметрических и непараметрических критериев статистики, включающих в себя сравнение двух выборок, оценку многолетнего движения заболеваемости и корреляционный анализ. Уровень статистической значимости был принят при $p \leq 0,05$ [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ заболеваемости ВГС по данным серологических исследований выявил существенные различия в интенсивности течения эпидемического процесса на двух смежных территориях. Так, частота выявления соответствующих антител у жителей Иркутской области оказалась более чем в 3 раза ниже по сравнению с Монголией (2,0% и 6,6% соответственно).

Выраженные различия выявлены и при оценке возрастных групп риска на территориях сравнения. Анализ представленных исследований показал, что в Монголии имеет место последовательное увеличение доли серопозитивных лиц с возрастом с

максимальными показателями в группе старше 50 лет (22,5%). В Иркутской области распределение изучаемых показателей носило иной характер, и наибольшее количество позитивных лиц приходится на возраст 30 — 39 лет (3,3%).

Однако наличие антител к вирусу не позволяет судить об уровне инфицированности населения, так как анти-НСV могут сохраняться пожизненно у реконвалесцентов после перенесенного острого вирусного гепатита или успешной противовирусной терапии. Для оценки истинной инфицированности нами были проведены дополнительные исследования по оценке частоты выявления РНК вируса среди анти-НСV позитивных лиц в монголоидной и европеоидной группах населения (табл. 1). При пересчете на 1000 населения заболеваемость по данным обнаружения анти-НСV составила 0,23 в Иркутской области и 0,73 в Монголии, в то время как истинная заболеваемость (инфицированность) по данным выявления НСV РНК в крови — 0,15 и 0,39 соответственно. Таким образом, по результатам серологических исследований заболеваемость ВГС в Монголии оказалась в 3,2 раза выше, а инфицированность населения в 2,6 раза выше, чем в Иркутской области.

Проведенные нами дальнейшие исследования показали, что на территории Монголии обнаружено доминирующее преобладание 1 генотипа НСV (90,3%), что значимо выше ($p < 0,001$) его распространенности на территории Иркутской области (53,3%). Удельный вес других генотипов на каждой из сравниваемых территорий был существенно меньше. Так, на 2 и 3 генотипы приходилось 8,5% в Монголии и 41,6% в Иркутской области ($p < 0,001$). Кроме указанных вариантов на обеих территориях выявлены пациенты с сочетанием двух и более генотипов, а также с нетипируемыми генотипами вируса, которые занимают незначительную часть в общей структуре НСV (табл. 2, 3).

Таблица 2. Эволюция генотипов вируса гепатита С в Иркутской области

Генотип	Год	Число типирований	Удельный вес, %
1	2001—2004	593	62,7±1,6
	2011—2014	4154	53,3±0,6
			$p < 0,001$
2	2001—2004	65	6,9±0,8
	2011—2014	510	6,5±0,3
			$p > 0,05$
3	2001—2004	242	25,6±1,4
	2011—2014	2738	35,1±0,5
			$p < 0,001$
Нетипируемый либо сочетание генотипов	2001—2004	46	4,8±0,7
	2011—2014	399	5,1±0,3
			$p > 0,05$

Примечание. 2001—2004 гг. — по данным [8].

Таблица 3. Эволюция генотипов вируса гепатита С в Монголии

Генотип	Год	Число типирований	Удельный вес, %
1	2001—2004	165	98,8±0,8
	2011—2014	232	90,3±1,9
			$p < 0,001$
2	2001—2004	2	1,2±0,8
	2011—2014	7	2,7±1,0
			$p > 0,05$
3	2001—2004	0	0±1,8
	2011—2014	15	5,8±1,5
			$p < 0,05$
Нетипируемый либо сочетание генотипов	2001—2004	0	0±1,8
	2011—2014	3	1,2±0,7
			$p > 0,05$

Примечание. 2001 — 2004 гг. — по данным [14].

Таблица 1. Заболеваемость ВГС жителей Монголии и Иркутской области по данным серологического скрининга и выявления РНК вируса

Регион	Общее количество обследованных	Из них анти-НСV+		Из них НСV RNA +	
		абс.	%	абс.	%
Иркутская область	2345	55	2,3±0,3	36	1,5±0,3
Монголия	967	71	7,3±0,8	38	3,9±0,6
			$p < 0,001$		$p < 0,001$

Таблица 4. Структура генотипов HCV у уроженцев Монголии, длительно пребывающих на территории Иркутской области (2005 – 2013 гг.)

Группа обследуемых	Всего генотипирований	Структура генотипов							
		1		2		3		Нетипируемые либо сочетание генотипов	
		абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Монголы, длительно пребывающие в Иркутске	66	49	74,3±5,4	2	3,0±2,1	15	22,7±5,2	0	0±4,5
Население Иркутской области	7801	4154	53,3±0,6	510	6,5±0,3	2738	35,1±0,5	399	5,1±0,3
Население Монголии	2570	2321	90,3±0,6	69	2,7±0,3	149	5,8±0,5	31	1,2±0,2
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-2} > 0,05$		$p_{1-2} < 0,05$		$p_{1-2} > 0,05$
			$p_{1-3} < 0,01$		$p_{1-3} > 0,05$		$p_{1-3} < 0,01$		$p_{1-3} > 0,05$

Сравнительный анализ полученных нами данных с ранее опубликованными материалами исследований других авторов выявил на изучаемых территориях процесс выраженного изменения структуры циркулирующих генотипов. Показано, что в настоящее время на территории Монголии имеет место значимое высоко достоверное ($p < 0,01$) уменьшение доли 1 генотипа с 98,8 до 90,3%. Кроме этого, в популяции монголов появился 3 генотип (5,8%), который раньше не регистрировался в этом азиатском регионе. Выраженные изменения в структуре циркулирующих генотипов HCV имеют место и на территории Иркутской области. Как и прежде, основным является 1 генотип, доля которого, тем не менее, снизилась с 62,7 до 53,3 % ($p < 0,001$) с одновременным значимым увеличением в изучаемой популяции циркуляции 3 генотипа ($p < 0,001$).

Появление 3 генотипа на территории Монголии может быть связано с его проникновением из пограничных территорий России. Деловая и культурная миграция населения между Монголией и прилегающими к ней регионами Восточной Сибири за последние годы существенно выросла. В частности, около 4,5 тысяч студентов ежегодно обучаются в вузах на приграничных с Монголией территориях России [5].

Одним из доказательств выдвинутого положения явилось проведенное в рамках настоящей работы обследование 66 больных хроническим ВГС из числа лиц монгольской национальности, пребывавших на территорию Иркутской области с целью обучения или трудовой деятельности сроком от 1 года до 7 лет (табл. 4). Средний возраст обследованных составил 29,6 лет, доля мужчин составила 60,6%. У всех больных диагноз подтвержден серологически и выявлением HCV РНК в крови.

Установлено, что у обследованных уроженцев Монголии структура генотипов HCV значительно отличается от коренного населения этой страны в сторону уменьшения доли 1 генотипа, что приближает их к таковой у населения региона временного проживания. Существенную долю у мигрантов составил 3 генотип, который редко встречается на территории Монголии. Таким образом, прибывшие на территорию России мигранты приобщаются как к позитивным, так и к негативным традициям страны пребывания, перенося, в том числе, и свойственные ей инфекционные заболевания.

Одним из наиболее негативных исходов ВГС является гепатоцеллюлярная карцинома. Принимая во внимание, что HCV играет существенную роль в индукции онкогенеза при первичном раке печени [3, 13], мы также проанализировали многолетнюю заболеваемость ГЦК в сравниваемых регионах за период с 2000 по 2013 гг. (табл. 5).

Наиболее выраженные различия в проявлениях заболеваемости ГЦК у монголоидов и европеоидов проявились в уровне заболеваемости. Средняя величина этого показателя в Монголии более чем в 10 раз превышает соответствующее значение в Иркутской области (55,4 и 4,8‰ соответственно, $p < 0,001$).

Оценка динамики заболеваемости показала близкие ее проявления в популяциях больных ГЦК. Об этом свидетельствует высокодостоверный ($P < 0,01$) положительный коэффициент корреляции ($KK = 0,69$) между сравниваемыми динамическими рядами, что, в частности, опосредуется как в их значимом прямолинейном росте у населения обеих стран ($P < 0,01$), так и в близких значениях такого показателя, как средняя геометрическая. Следует отметить лишь значительно более высокие показатели таких параметров, как средняя абсолютного прироста по абсолютным значениям и коэффициента регрессии в соответствующем уравнении, описывающем движение заболеваемости изучаемых больных в Монголии (табл. 5). Два последних показателя свидетельствуют о более неблагоприятной тенденции развития многолетней заболеваемости ГЦК у населения Монголии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эпидемиологические проявления ВГС в популяции монголоидов (население Монголии) характеризуются выраженными отличиями от популяции европеоидов, охарактеризованные на примере населения азиатской части России (Иркутская область).

Согласно результатам выборочных исследований выявляемость анти-НСV в Монголии в различных группах риска варьирует от 11 до 48% [14, 19] и от 1,2 до 5,6% в России [12, 15]. Проведенный нами анализ распространенности ВГС (по показателям анти-НСV) населения сравниваемых регионов показал, что в Монголии этот показатель более чем в 3 раза превышает аналогичные значения в Иркутской области (6,6 и 2,0% соответственно, $p < 0,001$). Высокая частота выявления анти-НСV у жителей Монголии позволяет отнести эту страну к регионам с высокими показателями заболеваемости, наряду с другими странами Юго-Восточной Азии [16]. В Иркутской области доля анти-НСV позитивных лиц находится на одном уровне с Российской Федерацией, однако имеет при этом существенные отклонения (в сторону увеличения или понижения) по сравнению с ее отдельными административными территориями [9].

Одной из характерных черт эпидемиологии ВГС в Монголии является абсолютное доминирование первого генотипа НCV (90,3%), которое значительно превышает соответствующий показатель в Иркутской области (53,3%). Однако при этом следует отметить следующее. В последние годы в Монголии и России имеет место эволюция генотипического разнообразия циркулирующих генотипов НCV в сторону уменьшения доли 1 генотипа с одновременным появлением (увеличением) в изучаемых популяциях других генотипов. Указанная тенденция имеет место как для территории Китайской Народной Республики (внутренняя Монголия и северные кантоны Китая) [20, 21], так и для различных регионов Российской Федерации [2, 6].

Таблица 5. Основные эпидемиологические показатели ГЦК в Иркутской области и Монголии за 2000 — 2013 гг. (на 100 000 населения)

Показатель	Иркутская область	Монголия
Средняя, $M \pm m$	4,8±0,2*	55,4±2,0
Средняя абсолютного прироста, ‰	0,12	1,83
Уравнение регрессии	$y = 0,15x + 3,70$	$y = 1,49x + 44,24$
Темп прироста по выровненным данным, %	+3,5	+3,0
Достоверность тенденции	$P < 0,01$	$P < 0,01$

Примечание. * Различия в средних значениях значимы при $P < 0,001$.

Согласно данным литературы 1 генотип чаще встречается у лиц старшего возраста и связан преимущественно с переливанием крови или с другими медицинскими вмешательствами, а 2 и 3 варианты вируса в большей степени распространены среди молодых лиц — потребителей инъекционных наркотиков [7].

Приведенные материалы хорошо согласуются с полученными в настоящей работе результатами. Действительно, по данным серологического скрининга, представленным в начале статьи, большинство лиц с наличием анти-НСV в Монголии выявлены в возрастной группе старше 50 лет, а в Иркутской области — в группе 30 — 39 лет. При этом по результатам анкетного опроса показано, что медицинские манипуляции в указанных возрастных группах риска получали в анамнезе 75,3 и 48,5% инфицированных вирусом лиц соответственно.

Относительно возрастной группы 30 — 39 лет с максимальными значениями анти-НСV в Иркутской области следует отметить, что в Российской Федерации наибольшее число лиц, употребляющих наркотические вещества, как и максимальные показатели выявления анти-НСV приходятся также на этот возраст (до 40 лет) [4, 7, 9, 11]. Для сравнения стоит отметить, что по данным того же проведенного нами анкетного опроса доля потребителей инъекционных наркотиков в Монголии чрезвычайно мала (0,5%).

Следствием указанных отличий являются и выраженные расхождения в заболеваемости ВИЧ-инфекцией на сравниваемых территориях. В Монголии с 2001 по 2010 гг. зарегистрировано всего 83 случая ВИЧ-инфекции, 21 из которых выявили в 2010 г. Подавляющее число инфицированных (81%) были мужчины с гомосексуальными наклонностями, и не было ни одного пациента с наличием наркозависимости в анамнезе. В отличие от этого, на территории Иркутской области, начиная с 2008 г., пораженность ВИЧ-инфекцией ее населения превышает 1%, что соответствует генерализованной стадии эпидемии рассматриваемого заболевания [18].

Таким образом, одной из причин появления среди населения Монголии 3 генотипа ВГС является начавшееся развитие наркомании как социально-негативного явления, а также стремительно усиливающиеся миграционные процессы, в том числе между Монголией и приграничными территориями России. Кроме России, занос на территорию Монголии 3 генотипа НCV мог также происходить и с территории южного Китая, где его доля достигает 16% [20], при этом в течение последних 25 лет на границе этих стран действует безвизовый режим [5].

Представленные данные имеют важное теоретическое и прикладное значение для прогнозирования клинического течения и исходов заболевания. Здесь следует отметить, что выявленная закономерность тесно связана с процессом глобализации, которая, как отмечают Н.И.Брико, В.И.Покровский, влияет на ускорение эволюции инфекционных болезней, и темпы ее измеряются уже не столетиями, а десятилетиями [1].

Проведенный анализ многолетней заболеваемости ГЦК показал, что ее показатели в Иркутской области в целом не отличается от ее уровня в Российской Федерации, а в Монголии соответствует показателям в других странах Азии [17]. Однако между сравниваемыми в настоящей работе популяциями выявлены выраженные различия в среднемноголетних значениях заболеваемости ГЦК, которые более чем в 10 раз были выше среди монголоидов по сравнению с европеоидами (55,4 и 4,8‰ соответственно, $p < 0,001$). Столь высокие показатели заболеваемости ГЦК в Монголии по сравнению с граничащей с ней территорией Иркутской области могут быть связаны с наличием в этой азиатской стране дополнительных факторов риска развития первичного рака печени, характерных именно для этой страны. Многолетняя динамика заболеваемости на обеих территориях носила достаточно близкий характер, но с более неблагоприятными тенденциями на территории Монголии.

Таким образом, в настоящих исследованиях были выявлены выраженные различия в проявлениях эпидемического процесса ВГС между популяциями европеоидов (азиатская часть России, представленная Восточной Сибирью) и монголоидов (Монголия). Несмотря на то, что Монголия граничит с 4 субъектами Российской Федерации, расположенными в Сибири, на протяжении 3485 км, между сравниваемыми странами могут быть различные фенотипические факторы риска, связанные с этническими, социальными, культурными и экономическими условиями проживания коренного населения. Нельзя также исключить и генетические особенности, присущие для человеческих рас, в частности, значение нуклеотидных полиморфизмов генов, отвечающих за иммунные реакции организма. Поставленные вопросы являются темой самостоятельных исследований и в перспективе требуют своего разрешения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брико Н.И., Покровский В.И. Глобализация и эпидемический процесс. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010, 4: 4-10.
2. Заботина Е.Е. Эпидемиологические и молекулярно-генетические аспекты гепатитов В и С (по материалам Владимирской области). Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 2011.
3. Ивашкин В.Т., Морозова М.А., Маевская М.В., Соколова И.А., Герман Е.Н., Бундина М.В. Факторы риска развития гепатоцеллюлярной карциномы. РЖГГК. 2009, 19 (1): 4-15.
4. Кругляк С.П., Махно Е.С., Самойлова Н.Ф. Распространение вирусов гепатита С в Приморском крае. Тихоокеанский медицинский журнал. 2009, 4: 39-40.
5. Кручкин Ю.Н. Современная Монголия. Энциклопедический справочник. Улан-Батор, 2011.
6. Кузин С.Н., Самохвалов Е.И., Заботина Е.Е., Кудрявцева Е.Н., Крель П.Е., Корабельникова М.И., Богомолов П.О., Куприянова Н.В., Коваленко Е.С., Мамонова Н.А., Игнатова Т.М., Лопаткина Т.Н., Бурневи Э.З., Лисицина Е.В., Кузина Л.Е., Лавров В.Ф. Структура генотипов вируса гепатита у пациентов с хроническим гепатитом С. Журн. микробиол. 2011, 3: 33-38.
7. Мукомолов С.Л., Tallo T., Синайская Е.В., Кислый П.Н., Трифонова Г.Ф., Герасимова В. В., Norder H. Молекулярная эпидемиология гепатита С в центрах гемодиализа в Санкт-Петербурге. Журн. микробиол. 2014, 6: 27-34.
8. Орлова Л.С. Оценка социально-экономической значимости и прогнозирование эффективности противовирусной терапии больных хроническим вирусным гепатитом С. Автореф. дис. канд. мед. наук. Иркутск, 2008.
9. Пименов Н.Н., Чуланов В.П., Комарова С.В., Карандашова И.В., Неверов А.Д., Михайловская Г.В., Долгий В.А., Лебедева Е.Б., Пашкина К.В., Коршунова Г.С. Гепатит С в России: эпидемиологическая характеристика и пути совершенствования диагностики и надзора. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012, 3: 4-9.
10. Савилов Е.Д., Астафьев В.А., Жданова С.Н., Заруднев Е.А. Эпидемиологический анализ: Методы статистической обработки материала. Новосибирск, Наука-Центр, 2011.
11. Трифонова Г.Ф., Левакова И.А., Болсун Д.Д., Мукомолов С.Л. Острый и хронический гепатит С в Российской Федерации. Инфекция и иммунитет. 2014, 4 (3): 267-274.
12. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Характеристика отдельных групп высокого риска заражения вирусами гепатитов В, С и D. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2004, 5 (5): 3-12.
13. Ющук Н.Д., Знойко О.О., Дудина К.Р., Белый П.А. Проблемы вирусного гепатита С в Российской Федерации. Терапевтический архив. 2014, 86 (10): 77-81.
14. Baatarkhuu O., Kim do Y., Ahn S.H. et al. Prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus among apparently healthy individuals in Mongolia: a population-based nationwide study. Liver Int. 2008, 28 (10): 1389-1395.
15. Hope V.D., Eramova I., Capurro D. et al. Prevalence and estimation of hepatitis B and C in

fections in the WHO European Region: a review of data focusing on the countries outside the European Union and the European Free Trade Association. *Epidemiol. Infect.* 2014, 142 (2): 270-286.

16. Nguyen L.H., Nguyen M.H. Systematic review: Asian patients with chronic hepatitis C infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013, 37: 921-936.
17. Raza S.A., Clifford G.M., Franceschi S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *British J. Cancer.* 2007, 96: 1127-1134.
18. Shugaeva S.N., Petrova A.G., Zaitsev I.V. The raging spread of HIV infection in the children and adolescents of the Irkutsk district of Siberia. *Int. J. Health, Wellness and Society.* 2011, 1 (3): 83-88.
19. Tsatsralt-Od B., Takahashi M., Nishizawa T. High prevalence of dual or triple infection of hepatitis B, C, and delta viruses among patients with chronic liver disease in Mongolia. *J. Med. Virol.* 2005, 77 (4): 491-499.
20. Yu J., Shi Q., Chen Y. et al. Analysis of current status of chronic hepatitis C in Guangxi. *Hepatol. Int.* 2011, 5 (1): 245.
21. Zhou Y., Wei J., Zhang T. et al. Novel hepatitis C virus genotyping method using RT-PCR reverse dot hybridization technique and its application. *Hepatol. Int.* 2011, 5 (1): 227.

Поступила 15.05.15

Контактная информация: Малов С.И.,
664000, Иркутск, ул. Красного Восстания, 1, р.т. (3952)24-38-25

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Н.Н.Филатов^{1,2}, А.В.Линок², Е.Б.Файзулов¹

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ В МОСКВЕ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Цель. Изучение проявлений эпидемического процесса при острых кишечных инфекциях для установления причин низкой эффективности проводимых профилактических мероприятий и оценка роли ротавирусной инфекции в общей структуре заболеваний кишечными инфекциями неустановленной этиологии. *Материалы и методы.* Проанализированы сведения о заболеваемости острыми кишечными инфекциями населения Москвы. Обследованы методом ПЦР в реальном времени тест-системами лаборатории молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова с последующим типированием больных острыми кишечными инфекциями, которые находились на стационарном лечении. *Результаты.* Оценка многолетних проявлений эпидемического процесса заболеваемости острыми кишечными инфекциями в Москве показала, что совокупная заболеваемость не имеет тенденции к снижению, так как доля инфекций с нерасшифрованным этиологическим фактором составляет практически 80% от всей совокупной заболеваемости. Доля ротавирусной инфекции в совокупной заболеваемости ОКИ установленной этиологии возросла с 53,2% в 2004 году до 82,6% в 2014 году. Заболеваемостью детей ротавирусной инфекцией в 6 раз превышает заболеваемость взрослых. *Заключение.* Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения специфической профилактики в отношении вирусных кишечных инфекций, преимущественно ротавирусной и норовирусной инфекции. Наибольшего эффекта следовало бы ожидать от применения дивакцины, разработка которой представляется весьма актуальной проблемой.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 17—21

Ключевые слова: ротавирусная инфекция, норовирусная инфекция, ПЦР в реальном времени

SOME FEATURES OF MANIFESTATIONS OF EPIDEMIC PROCESS DURING ACUTE INTESTINAL INFECTIONS IN MOSCOW

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. Study manifestations of epidemic process during acute intestinal infections to establish reasons of low effectiveness of the prophylactic measures carried out and evaluation of the role of rotavirus infection in general disease structure of intestinal infections of unknown etiology. **Materials and methods.** Data on morbidity of acute intestinal infections of population of Moscow were analyzed. Hospitalized patients with acute intestinal infections were examined using real-time PCR method test-systems of laboratory of molecular virology of Mechnikov RIVS with subsequent typing. **Results.** Evaluation of multi-year manifestations of epidemic process of morbidity of acute intestinal infections in Moscow has shown, that the cumulative morbidity does not have a tendency of reduction, because the proportion of infections with undeciphered etiological factors is almost 80% of the total aggregate morbidity. The proportion of rotavirus infection in total morbidity of AII of established etiology increased from 53.2 in 2004 to 82.6% in 2014. Morbidity in children with rotavirus infection is 6 times higher than morbidity in adults. **Conclusion.** The results obtained give evidence on the necessity of carrying out specific prophylaxis against viral intestine infection, mostly of rotavirus and norovirus infections. The highest effect should have been expected from use of a bi-vaccine, development of which seems quite an actual problem.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 17—21

Key words: rotavirus infection, norovirus infection, real-time PCR

ВВЕДЕНИЕ

Уровень заболеваемости острыми кишечными инфекциями (далее — ОКИ) в мегаполисе с развитыми системами водоснабжения, общественного питания и медицинского обслуживания отображает эффективность социально-гигиенического мониторинга и эпидемиологического надзора, а также характеризует качество жизни населения.

Несмотря на значительный экономический ущерб и наносимый вред здоровью, многие проявления эпидемического процесса ОКИ не нашли своего объяснения и, следовательно, не выработаны мероприятия, направленные на купирование не-

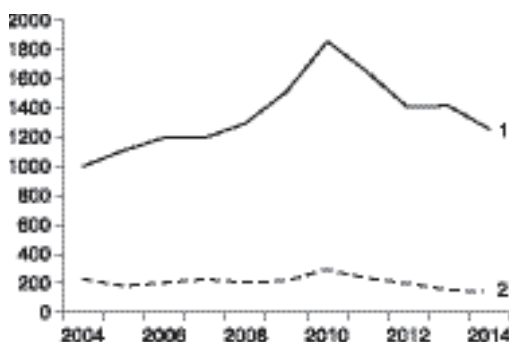


Рис. 1. Динамика заболеваемости острыми кишечными инфекциями разных возрастных групп (КИНЭ +ОКИ уст. этиол.) с 2004 по 2014 гг. в Москве.

1 — до 17 лет, 2 — 18 — 99 лет, по оси абсцисс — годы. Здесь и на рис. 2 — 4: по оси ординат — заболеваемость на 100 тыс. населения.

гативных проявлений. Ежегодные колебания уровня заболеваемости ОКИ от 300 до 500 на 100 тыс. населения, отсутствие тенденции к снижению и низкая доля этиологически и эпидемиологически расшифрованных случаев (около 20%) свидетельствуют о малоэффективном влиянии на процессы распространения ОКИ. Индустриализация питания в школах, дошкольных учреждениях, объектах социальной сферы, гарантированное безопасное водопотребление, достаточный уровень гигиенических условий исчерпали предел необходимого профилактического влияния на уровень заболеваемости ОКИ. Это, очевидно, требует изменения подходов к организации эпидемиологического надзора за

острыми кишечными инфекциями, а именно: к диагностике, скрининговой оценке ситуации и разработке эффективных противоэпидемических мероприятий.

Цель работы — изучение проявлений эпидемического процесса при острых кишечных инфекциях для установления причин низкой эффективности проводимых профилактических мероприятий и оценка роли ротавирусной инфекции в общей структуре заболеваний кишечными инфекциями неустановленной этиологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на основе данных формы №2 Федерального статистического наблюдения «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за период с 2004 по 2014 гг. в Москве. Методом случайной выборки отобранные больные острыми кишечными инфекциями, находившиеся на стационарном лечении, для обследования методом ПЦР в реальном времени тест-системами лаборатории молекулярной вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова с последующим типированием [1, 5]. Использовали данные отдела регистрации и учета инфекционных больных о заболеваемости кишечными инфекциями за период с 2004 по 2014 гг. по нозологическим формам, возрастному составу и распределению по территории. Для выявления тенденций проявлений распространенности проводился анализ многолетних данных заболеваемости бактериальными (шигеллезы, сальмонеллезы) и вирусными (ротавирусная, энтеровирусная) инфекциями. Изучение динамики годовых показателей заболеваемости проводили за десятилетний период. Для определения уровня и динамики фоновой, сезонной и вспышечной заболеваемости проводили анализ внутригодовой заболеваемости ОКИ по группам населения. Для обработки данных использовались различные статистические методы исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка многолетних проявлений эпидемического процесса совокупной заболеваемости острыми кишечными инфекциями в Москве в сравнении с аналогичными проявлениями заболеваемости этиологически расшифрованными формами бактериальных инфекций (шигеллезы, сальмонеллезы) показала, что они в значительной степени разнятся. И главное отличие в том, что совокупная заболеваемость не имеет тенденции к снижению. Уровень совокупной заболеваемости ОКИ определяется показателями заболеваемости инфекциями нерасшифрованной этиологии (рис. 1, 2), поскольку на их долю приходится практически 80% всей совокупной заболеваемости. Такое положение объясняется недостаточной полнотой лабораторных обследований заболевших, во-первых, и ошибочным спектром исследований, не позволяющим установить возбудителя, во-вторых. Обследование каждого заболевшего с целью обязательной этиологической расшифровки не следует считать целесообразным, тем более, что установление возбудителя лишь в отдельных случаях влияет на выбор препаратов и тактику лечения заболевших. В то же время, скрининговые исследования в разрезе возрастных, социальных, профессиональных групп и территориального распределения имеют огромное эпидемиологическое значение, объясняя

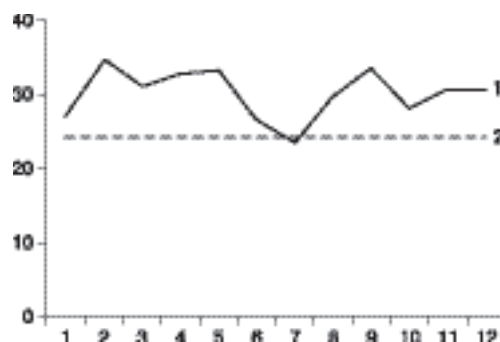


Рис. 2. Типовая кривая заболеваемости КИНЭ населения Москвы за период 2004—2014 гг.

По оси абсцисс — месяцы, 1 — заболеваемость, 2 — предельная фоновая заболеваемость.

происходящие эпидемические процессы, и позволяют разрабатывать адекватные профилактические мероприятия.

Динамика заболеваемости ОКИ установленной этиологии определяется в значительной степени ротавирусной инфекцией, поскольку ее доля составляла от 53,2% в 2004 году и возросла до 82,6% в 2014 году. Изучение внутригодовой динамики заболеваемости ОКИ неясной этиологии и ротавирусной инфекции показало, что в обоих случаях пик заболеваемости приходится на февраль месяц, а минимальные проявления характерны для июля (рис. 3, 4).

Показатели заболеваемости ОКИ среди детей фактически в 6 раз превышают уровень заболеваемости среди взрослых. Самая высокая интенсивность эпидемического процесса при ротавирусной инфекции наблюдается среди детей первых двух лет жизни. Это объясняется высокой вирулентностью и контагиозностью возбудителя, а также формированием стойкого иммунитета у лиц, перенесших инфекцию. Тяжесть клинических проявлений ротавирусной инфекции обеспечивает большую долю госпитализированных, а следовательно, и обследованных. Принятые в настоящее время стандарты оказания медицинской помощи и практика лабораторной диагностики кишечных инфекций в учреждениях здравоохранения не предусматривают использование высоко технологичных методов выявления возбудителя.

С целью изучения вирусного пейзажа среди госпитализированных с ОКИ детей обследованы 140 человек методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени тест-системой на 8 кишечных вирусов (ротавирусы группы А, энтеровирусы, аденовирусы, норовирусы, саповирусы, астровирусы, ротавирусы группы С и орторевовирусы), созданной в НИИВС им. И.И.Мечникова [5]. Долевое участие кишечных вирусов в этиологии тяжелых случаев ОКИ представлено преимущественно ротавирусами А (26%) и норовирусами (19%) и значительно меньшая доля приходится на аденовирусы (6%), астровирусы (3%) и др. Следует отметить, что в 5% случаев отмечали наличие смешанной инфекции, где ротавирусы группы А выявляли в клинических образцах параллельно с норовирусами, аденовирусами, энтеровирусами и астровирусами. Случаев саповирусной, орторевовирусной и ротавирусной С инфекции выявлено не было.

Отмечена высокая доля образцов (41%), в которых нуклеиновая кислота кишечных вирусов не была обнаружена. В этих случаях наиболее вероятной представляется бактериальная природа возбудителя ОКИ.

Проведенное генотипирование выявленных в московском регионе в сезоне 2013 — 2014 гг. ротавирусов показало, что преимущественно циркуляция представлена следующими генотипами: G4P[8] — 39%, G1P[8] — 26%, G2P[4] — 14%,

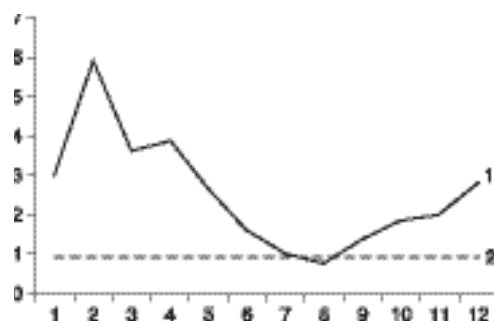


Рис. 3. Типовая кривая заболеваемости ротавирусной инфекцией населения Москвы за период 2004 — 2014 гг.

По оси абсцисс — месяцы, 1 — заболеваемость, 2 — предельная фоновая заболеваемость.

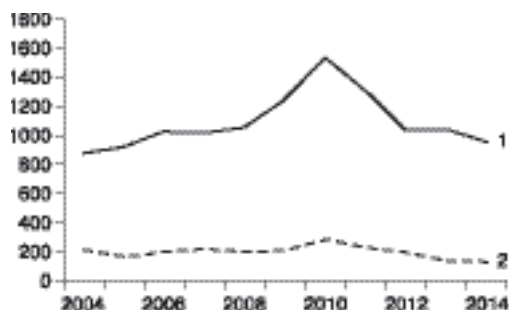


Рис. 4. Динамика заболеваемости КИНЭ разных возрастных групп в период с 2004 по 2014 гг. в Москве.

По оси абсцисс — годы, 1 — до 17 лет, 2 — 18 — 99 лет.

нетипируемые — 12%, смешанная инфекция — 5%, G9P[8] и G3P[8] — 2% соответственно. Определенный нами состав циркулировавших в московском регионе генотипов ротавирусов в целом соответствует составу генотипов, определенному другими авторами для Москвы, Омска, Новосибирска, Нижнего Новгорода, Минска, где доминирующими также являлись G4P[8] и G1P[8] [2 — 4, 7].

По мнению большинства специалистов [6, 8], ведущая роль в профилактике и снижении уровня заболеваемости ротавирусной инфекцией принадлежит специфической защите. Для специфической иммунизации используются вакцина RotaTeq™ (MERCK), содержащая реассортанты ротавирусов коров и человека — G1, G2, G3, G4, P[8], и вакцина Rotarix™ (GlaxoSmithKline), содержащая аттенуированный штамм ротавируса человека G1P[8]. Отечественные ротавирусные вакцины до настоящего времени на рынке не представлены.

Недостаточная эффективность профилактических мероприятий в отношении ОКИ объясняется отсутствием мероприятий в отношении вирусных кишечных инфекций, преимущественно заполняющих когорту этиологически нерасшифрованных инфекций. Наибольшее эпидемиологическое значение на данном этапе в Москве имеют ротавирусы и норовирусы, являющиеся основной причиной госпитализации детей с ОКИ. Для предотвращения эпидемических вспышек ротавирусной и норовирусной инфекции необходимо осуществлять плановую вакцинацию детей раннего возраста. Наибольшего эффекта следовало бы ожидать от применения дивакцины, разработка которой представляется весьма актуальной проблемой. Среди существующих вакцин на территории Москвы предпочтительно использование вакцины RotaTeq™ (MERCK), поскольку она перекрывает циркулирующие генотипы ротавирусов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахтояров Г.Н., Киселев И.С., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Оценка эффективности применения мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для генотипирования ротавирусов группы А. Журн. микробиол. 2014, 4: 43-49.
2. Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А. и др. Спектр генотипов ротавирусов, циркулировавших на территории Нижнего Новгорода в 2005 — 2012 годах. Доминирование генотипа G4P[8]. Медицинский альманах. 2014, 2: 52-57.
3. Жираковская Е. В., Никифорова Н. А., Корсакова Т. Г. Ротавирусная инфекция у детей раннего возраста в Новосибирске. Генотипирование циркулирующих изолятов. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2007, 3: 32-36.
4. Жираковская Е.В., Тикунов А.Ю., Тикунова Н.В. Генетическое разнообразие ротавирусов, выявленных в спорадических случаях острых кишечных инфекций у детей. Молекулярная диагностика 2014, 1: 386-387.
5. Марова А.А., Оксанич А.С., Каира А.Н., Мескина Е.Р., Медведева Е.А., Иванова О.Е., Лукашев А.Н., Кюрегян К.К., Калинин М.А., Егорова О.В., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Применение метода мультиплексной ПЦР-РВ для дифференциальной диагностики кишечных вирусных инфекций. Журн. микробиол. 2012, 6: 39-45.
6. Подколзин А.Т., Петухов Д.Н., Веселова О.А. и др. Позитивные и проблемные аспекты применения ротавирусных вакцин. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013, 1: 80-89.
7. Самойлович Е.О., Логунова Н.В., Семейко Г.В., Ермолович М.А., Ключко Н.Л., Астапов А.А., Лужинский В.С., Лисицкая Т.И., Канашкова Т.А., Бискина Н.М. Ротавирусные гастроэнтериты у детей в г. Минске в 2012 г.: заболеваемость, возрастное распределение, сезонность, генотипический пейзаж возбудителя. Медицинский журнал. 2013, 4: 95-98.
8. Dennehy P.H. Effects of vaccine on rotavirus disease in the pediatric population. Curr. Opin. Pediatr. 2012, 24 (1): 76-84.

Поступила 05.05.15

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

РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ АНТИГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ FRANCISELLA TULARENSIS В ФОРМИРОВАНИИ РЕАКЦИИ АЛЛЕРГИИ У ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Изучение роли ЛПС в индукции противотуляремийного иммунитета у людей и животных. *Материалы и методы.* С помощью реакции лейкоцитоллиза с кровью вакцинированных людей и морских свинок и кожной аллергической пробы (морские свинки) изучена активность различных антигенных препаратов туляремийного микроба, включая высокоочищенные от белковых примесей S- и R-ЛПС. *Результаты.* Показано, что только целые клетки *Francisella tularensis*, убитые в неденатурирующих белок условиях и сохраняющие полноценную структуру S-ЛПС (тулярин⁺), являются индукторами реакции гиперчувствительности замедленного типа. Нарушение структуры ЛПС (тулярин⁻) приводят к достоверному снижению, а денатурация бактериальных белков (при кипячении) вызывает полную утрату иммуностимулирующих свойств препаратов. Очищенные препараты ЛПС и O-полисахаридная фракция S-ЛПС не способны активировать клеточное звено иммунитета. *Заключение.* Наличие ЛПС с полноценной структурой влияет на способность антигенных препаратов *F.tularensis* вызывать аллергическую реакцию, а значит, формировать клеточный противотуляремийный иммунитет. Нельзя исключить, что ЛПС *F.tularensis* выступает в качестве адъюванта и обеспечивает наиболее эффективное представление эпитопов белковых молекул для взаимодействия с рецепторами Т-лимфоцитов.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 22—29

Ключевые слова: реакция гиперчувствительности замедленного типа, ЛПС, клеточный иммунитет, аллергическая реакция, *F.tularensis*, белковые антигены

N.N.Onoprienko, N.V.Aronova, N.V.Pavlovich

ROLE OF VARIOUS ANTIGENIC PREPARATIONS OF FRANCISELLA TULARENSIS IN FORMATION OF ALLERGY REACTION IN HUMANS AND ANIMALS

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

Aim. Study the role of LPS in induction of anti-tularemia immunity in humans and animals. *Materials and methods.* Activity of various antigenic preparations of tularemia microbe, including highly purified from protein and S- and R-LPS, was studied using leukocytolysis reaction with blood of vaccinated humans and guinea pigs and skin allergy test (guinea pigs). *Results.* Only the whole cells of *Francisella tularensis*, killed in protein non-denaturing conditions and conserving full S-LPS structure (tularin⁺) were shown to be inducers of delayed-type hypersensitivity reaction. Alterations in LPS structure (tularin⁻) results in a significant decrease, and denaturation of bacterial proteins (during boiling) results in a complete loss of immune stimulating properties of the preparations. Purified LPS preparations and O-polysaccharide fraction of S-LPS are not able to activate cell-mediated immunity. *Conclusion.* The presence of LPS with the full structure affects the ability of antigenic preparations of *F.tularensis* to cause allergic reactions, and thus, form cell-mediated anti-tularemia immunity. LPS of *F.tularensis* can not be excluded as an adjuvant and provides the most effective presentation of epitopes of protein molecules for interaction with receptors of T-lymphocytes.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 22—29

Key words: delayed-type hypersensitivity reaction, LPS, cell immunity, allergic reaction, *F.tularensis*, protein antigens

ВВЕДЕНИЕ

В течение многих лет ведутся интенсивные разработки по созданию безопасных противотуляремийных вакцин на основе различных антигенов *Francisella tularensis* [1, 14, 18, 21]. Актуальность этого направления обусловлена, в первую очередь, отсутствием данных по генетическим основам аттенуации живой туляремийной вакцины (ЖТВ), используемой для иммунизации людей. Кроме того, включение *F. tularensis* в категорию А агентов биотерроризма определяет особую важность изучения механизмов формирования противотуляремийного иммунитета. Однако до последнего времени у экспериментаторов отсутствует единое представление о том, какие антигены туляремийного микроба обеспечивают эффективный иммунитет против инфекции. По-видимому, именно этим объясняются неудачные попытки конструирования молекулярных вакцин, которые по своей эффективности не уступали бы ЖТВ [14, 16].

Считается общепризнанным, что ведущую роль в защите против туляремии играет Т-клеточное звено иммунитета, индуцируемое антигенами белковой природы, тогда как гуморальному звену отводят второстепенное значение. При этом показано, что иммунодоминантным антигеном бактериальной клетки и основным активатором антителообразования является липополисахарид (ЛПС) *F. tularensis* [3, 6, 22]. В данной связи, ЛПС рассматривается как основной компонент молекулярной вакцины. В частности, согласно данным литературы, комплекс белков наружной мембраны и ЛПС, С-комплекс поверхностных структур *F. tularensis* обеспечивают определенный иммунитет лабораторных животных против возбудителя [2, 15]. В то же время, в очищенном виде ни ЛПС, ни один из идентифицированных специфичных иммуногенных белков туляремийного микроба (например, Tul-4, For-A и др.) не вызывают формирование эффективной и длительной защиты против вирулентных штаммов *F. tularensis* [3]. Ранее было установлено, что для реализации протективных свойств штаммов бактерии должны синтезировать полноценный S-ЛПС, так как ЛПС-дефектные мутанты утрачивают иммуногенные свойства [11, 13]. Таким образом, роль ЛПС в индукции протективного иммунитета против туляремии нуждается в дальнейших исследованиях.

Как известно, туляремийная инфекция или иммунизация ЖТВ сопровождаются развитием в макроорганизме реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Эта аллергическая реакция является показателем клеточного звена иммунитета против *F. tularensis* и применяется для оценки напряженности специфического иммунитета у людей (реакция лейкоцитолита, кожная туляриновая проба) [4, 10]. Для постановки аллергических тестов применяют тулярин (прогретая при 70°C взвесь бактерий вакцинного штамма *F. tularensis*), который представляет собой сложный комплекс различных антигенов туляремийного микроба. Однако, какие именно компоненты микробной клетки ответственны за аллергизацию организма хозяина и, в частности, участвует ли в этом процессе ЛПС, до настоящего времени окончательно не установлено. Использование изолированных и очищенных от белка препаратов ЛПС разного хемотипа, а также ЛПС-дефектных штаммов может быть полезным для выяснения роли этого биополимера в развитии ГЗТ и, следовательно, в протективном иммунитете против туляремии.

В этой связи, целью настоящей работы явилось изучение роли ЛПС в индукции противотуляремийного иммунитета у людей и животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали вирулентные штаммы *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*), *F. tularensis* 543 (subsp. *mediasiatica*), обозначенные как cap⁺, вакцинный штамм *F. tularensis* 15 (subsp. *holarctica*), а также их авирулентные капсулодефицитные

(сар⁻) ЛПС-дефектные варианты, полученные Н.В.Павлович и др. [8]. Бактерии выращивали на плотной питательной среде Т [9]. Все перечисленные штаммы хранились в лиофильно высушенном состоянии и были получены из музея живых культур института.

Экспериментальные тулярин⁺ и тулярин⁻ получали путем прогревания (70°C, 1 час) суспензии бактерий (10¹⁰ м. кл./мл) *F. tularensis* 15 и *F. tularensis* 15 сар⁻, соответственно. Кроме того, использовали взвесь бактерий *F. tularensis* 15, убитых кипячением в течение 20 мин. В качестве контроля специфичности иммунологических реакций служила взвесь бактерий *Escherichia coli* (10¹⁰ м. кл./мл), подготовленная также, как и тулярин (70°C, 1 час). Препараты S- и R-ЛПС выделяли из бакмассы изогенной пары вирулентного сар⁺ и авирулентного сар⁻ штаммов *F. tularensis* 543 методом R.P.Darveau и R.E.W.Hancock [13]. Подробная характеристика полученных препаратов по наличию примесей белка и нуклеиновых кислот приведена нами ранее [7]. Полисахаридную фракцию S-ЛПС получали уксуснокислым гидролизом (1% уксусная кислота, 100°C, 1 час 30 мин) с последующим диализом гидролизатов против дистиллированной воды и лиофильным высушиванием.

Для изучения показателей противотуляремийного иммунитета у людей использовали кровь и сыворотку сотрудников института, вакцинированных ЖТВ (50 человек). В качестве контроля использовали кровь от интактных неиммунных людей (3 человека). Экспериментальными биологическими моделями для изучения формирования иммунитета против возбудителя туляремии служили иммунизированные ЖТВ (подкожно, в дозе 2x10⁶ м. кл.) морские свинки. Интактных животных использовали для отрицательного контроля.

Для оценки клеточного иммунитета у вакцинированных людей и морских свинок применяли реакцию лейкоцитоллиза (РЛ), а на модели морских свинок осуществляли также постановку внутрикожной туляриновой пробы. Обе реакции выполняли согласно [4]. В качестве антигенов в этих реакциях использовали: коммерческий препарат тулярина (Омск, Институт природно-очаговых инфекций); экспериментально полученные тулярин⁺ и тулярин⁻; убитые кипячением бактерии *F. tularensis* 15; очищенные препараты S-ЛПС и R-ЛПС из природных вирулентных и изогенных ЛПС-дефектных авирулентных штаммов *F. tularensis*; полисахаридную фракцию S-ЛПС, взвесь бактерий *Escherichia coli* (10¹⁰ м. кл./мл), прогретую при 70°C 1 час (контроль специфичности реакции). При постановке РЛ убитые бактериальные суспензии добавляли в лунки в дозах, регламентированных в [4] (50 мкл из 10¹⁰ м. кл./мл), дозы препаратов ЛПС составляли 25 мкг на лунку, а полисахаридную фракцию S-ЛПС добавляли в количестве 2,5 мкг на лунку. Коэффициент лейкоцитоллиза (КЛ) рассчитывали по известной формуле. Результаты интерпретировали следующим образом: КЛ ≤ 15% — отрицательный результат; КЛ = 15 — 20% — слабоположительный или сомнительный результат; КЛ ≥ 20% — положительный результат.

Для проведения кожной аллергической пробы у животных предварительно выбривали шерсть на брюшном участке кожи. Через сутки внутрикожно вводили исследуемые антигенные препараты (в объеме 0,2 мл) в следующих дозах: убитые бактериальные суспензии 10⁸ м.кл./свинку, препараты ЛПС 100 мкг/свинку, полисахаридная фракция S-ЛПС 10 мкг/свинку. Результаты оценивали через 24 — 48 часов по наличию покраснения и отека в месте введения антигена.

Специфические противотуляремийные антитела в исследуемых сыворотках людей и животных определяли с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с коммерческим эритроцитарным диагностикумом (ЗАО «Финист», НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, Москва). Для контроля специфичности выявленных антител проводили реакцию торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА). Все реакции ставили микрометодом согласно [4].

Забор крови от морских свинок осуществляли после хлороформирования через 5, 14, 21 и 40 дней после иммунизации. Одну порцию крови от животных использовали для РЛ, а другую — для получения сывороток и дальнейшей постановки серологических реакций. В эти же сроки проводили аллергические пробы на иммунных животных.

Наличие протективного эффекта иммунизации ЖТВ оценивали с помощью заражения иммунных животных вирулентным штаммом *F.tularensis* 503 (subsp. *holarctica*) в дозе 1000 DCL в различные сроки после введения вакцины. Количество вакцинированных животных, выживших после заражения вирулентным штаммом, сравнивали с контрольной неиммунной группой.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка показателей гуморального (титры специфических антител) и клеточного звеньев иммунитета у вакцинированных ЖТВ людей показало, что через 21 — 60 дней после иммунизации в организме происходит формирование противотуляремийного иммунитета. В частности, в крови у всех обследованных людей в РНГА были обнаружены специфические противотуляремийные антитела в титрах 1:80 — 1:2560 и в $85 \pm 3,3\%$ проб — положительные значения коэффициента лейкоцитоза с коммерческим тулярином (табл. 1).

Изучение динамики развития иммунного ответа у морских свинок выявило, что их вакцинация индуцирует активное антителообразование. Так, к 14 дню после введения вакцины в РНГА зарегистрированы титры 1/20 — 1/160, а к 21 дню значения титров достигали максимума — 1/640 — 1/2560. В то же время, sensibilized лейкоциты появлялись в крови экспериментальных морских свинок в более ранние сроки после вакцинации. Например, уже через 5 дней у $90 \pm 6,7\%$ вакцинированных животных была установлена положительная реакция лейкоцитоза, при этом количество животных с положительным КЛ оставалось высоким (90 — 100%) в течение всего срока наблюдения (40 дней). Развитие клеточного иммунитета у привитых животных подтверждалось также и при постановке аллергических проб (к 5 дню) — $20 \pm 2\%$, а к 21 дню 100% свинок давали выраженную реакцию на внутрикожное введение тулярина. Более того, как оказалось, уже через 5 дней после иммунизации $60 \pm 3,3\%$ животных были устойчивы к летальной дозе заражения вирулентным штаммом *F. tularensis*. На более поздних сроках вакцинального процесса (21 день), когда показатели иммунитета достигали максимальных значений, эффективность защиты возрастала до $90 \pm 6,7\%$. Следовательно, вакцинация морских свинок ЖТВ приводит к активации гуморального и клеточного механизмов защиты, обеспечивая высокую устойчивость животных к возбудителю туляремии. Показано также, что появление положитель-

Таблица 1. Показатели клеточного, гуморального и протективного иммунитета после вакцинации морских свинок и людей живой туляремийной вакциной

Вакцинированные	Дни после вакцинации	% проб с положительной РЛ (КЛ \geq 20%)	% животных с положительной аллергической пробой с тулярином	Титр антител в РНГА	% выживших иммунных животных после заражения вирулентным штаммом
Морские свинки*	5	$90 \pm 6,7$	20 ± 2	0	$60 \pm 3,3$
	14	$95 \pm 3,3$	$50 \pm 6,7$	1/20—1/160	$60 \pm 3,3$
	21	100	100	1/640—1/2560	$90 \pm 6,7$
	40	100	—	1/320—1/640	—
Люди**	21—60	$85 \pm 3,3$	—	1/80—1/2560	—

Примечание. Представлены средние значения трех независимых определений с указанием среднего линейного отклонения (здесь и в табл. 2); иммунных животных заражали подкожно вирулентным штаммом голарктического подвида *F. tularensis* 503 в дозе 1000 DCL; * по 10 животных в группе; ** 50 человек; — не определяли.

ных показателей клеточного иммунитета хозяина происходит быстрее по сравнению с гуморальным звеном.

На следующем этапе работы с целью выяснения роли различных антигенов, включая ЛПС, в индукции аллергической реакции нами были получены высокоочищенные от белковых примесей препараты — S-ЛПС из вирулентного и R-ЛПС из изогенного авирулентного штаммов *F.tularensis* [7]. Кроме того, изучена иммуностимулирующая активность O-полисахаридной фракции S-ЛПС. В сравнительное исследование были включены также: коммерческий тулярин; экспериментальные тулярин⁺ и тулярин⁻ (убитые при 70°C бактерии исходного штамма *F. tularensis* 15, имеющего S-ЛПС, и изогенного капсулодефицитного мутанта *F. tularensis* 15 cap⁻, синтезирующего R-ЛПС); бактериальные суспензии исходного вакцинного штамма *F. tularensis* 15, прогретые в денатурирующих белок условиях (100°C).

Исследование крови вакцинированных людей с помощью РЛ при использовании перечисленных антигенных препаратов показало, что наиболее выраженная реакция аллергии регистрируется с коммерческим и экспериментальным тулярином⁺ (90±2 и 93±2,7%, соответственно) (табл. 2). В противоположность этому, тулярин⁻ на основе R-штамма или очищенный препарат S-ЛПС вызывали лизис иммунных лейкоцитов в достоверно более низком количестве случаев (44±2,7 и 15±1,3%, соответственно). O-полисахаридная фракция S-ЛПС, R-ЛПС и убитые кипячением бактерии оказались инертными. Специфичность результатов подтверждена отрицательными значениями коэффициента лейкоцитолита с прогретой при 70°C взвесью гетерогенных микробов (*E.coli*).

Подобная закономерность продемонстрирована и в экспериментах с образцами крови иммунизированных против туляремии морских свинок. Так, положительный коэффициент лейкоцитолита был зарегистрирован в 97±2% случаев с коммерческим тулярином или с тулярином⁺. В то же время, тулярин⁻ лизировал сенсibilизированные лейкоциты в 26±4% изученных проб. Препараты ЛПС, полисахаридная фракция или кипяченые бактерии достоверно снижали или полностью утратили способность вызывать повреждение лейкоцитов.

Результаты экспериментов *in vivo* с использованием морских свинок подтвердили, что внутрикожное введение только коммерческого или экспериментального тулярина⁺ вызывало четко регистрируемую положительную кожную аллергическую реакцию у 95±3,3% иммунных животных. Кожные проявления на введение других антигенов либо отсутствовали, либо обнаруживались лишь в незначительном количестве случаев (тулярин⁻ — 28±2%, S-LPS — 20±2%).

Таким образом, проведенное исследование показало, что только целые клетки *F.tularensis*, убитые в неденатурирующих белок условиях и сохраняющие полноценную структуру S-ЛПС (тулярин⁺), являются активными индукторами ГЗТ.

Таблица 2. Показатели реакции лейкоцитолита и аллергической пробы с различными антигенами туляремийного микроба после вакцинации морских свинок и людей живой туляремийной вакциной

Вакцинированные	Тест	% положительных реакций						
		Антигены, используемые для постановки теста						
		коммерческий тулярин	тулярин ⁺	тулярин ⁻	S-ЛПС	R-ЛПС	полисахарид	кипяченые бактерии
Люди*	РЛ	90±2	93±2,7	44±2,7	15±1,3	0	0	0
Морские свинки**	РЛ	97±2	97±2	26±4	0	11±1,3	0	0
	Кожная проба	95±3,3	95±3,3	28±2	20±2	8±2	0	0

Примечание. * Кровь для исследования от людей брали в различные сроки после вакцинации (всего 50 человек); ** морских свинок исследовали через 5 — 40 дней после вакцинации ЖТВ (по 10 свинок в группе).

Нарушения структуры ЛПС (тулярин^г) приводят к достоверному снижению, а денатурация бактериальных белков (при кипячении) вызывает полную утрату иммуностимулирующих свойств препаратов. Очищенные препараты ЛПС и О-полисахаридная фракция S-ЛПС не способны эффективно активировать клеточное звено иммунитета. Анализ полученных данных предполагает, что индукция полноценного противотуляремийного иммунитета определяется сложным взаимодействием гуморального и клеточного звеньев, причем ЛПС является не только мощным активатором В-клеточного иммунитета, но и, по-видимому, участвует в наиболее эффективном представлении иммуногенов белковой природы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что возбудители внутриклеточных инфекций, таких как туляремия, бруцеллез, туберкулез, вызывают алергизацию организма хозяина с формированием гиперчувствительности замедленного типа. В основе этого процесса лежит активация клеточного звена иммунитета и накопление антигенспецифических Т-лимфоцитов, которые при вторичном контакте с антигеном обеспечивают быстрый и эффективный иммунный ответ. На регистрации реакции ГЗТ после антигенной стимуляции в настоящее время основана диагностика многих инфекций. Кроме того, степень выраженности аллергического ответа позволяет судить о напряженности клеточного постинфекционного (или поствакцинального) иммунитета. С этой целью широко используют различные аллергические тесты: *in vivo* — кожная аллергическая проба, *in vitro* — реакции бласттрансформации или пролиферации лейкоцитов, лимфоцит-стимулирующий тест, реакция торможения миграции лейкоцитов, реакция лейкоцитолитиза и др. На модели *F. tularensis* LVS, а также мутантных вариантов LVS со сниженной иммуногенностью продемонстрирована прямая корреляция между степенью активации Т-лимфоцитов и эффективностью противотуляремийного иммунитета [13].

Поскольку ГЗТ — высокоспецифичная реакция, то изучение различных бактериальных препаратов при постановке алерготестов может выявить антигены, ответственные за сенсibilизацию Т-лимфоцитов и, следовательно, за защиту от инфекции. Большинство работ, посвященных этой теме, доказывают, что у туляремийного микроба такими антигенами являются различные белки [19 — 21]. В то же время, в отношении участия ЛПС в стимуляции алергии сведения фрагментарны и противоречивы.

Целью нашего исследования явилось выяснение роли ЛПС в индукции реакции алергии, то есть клеточного звена противотуляремийного иммунитета. Для этого были получены препараты S- и R-ЛПС с помощью детергентного метода, который позволяет эффективно избавляться даже от SDS-резистентных белков и получать высокоочищенные препараты (менее 0,1% белка) разных хемотипов в идентичных условиях [12]. Последнее дает возможность провести корректное сравнение биологических свойств препаратов с полноценной (S-ЛПС) и дефектной (R-ЛПС) структурами. Исследование очищенных препаратов S- и R-ЛПС *F. tularensis* в алергических тестах *in vivo* на модели морских свинок и *in vitro* в РЛ с образцами крови иммунных людей и животных выявило их крайне низкую активность по сравнению со стандартным препаратом тулярина. Показано также, что убитые кипячением бактерии *F. tularensis* и полисахаридная фракция S-ЛПС лишены способности вызывать лизис иммунных лейкоцитов или кожную алергическую реакцию. Результаты наших экспериментов согласуются с данными Surcel H.M. et al. [21], которые показали, что препараты S- и R-ЛПС *F. tularensis*, полученные двумя разными методами, не проявляют активности в тесте бласттрансформации лимфоцитов. С другой стороны, согласно работам некоторых авторов [5, 10], препараты ЛПС туляремийного микроба, напротив, обладают высокой активностью (сопоставимой с коммерческим тулярином) в реакции

бласттрансформации, а также в реакции лейкоцитолита и кожной аллергической пробе. Подобное противоречие может быть обусловлено разницей в методах получения препаратов ЛПС и, особенно, степени их очистки от белковых примесей.

Анализ полученных нами результатов подтверждает мнение большинства исследователей о доминирующей роли белков туляремийного микроба в активации клеточного иммунитета. Вместе с тем, в процессе настоящего исследования получены факты, не позволяющие однозначно исключить косвенное участие ЛПС в реакции аллергии. В частности, тулярин⁻, представленный бактериями ЛПС-дефектного штамма *F.tularensis* cap⁻, имеет одинаковый с родительским штаммом (тулярин⁺) состав белковых антигенов, но отличается структурой ЛПС (R-ЛПС). Тем не менее, активность тулярина⁻ в проведенных аллергических реакциях была в 2 — 3 раза ниже, чем у тулярина⁺. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что наличие ЛПС с полноценной структурой влияет на иммуностимулирующие свойства антигенных препаратов *F.tularensis*. Механизмы такого влияния требуют дальнейшего углубленного изучения. Учитывая тот факт, что ЛПС относят к тимуснезависимым антигенам, его участие в сенсibilизации Т-клеток, по-видимому, является опосредованным. Нельзя исключить, что ЛПС *F.tularensis* выступает в качестве адьюванта и обеспечивает наиболее эффективное представление эпитопов белковых молекул для взаимодействия с рецепторами Т-лимфоцитов. В пользу этого свидетельствуют данные Rahhal R.M. et al. [17] о возможности ЛПС *F.tularensis* через активацию В-лимфоцитов, сопровождающуюся продукцией провоспалительных цитокинов, активировать другие иммунокомпетентные клетки периферической крови.

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют в пользу того, что ЛПС совместно с белковыми антигенами является важным компонентом бактериальной клетки, участвующим в индукции протективного иммунитета против туляремии. В то же время, очищенные препараты ЛПС не способны активировать гуморальное или клеточное звенья специфического иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волох О.А., Кузнецова Е.М., Смолькова Е.А., Шуковская Т.Н., Бугоркова С.А., Авдеева Н.Г., Филимонова Д.Г., Шмелькова Т.П., Ключева С.Н., Никифоров А.К. Экспериментальный препарат для специфической профилактики туляремии. Проблемы ООИ. 2013, 2: 73-77.
2. Волох О.А., Шепелев И.А., Фирстова В.В., Храмова Е.М., Авдеева Н.Г., Самохвалова С.А., Еремин С.А., Дятлов И.А., Жемчугов В.Е. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса возбудителя туляремии как перспективного компонента химических вакцин. Журн. микробиол. 2007, 3: 16-21.
3. Кузнецова Е.М., Шепелев И.А., Волох О.А. Структурно-функциональная характеристика основных антигенов *Francisella tularensis*. Проблемы ООИ. 2009, 100: 44-48.
4. МУ 3.1.2007-05. Эпидемиологический надзор за туляремией: Методические указания. М., Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2005.
5. Николаев В.Б. Физико-химические и иммунобиологические свойства антигенов туляремийного микроба: Автореф. дис. канд. мед. наук. Иркутск, 2005.
6. Оноприенко Н.Н. Сравнительная характеристика липополисахаридов бактерий рода *Francisella*. Автореф. дис. канд. биол. наук. Саратов, 2001.
7. Оноприенко Н.Н., Павлович Н.В. Роль липополисахарида в токсичности бактерий рода *Francisella*. Мол. генетика, микробиол. и вирусол. 2003, 3: 25-28.
8. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis*. Антибиотики и мед. биотехнол. 1987, 32 (2): 133-137.
9. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н., Данилевская Г.И. и др. Получение бескапсульных вариантов *Francisella tularensis*. Журн. микробиол. 1993, 2:7-11.
10. Савельева Р.А., Ананова Е.В., Пронин А.В. и др. Определение продолжительности поствакцинального иммунитета против туляремии. Журн. микробиол. 1995, 6: 51-52.
11. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В., Сорокин В.М., Тынкевич Н.К. Способность

- авирулентных форм *Francisella tularensis* к диссеминации и пролиферации в организме хозяина. Журн. икробиол. 1996, 2: 10-13.
12. Darveau R.P., Hancock R.E.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. J. Bacteriol. 1983, 155 (2): 831-838.
 13. De Pascalis R., Chou A.Y., Bosio C.M. et al. Development of functional and molecular correlates of vaccine-induced protection for a model intracellular pathogen, *F. tularensis* LVS. PLoS Pathog. 2012, 8 (1):1-14.
 14. Isherwood K.E., Titball R.W., Davies D.H. et al. Vaccination strategies for *Francisella tularensis*. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2005, 57 (9): 1403-1414.
 15. Khlebnikov V.S., Golovliov I., Kulevatsky D.P. et al. Outer membranes of lipopolysaccharide-protein complex (LPS-17 kDa protein) as chemical tularemia vaccines. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996, 13: 227-235.
 16. Oyston P.C., Griffiths R. *Francisella* virulence: significant advances, ongoing challenges and unmet needs. Expert. Rev. Vaccines. 2009, 8 (11): 1575-1585.
 17. Rahhal R.M., Vanden Bush T.J., McLendon M.K. et al. Differential effects of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide on B lymphocytes. J. Leukoc. Biol. 2007, 82: 813-820.
 18. Richard K., Mann B. J., Stocker L. et al. Novel cationic surfactant vesicle vaccines protect against *Francisella tularensis* LVS and confer significant partial protection against *F. tularensis* Schu S4 strain. Clin. Vac. Immunol. 2014, 21 (2): 212-226.
 19. Sandström G., Tärnvik A., Wolf-Watz H. Immunospecific T-lymphocyte stimulation by membrane proteins from *Francisella tularensis*. J. Clin. Microbiol. 1987, 25 (4): 641-644.
 20. Sjöstedt A., Sandström G., Tärnvik A. Several membrane polypeptides of the live vaccine strain *Francisella tularensis* LVS stimulate T cells from naturally infected individuals. J. Clin. Microbiol. 1990, 28 (1): 43-48.
 21. Surcel H.M., Sarvas M., Helander I.M., Herva E. Membrane proteins of *Francisella tularensis* LVS differ in ability to induce proliferation of lymphocytes from tularemia-vaccinated individuals. Microb. Pathog. 1989, 7 (6): 411-419.
 22. Tärnvik A. Nature of protective immunity to *Francisella tularensis*. Rev. Infect. Dis. 1989, 11 (3): 440-451.

Поступила 20.04.15

Контактная информация: Оноприенко Наталья Николаевна, к.б.н., 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863)240-27-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Д.В.Ульшина, Д.А.Ковалев, А.М.Жиров, Н.В.Жаринова, А.А.Худолеев, О.И.Коготкова, В.И.Ефременко, Н.И.Евченко, А.Н.Куличенко

ОСОБЕННОСТИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ ПРОФИЛЕЙ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА ПРИ ПОДГОТОВКЕ КУЛЬТУРЫ НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Ставропольский противочумный институт

Цель. С помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) провести сравнительный анализ белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза (*Brucella melitensis* Rev-1 и *Brucella abortus* 19ВА), выращенных на разных питательных средах: агар Альбими, бруцеллагар и эритрит-агар. *Материалы и методы.* Вакцинные штаммы: *Brucella melitensis* Rev-1 и *Brucella abortus* 19ВА. Белковое профилирование в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex «Bruker Daltonics». *Результаты.* Выявлен ряд характерных особенностей масс-спектров бруцелл: в частности, сохранение общего качественного состава белковых профилей культур и значительные различия в интенсивности отдельных пиков в зависимости от используемой питательной среды. *Заключение.* На основе анализа полученных данных показано, что применение агара Альбими в качестве питательной среды при подготовке образцов культур бруцелл для масс-спектрометрического анализа является оптимальным.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, белковое профилирование, возбудитель бруцеллеза

D.V.Ulshina, D.A.Kovalev, A.M.Zhirov, N.V.Zharinova, A.A.Khudoleev, O.I.Kogotkova, V.I.Efremenko, N.I.Evchenko, A.N.Kulichenko

FEATURES OF MASS-SPECTROMETRIC PROTEIN PROFILES OF STRAINS OF BRUCELLOSIS CAUSATIVE AGENT DURING PREPARATION OF CULTURE ON VARIOUS NUTRIENT MEDIA

Stavropol Institute for Plague Control, Russia

Aim. Carry out comparative analysis using time-of-flight mass-spectrometry with matrix laser desorption/ionization (MALDI-TOF MS) of protein profiles of brucellosis causative agents (*Brucella melitensis* Rev-1 and *Brucella abortus* 19BA), cultivated in various nutrient media: Albimi agar, brucellagar and erythrit-agar. *Materials and methods.* Vaccine strains: *Brucella melitensis* Rev-1 and *Brucella abortus* 19BA. Protein profiling in linear mode on Microflex «Bruker Daltonics» MALDI-TOF mass-spectrometer. *Results.* A number of characteristic features of brucella mass-spectra was detected: in particular, preservation of the total qualitative composition of protein profiles of cultures and significant differences in the intensity of separate peaks depending on the nutrient medium used. *Conclusion.* Based on the analysis of the data obtained, use of Albimi agar as the nutrient medium for preparation of brucella culture samples for mass-spectrometric analysis was shown to be optimal.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 29—34

Key words: mass-spectrometry, protein profiling, brucellosis causative agent

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез — зоонозное инфекционно-аллергическое заболевание, склонное к хроническому течению, вызываемое микроорганизмом рода *Brucella*. По данным Роспотребнадзора в Российской Федерации в 2014 году было зарегистрировано свыше 400 случаев впервые выявленного бруцеллеза среди людей, наиболее часто на территории СКФО, республик Дагестан и Тыва [3].

В схему лабораторной диагностики бруцеллеза входят бактериологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы [2], позволяющие идентифицировать и дифференцировать бруцеллы до вида и биовара. В настоящее время наряду с традиционными методами идентификации патогенов получили распространение физико-химические методы анализа, базирующиеся на количественном измерении физических свойств веществ и характеризующиеся высокой автоматизацией, скоростью и простотой исследований [5].

Один из современных методов идентификации бактерий — времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS), основанная на исследовании специфичных белковых профилей отдельных микроорганизмов [11]. Получение специфичных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза дает основание для эффективного применения MALDI-TOF в целях быстрой идентификации патогена. Однако, несмотря на широкие потенциальные возможности использования этого подхода для идентификации и типирования микроорганизмов и, в частности, возбудителя бруцеллеза, на данный момент отсутствуют стандартные процедуры выполнения анализа, нет единого протокола подготовки проб при идентификации бруцелл.

При культивировании бруцеллезного микроба клетки высевают на различные питательные среды: печеночный и мясо-печеночный с добавлением глицерина (2%) и глюкозы (1%) агар, сывороточно-декстрозный, картофельно-сывороточный, триптикозно-соевый, триптозный и кровяной агары в аэробных условиях при температуре 37°С в нейтральной среде (рН 6,8 — 7,2). Потребность бруцелл в источнике азота и дополнительных факторах роста обеспечивается при наличии в питательном субстрате аминокислот: глутаминовой, L-аланина, лизина, метионина, гистидина, цистеина, а также комплекса витаминов группы В (В1, В2, В6) и никотиновой кислоты [4]. Вследствие того, что бруцеллы характеризуются при культивировании относительно медленным ростом, рекомендовано использовать селективные питательные среды, обеспечивающие ингибирование или уменьшение числа колоний остальных микроорганизмов, особенно в загрязненных образцах или в образцах, содержащих очень небольшое число жизнеспособных клеток возбудителя бруцеллеза.

В ряде научных публикаций сообщается о существенном влиянии условий культивирования микроорганизмов на характеристики полученных масс-спектров [9, 10]. Поэтому одним из актуальных направлений научного поиска остается изучение зависимости результатов идентификации от условий культивирования штаммов возбудителя бруцеллеза, таких как качество питательной среды, время роста и др.

Цель работы — оценить влияния культивирования бруцелл на различных средах на MALDI-TOF масс-спектрометрические профили экстрактов выращенных штаммов, полученных с использованием стандартизированной процедуры пробоподготовки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы вакцинные штаммы бруцелл: *Brucella melitensis* Rev-1 и *Brucella abortus* 19ВА из коллекции Ставропольского противочумного института. Вода ультрачистая (тип I по ASTM) (система Millipore, США); спирт этиловый 96% (ГОСТ Р 51723-2001); кислота муравьиная, ~ 98% (Sigma-Aldrich, США); ацетонитрил (степень чистоты «для ВЭЖХ-МС») (Sigma-Aldrich, США); α -циано-4-гидроксикоричная кислота (степень чистоты для масс-спектрометрии) (Sigma-Aldrich, США); трифторуксусная кислота, >99% (Sigma-Aldrich, США); бактериальный тест-стандарт МВТ (Bruker Daltonics, Германия). Коммерческие стандартизированные питательные среды: бруцеллагар (ГНЦ ПМБ), показатели качества: рН 7,0 — 7,2, прочность 310 — 390 г по Валенту, содержание аминного азота 120 — 130 мг %; эритрит-агар (НПО «Микроген»), показатели качества: рН 7,0 — 7,4, прочность 310 — 390 г по Валенту, содержание аминного азота 90 — 100 мг%; агар Альбими (Ставропольский противочумный институт), изготовлен из коммерчески доступных стандартных компонентов, показатели качества: рН 7,2 — 7,4, прочность 300 — 380 г по Валенту, содержание аминного азота 100 — 120 мг %).

Вследствие нестабильности свойств плотных питательных сред разных серий, приготовленных по одному и тому же рецепту, большое значение имеет их контроль по физико-химическим показателям: прозрачность и цветность, кислотность, содержание хлоридов и аминного азота, стерильность, температура плавления студня среды, температура застудневания среды, плотность студня среды. Кроме того, стандартность питательных сред обеспечивается комплексом контрольных процедур, включающих использование контрольных штаммов микроорганизмов, позволяющих сделать заключение о пригодности испытуемых сред для проведения бактериологических исследований.

Процедура предварительной проверки питательной среды: из 2-суточных культур *B. melitensis* и *B. abortus* готовили по 20 мкл суспензии в концентрации

200 м.к./мл (по стандартному образцу мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича) для посева на 4 чашки. Через 5 суток культивирования при 37°C на 1 чашке Петри в среднем выросло 10 — 100 колоний бруцелл, что свидетельствовало о кондиционности тестируемых сред. Для скашивания агар располагали в наклонном положении, после его застывания выдерживали в течение 5 — 7 суток при комнатной температуре и использовали для выращивания бруцелл.

При I пассаже вносили в ампулу с лиофилизированной культурой пастеровской пипеткой 0,4 мл питательного бульона, перемешивали до получения однородной микробной взвеси и этой же пипеткой засеивали на чашку Петри с питательным агаром (толщина слоя $6 \pm 0,5$ мм), посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Затем, культуру I пассажа высевали в пробирки со скошенным агаром, инкубировали при 37°C 48 ч. В качестве инокулята использовали одну бактериологическую петлю ($d=2$ мм) из суспензии культуры первой генерации, приготовленной 10-кратным разведением путем последовательного переноса 0,5 мл взвеси культуры в пробирки с 4,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Взвесь культуры второй генерации доводили, используя стерильный 0,9% раствор натрия хлорида, до оптической плотности, соответствовавшей $1,0 \times 10^9$ м.к./мл (по стандартному образцу мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича), затем десятикратными разведениями — до 1×10^6 м.к./мл.

Обеззараживание проб культур возбудителя бруцеллеза проводили путем обработки раствором 70% этилового спирта по ранее описанной методике [7], в которую в ходе исследования были внесены незначительные модификации. Белковые экстракты для MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа получали посредством обработки обеззараженных проб 70% раствором муравьиной кислоты.

Регистрацию масс-спектров осуществляли в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) при следующих параметрах: частота лазера 60 Hz, интенсивность лазера 10 — 50%, 110 нс P1E, напряжение 1 источника ионов 19,4 kV, 2 — 17,3 kV, напряжение линзы 8 kV, напряжение линейного детектора 2,500 kV, рабочий диапазон масс 2000 — 20000 Da. При подборе условий получения каждого одиночного спектра использовали 40 импульсов лазера (частота 60 Hz) для обеспечения оптимальной чувствительности детектирования компонентов образцов. Суммарный масс-спектр генерировали из 10 случайно выбранных позиций каждой капли мишени (всего по 4000 выстрелов лазера). Каждая серия анализов сопровождалась внутренней калибровкой с использованием бактериального тест-стандарта MBT. Формирование масс-спектров проводили в программах Daltonics flexControl v 3.3.64 (Bruker Daltonics, Германия), визуализацию и предварительный анализ полученных масс-спектров проводили в программе flexAnalysis v 3.3.65 (Bruker Daltonics, Германия).

Для математико-статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica v 10.0 (Statsoft Inc., США). Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения (M) \pm стандартное отклонение (SD). Анализ групповых различий оценивали по t-критерию Стьюдента для несвязанных выборок при 95% уровне значимости. Различия между выборками считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования проведен MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ белковых экстрактов вакцинных штаммов бруцелл *B. melitensis* Rev-1 и *B. abortus* 19VA, полученных на агаре Альбими, бруцеллагаре и эритрит-агаре. Всего было зарегистрировано 630 масс-спектров (по 20 масс-спектров каждого белкового экстракта), наиболее репрезентативные из полученной коллекции были отобраны для проведения сравнительного анализа полученных данных.

Воспроизводимость результатов анализа была подтверждена путем исследования пяти культур каждого штамма, выращенных в стандартных условиях на каждой из выбранных питательных сред. При проведении сравнительного анализа соответствующих белковых экстрактов, полученных в одинаковых условиях, изменений качественного состава масс-спектров не выявлено. Данные белкового профилирования штаммов возбудителя бруцеллеза в целом согласуются с результатами более ранних работ [6]. Необходимо отметить, что рибосомальные белки, относящиеся к белкам домашнего хозяйства, присутствуют в большом количестве в цитоплазме клетки, их набор остается неизменным вне зависимости от внешних условий и стадии роста [1]. Вероятность присутствия экзогенных белков, в том числе из питательной среды, в исследованных образцах не оказывает влияния на результаты белкового профилирования, вследствие особенностей пробоподготовки (экстракция фракции основных белков, анализ сигналов в диапазоне масс 2 — 20 kDa).

Сравнительный анализ пиков на спектрах бруцелл позволил выявить ряд особенностей. Общее число идентифицированных пиков на масс-спектрах для штамма *B. melitensis* Rev-1, культивированных на агаре Альбими, бруцеллагаре и эритрит-агаре, составило 77 ± 3 ; 65 ± 5 и 41 ± 4 соответственно. Для штамма *B. abortus* 19VA при использовании вышеуказанных питательных сред суммарное количество сигналов составило 96 ± 5 ; 89 ± 4 и 52 ± 4 соответственно.

Наиболее представительные по числу сигналов масс-спектры были отмечены для белковых экстрактов бруцелл, полученных на агаре Альбими, что обусловлено, на наш взгляд, оптимальным количественным соотношением азота и углерода, обеспечивающих максимальный ростостимулирующий эффект клеток бактерий.

Анализ масс-спектров белковых экстрактов штаммов возбудителя бруцеллеза, выращенных в течение 12, 48, и 72 ч на каждой из тестируемых питательных сред, позволил установить влияние времени инкубации на характер получаемых данных. Интенсивность мажорных сигналов на масс-спектрах штаммов бруцелл, собранных спустя 48 ч (окончание экспоненциальной фазы роста [8]), была максимальной. При сравнительном анализе спектров экстрактов культур после 12 ч инкубации (латентная фаза) наблюдалось снижение интенсивности (на $40 \pm 5\%$) анализируемых пиков. Однако на масс-спектрах бруцелл, отобранных через 72 ч (завершение стационарной фазы роста), интенсивность сигналов не изменялась, что, возможно, вызвано переходом популяции в фазу замедления роста, сопровождающуюся истощением питательных веществ с характерным сокращением метаболической активности.

Абсолютная интенсивность мажорных пиков на полученных масс-спектрах в случае использования агара Альбими составила: (a.i.) $35\ 187 \pm 530$; $48\ 698 \pm 435$; $54\ 751 \pm 560$, что существенно превосходит аналогичные сигналы для исследуемых образцов белковых экстрактов с использованием бруцеллагара ($13\ 810 \pm 240$; $15\ 035 \pm 310$; $13\ 845 \pm 295$ соответственно) и эритрит-агара ($11\ 281 \pm 150$; $11\ 692 \pm 220$; $12\ 877 \pm 200$ соответственно). Таким образом, белковые профили экстрактов культур бруцелл, выращенных на агаре Альбими, характеризовались максимальной интенсивностью специфичных пиков.

Исследуемые спектры возбудителя бруцеллеза содержали общий набор из 17 сигналов в интервале масс 2000 — 20000 Da, отличающихся по интенсивности ($m/z \pm 5$ Da): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16 068.

Сравнительный анализ групп специфичных пиков на полученных масс-спектрах позволил установить стабильность их состава в белковых портретах бруцелл независимо от используемой питательной среды, что, в свою очередь, подтверждает предположение о консервативности состава основных белков воз-

будителя в исследуемом диапазоне. При этом экспериментально было установлено, что относительная интенсивность отдельных сигналов белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза напрямую зависит от свойств питательной среды.

Полученные в ходе исследования результаты в целом позволяют сделать вывод о том, что применение агара Альбими в качестве питательной среды при культивировании бруцелл для масс-спектрометрического анализа является оптимальным.

Необходимо отметить, что использование регламентированных методик обеззараживания и подготовки проб культур патогенных микроорганизмов, в том числе стандартизованных питательных сред, позволит обеспечить необходимый уровень достоверности и воспроизводимости результатов масс-спектрометрического анализа, что имеет большое значение, учитывая широкое внедрение технологии MALDI-TOF MS в лабораторную практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демидов Е.А., Старостин К.В., Попок В.М., Пельтек С.Е. Применение малди время-пролетной масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013, 17 (4/1): 758-764.
2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство. Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. М., Шико, 2013.
3. Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2014 г. и прогноз на 2015 г. Пробл. особо опасных инфекций. 2015, 2: 22-24.
4. Методические указания МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза».
5. Charnot-Katsikas A., Tesic V., Boonlayangoor S. et al. Prospective evaluation of the VITEK MS for the routine identification of bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory: assessment of accuracy of identification and turnaround time. J. Med. Microbiol. 2014, 63 (2): 235-241.
6. Ferreira L., Castaño S. V., Sánchez-Juanes F. et al. Identification of Brucella by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. PLoS One. 2010, 5 (12): 1-8.
7. Lista F., Reubsaet F., De Santis R. et al. Reliable identification at the species level of Brucella isolates with MALDI-TOF-MS. BMC Microbiol. 2011, 11: 267.
8. Murthy R.V., Arora J.S., Kumar B.V.S. Comparative proteome analysis of Brucella abortus under different growth conditions by two dimensional electrophoresis. IJAR. 2015, 3 (2): 795-800.
9. Ruelle V., El Moualij B., Zorzi W. et al. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004, 18 (18): 2013-2019.
10. Valentine N., Wunschel S., Wunschel D. et al. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71 (1): 58-64.
11. Van Veen S.Q., Claas E.C.J., Kuijper Ed J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J. Clin. Microbiol. 2010, 48 (3): 900-907.

Поступила 15.08.15

Контактная информация: Ульшина Диана Васильевна,
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-12

Ю.В.Останкова¹, А.В.Семенов¹, Н.А.Стойнова¹, Н.К.Токаревич¹,
Н.Е.Любимова¹, О.А.Петрова¹, Ю.В.Ананьина², Е.М.Петров²

ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *LEPTOSPIRA SPP.* НА ОСНОВЕ 16S рРНК

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург; ²Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Сравнительное типирование коллекции штаммов *Leptospira spp.* на основе анализа 16S фрагмента РНК. *Материалы и методы.* Для ПЦР использовали две пары праймеров, совместно фланкирующих фрагмент размером 1423 п.о. Для филогенетического анализа были использованы последовательности штаммов 16S рРНК *Leptospira spp.*, представленные в международной базе данных. *Результаты.* Показано высокое сходство, в том числе межвидовое, 16S фрагмента у штаммов *Leptospira spp.*, независимо от источника получения, серовара и серогруппы. Обсуждаются гетерогенность первичной матрицы, спонтанные мутации горячих точек и ошибочные спаривания нуклеотидов, характерные для 16S последовательности патогенных штаммов *Leptospira spp.* Получена молекулярно-генетическая характеристика некоторых референсных штаммов *Leptospira spp.* по 16S последовательности. *Заключение.* Результаты исследований свидетельствуют о целесообразности введения в клиническую практику идентификацию штаммов *Leptospira spp.* по 16S последовательности непосредственно из клинического материала, что позволит значительно сократить время идентификации, отказаться от сложных типоспецифических сывороток и иных трудоемких методов.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 35—39

Ключевые слова: лептоспироз, зооантропонозы, 16S РНК секвенирование

Yu.V.Ostankova¹, A.V.Semenov¹, N.A.Stoyanova¹, N.K.Tokarevich¹,
N.E.Lyubimova¹, O.A.Petrova¹, Yu.V.Ananina², E.M.Petrov²

TYPING OF *LEPTOSPIRA SPP.* STRAINS BASED ON 16S rRNA

¹Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg; ²Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. Comparative typing of *Leptospira spp.* strain collection based on analysis of 16S RNA fragment. *Materials and methods.* 2 pairs of primers were used for PCR, that jointly flank 1423 b.p. sized fragment. Sequences of *Leptospira spp.* strain 16S rRNA, presented in the international database, were used for phylogenetic analysis. *Results.* A high similarity, including interspecies, of the 16S fragment in *Leptospira spp.* strains was shown independently of the source, serovar and serogroup. Heterogeneity of the primary matrix, spontaneous mutations of hotspots and erroneous nucleotide couplings, characteristic for 16S sequence of pathogenic *Leptospira spp.* strains, are discussed. Molecular-genetic characteristic of certain reference *Leptospira spp.* strains by 16S sequence is obtained. *Conclusion.* Results of the studies give evidence on expedience of introduction into clinical practice of identification of *Leptospira spp.* by 16S sequence directly from the clinical material, that would allow to significantly reduce identification time, dismiss complex type-specific sera and other labor-intensive methods.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 35—39

Key words: leptospirosis, zoo anthroponoses, 16S RNA sequencing

ВВЕДЕНИЕ

Лептоспироз — широко распространенная в мире зооантропонозная инфекция. Наиболее высокий уровень заболеваемости людей отмечается в странах с влажным субтропическим и тропическим климатом, где регистрируется вспышки, возникающие в сезон дождей и охватывающие сотни человек [2, 8]. В России более чем в 50 субъектах федерации ежегодно выявляются заболевания лептоспирозом, и летальность при этой инфекции на некоторых территориях превышает 20%, что позволяет рассматривать лептоспироз в одном ряду с особо опасными инфекциями [1].

Возбудителями лептоспироза являются микроорганизмы *Leptospira interrogans sensu lato*, принадлежащие к порядку Spirochaetales, самостоятельного семейства Leptospiraceae, рода *Leptospira*. Один и тот же серовар лептоспир у разных людей может вызывать разное по течению и симптоматике заболевание. Однако *L. icterohaemorrhagiae* в большинстве случаев протекает более тяжело с высоким процентом летальности. В настоящее время систематика и номенклатура лептоспир включает две различные классификационные системы: серологическую и генотипическую. Таксономическим критерием для серологической системы служит антигенный состав, и основным таксоном является серовар. В настоящее время насчитывается более 268 серологических вариантов патогенных лептоспир. В основе генотипической классификации лептоспир лежит различие в размере и структуре генома. В ряде случаев генотипическая классификация не всегда коррелирует с серологической — лептоспиры одной серогруппы могут принадлежать к разным геновидам [Paul N., Levett P., 2001]. В настоящее время как за рубежом, так и в России проводятся активные исследования по изучению генома и генетического разнообразия лептоспир, а также по определению возможности использования молекулярно-генетических методов для решения диагностических и эпидемиологических задач.

В связи с этим, целью данной работы являлось сравнительное типирование коллекции штаммов *Leptospira spp.* на основе анализа 16S фрагмента РНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для работы стали международные референс-штаммы, используемые в лаборатории зооантропонозных инфекций Санкт-Петербургского НИИЭМ им. Пастера для диагностики лептоспироза в реакции микроагглютинации, а также новый штамм № 350 «А», выделенный в 2013 году из крови человека (табл.). Штамм «А» депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ — Оболенск» для целей национальной патентной процедуры (№ В-7745 от 05.11.2014).

Для исключения контаминаций и иных ошибок человеческого фактора в качестве контроля из музея лептоспир Центра Минздрава России по лептоспирозам при ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи методом случайной выборки были взяты четыре референсных штамма, аналогичных исследованным в работе. Контейнеры с полученными штаммами были открыты единственный раз непосредственно перед выделением нуклеиновых кислот (НК). Таким образом, исключали возможные заносы в процессе пересевания и роста культур. Полученные последовательности 16S полностью совпадали с соответствующими последовательностями аналогичных штаммов, культивированных в нашей лаборатории.

Серологическое типирование штаммов проведено с помощью перекрестной реакции микроагглютинации (РМА) по методике, предложенной в [5].

Выделение НК проводили двумя методами, принцип действия которых основан на лизисе клеток и денатурации клеточных белков с помощью раствора, содержащего гуанидин тиоцианат, и последующим осаждением нуклеиновых кислот

Штаммы *Leptospira* spp., использованные в работе

Штамм	Серогруппа	Серовар	Где, когда, кем выделен
Akiyami A	Autumnalis	Autumnalis	Япония, 1925, Koshina et al.
Castellon-3	Ballum	Castellonis	Испания, 1955, Babudieri
Veldrat Bataviae 46 ¹	Javanica	Javanica	Индонезия, 1938, Esseveld, Mochtar
Mus-24 ²	Sejroe	Saxkoebing	Дания, 1942, Borg-Petersen
M-84	Sejroe	Sejroe	Дания, 1937, Borg-Petersen, Christensen
3705	Wolffi	Sejroe	Индонезия, 1937, Wolff
M-20	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Дания, 1935, Borg-Petersen
Hond Utrecht 1V ³	Canicola	Canicola	Голландия, 1931, Klarenbeck, Schuffner
Pomona	Pomona	Pomona	Австралия, 1936, Clayton et al.
5621 ⁴	Pomona	Mozdok	СССР, 1961, Семенова
Salinem	Pyrogenes	Pyrogenes	Индонезия, 1922, Vervoort
Ballico	Australis	Australis	Австралия, 1937, Lumley
Van Tienen	Bataviae	Bataviae	Индонезия, 1925, Walch
Moskva-V	Grippotyphosa	Grippotyphosa	СССР, 1928, Тарасов
Perpelicin	Tarassovi	Tarassovi	СССР, 1938, Киктенко, Ананьин
Абайдуллаев № 350	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Россия, 2013, Стоянова

Примечание. Источник выделения: ¹ черная крыса, ² желтогорлая мышь, ³ собака, ⁴ полевка обыкновенная, в остальных случаях — человек.

изопропанолом и/или этанолом: хлороформ-солевая экстракция и с помощью тест-системы «АмплиПрайм Рибо-преп» (ЦНИИЭ). Выход рРНК при использовании тест-системы был меньше, однако достаточный для дальнейшей работы с полученной НК. Обратная транскрипция проводилась на неспецифичных праймерах. Для ПЦР использовали две пары праймеров, совместно фланкирующих фрагмент размером 1423 пар оснований (п.о.), сконструированных на основе нуклеотидной последовательности 16S рРНК. При этом одна из пар специфична для лептоспир.

Постановку ПЦР для каждой пары праймеров осуществляли по следующей схеме: в пробирке объемом 1,5 мл смешивали 16,6 мМ сульфата аммония; 67 мМ трис HCl, pH 8,8; 6,7 мМ MgCl₂; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 6,7 мкМ ЭДТА; 0,17 мг/мл бычьего сывороточного альбумина; 1 мМ смеси четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов; 1 ед. активности Taq ДНК-полимеразы и по 30 пМ каждого олигопраймера. В полученную смесь для ПЦР добавляли 1 мкг исследуемого образца. Амплификацию проводили при условиях: после денатурации (94°C, 5 мин) устанавливали 40 циклов амплификации в режиме 94°C — 30 сек. (денатурация); 55°C — 30 сек (отжиг праймеров); 72°C — 1 мин 30 сек (синтез). Финальный синтез при 72°C длился 7 мин.

Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Продукты первичной амплификации и секвенирующей реакции очищали по следующей методике: смесь из 2 мкл 3М ацетата натрия, 2 мкл 0,125М EDTA и 1 мкл гликогена вносили в 20 мкл продукта амплификации и инкубировали при комнатной температуре в присутствии охлажденного 96% этилового спирта 15 минут. Центрифугировали при 14 000 об/мин, 4°C 15 мин супернатан удаляли и дважды промывали осадок охлажденным 70% этиловым спиртом, повторяя процедуру центрифугирования на холоде. Промытый осадок сушили.

Для анализа качества очищения осадок растворяли в 30 мкл TE-буфера и визуализировали в агарозном геле. Очищенный фрагмент достаточной концентрации использовали для постановки секвенирующих реакций с прямого и обратного праймеров. Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок растворяли в SLS-буфере, содержащем формамид, и помещали в генетический анализатор.

В связи с обнаруженной высокой схожестью 16S последовательностей штаммов разных видов, было высказано предположение о контаминации, так как известно, что содержание коллекций референсных штаммов нередко осложняется проблемой перекрестных заносов [3]. Однако использование в работе контрольных штаммов исключило эту вероятность. Проанализировав фрагменты НК штаммов, представленных в нашей работе и в международной базе данных, мы пришли к выводу, что их последовательности 16S имеют крайне незначительные межвидовые отличия на данных участках, которые легко могут быть отнесены к гетерогенности первичной матрицы или спонтанным мутациям горячих точек. То есть оценка только по 16S фрагменту не позволяет достаточно точно типировать *Leptospira* spp., что противоречит некоторым данным о высокой специфичности типирования *Leptospira* spp. по 16S [7], но совпадает с результатами, демонстрирующими необходимость дополнительного типирования штаммов по специфичным генам в связи с вероятной идентичностью результатов 16S типирования и метода серологического типирования [4].

Кроме того, возможной причиной сходства последовательностей могут являться ошибочные спаривания нуклеотидов, характерные для 16S последовательности патогенных штаммов *Leptospira* spp. [6].

Таким образом, очевидна необходимость идентификации *Leptospira* spp. по специфическим генам, что позволит контролировать качество работы лаборатории, а также будет способствовать сохранению коллекционных штаммов.

Результаты наших исследований свидетельствуют о целесообразности введения в клиническую практику идентификацию штаммов *Leptospira* spp. по 16S последовательности непосредственно из клинического материала, что значительно сократит время идентификации и исключит необходимость использования типоспецифических сывороток и иных трудоемких методов. Использование для характеристики штаммов *Leptospira* spp. метода секвенирования 16S рРНК с последующим филогенетическим анализом позволит выявить молекулярно-генетическую основу внутривидовой гетерогенности штаммов, а также с большим успехом решать такие эпидемиологические задачи, как поиск источника заражения, закономерности распространения инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы в Российской Федерации: современные особенности эпидемического проявления природных и техногенных очагов. Ветеринарная патология. 2004, 4: 54-57.
2. Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Ваганова А.Н. Лептоспирозы: пособие для врачей. Санкт-Петербург, 2010.
3. Chappel R.J., Goris M., Palmer M.F. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 2004, 42: 5484-5488.
4. Cerqueira G.M., McBride A.J.A., Queiroz A. et al. Monitoring leptospira strain collections: The need for quality control. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2010, 82 (1): 83-87.
5. Faine S., Adler B., Bolin C. *Leptospira* and Leptospirosis. Melbourne, Australia, 1999.
6. Morey R.E., Galloway R.L., Bragg S.L. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. J. Clin. Microbiol. 2006, 44: 3510-3516.
7. Postic D., Riquelme-Sertour N., Merien F. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. Res. Microbiol. 2000, 151 (5): 333-341.
8. Sagunan A. Risk factor associated with leptospirosis during an outbreak in Middle Andaman, India. Indian J. Med. Res. 2009, 130 (1): 114-116.

Поступила 10.04.15

Контактная информация: Останкова Юлия Владимировна,
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812)232-81-22

СПЕКТР АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ОХА-КАРБАПЕНЕМАЗ СРЕДИ ШТАММОВ ACINETOBACTER BAUMANNII, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ ХИРУРГИЧЕСКИХ И РЕАНИМАЦИОННЫХ ОТДЕЛЕНИЙ В МОСКВЕ

Научный центр здоровья детей, Москва

Цель. Охарактеризовать спектр антибиотикорезистентности штаммов *Acinetobacter baumannii*, изолированных от пациентов 8 хирургических и реанимационных отделений 3 лечебных учреждений в городе Москва, и определить молекулярно-генетические механизмы устойчивости их карбапенем-резистентных форм. *Материалы и методы.* Исследовано 95 штаммов *A. baumannii*, изолированных от пациентов реанимационных и хирургических отделений города Москва в 2012 — 2014 годах. Чувствительность штаммов к антибиотикам была протестирована фенотипически согласно рекомендациям EUCAST. Наличие у исследуемых штаммов генов VIM, IMP, OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-58 и NDM определяли при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени. *Результаты.* Нечувствительными к карбапенемам оказались 86,3% штаммов, чувствительными — 13,7%. К гентамицину были нечувствительны 80,0% штаммов, к нетилмицину — 80,0% штаммов, к ципрофлоксацину — 94,7% штаммов, к колистину — 2,1%. Нечувствительность к представителям двух и более классов антибиотиков проявляли 91,6% изолятов, представителям трех классов — 78,9% штаммов. Два штамма были панрезистентны, 4,2% (4/95) изолятов были чувствительны ко всем классам антибиотиков. Металло-β-лактамазы не были обнаружены. Гены карбапенемаз (OXA-23 и/или OXA-40) были выявлены у 85,3% (81/95) штаммов, охарактеризованных фенотипически как нечувствительные к карбапенемам. *Заключение.* Полученные результаты говорят о росте резистентности к карбапенемам и множественной резистентности у клинически значимых штаммов *A. baumannii*. Резистентность к карбапенемам ассоциирована с генами OXA-23 и OXA-40. Выводы позволяют обосновать перспективность внедрения технологий молекулярно-генетического тестирования антибиотикорезистентности.

Журн.микробиол., 2016, № 1, С. 40—45

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii*, антибиотики, резистентность, гены карбапенемаз

О.А.Крыжановская, А.В.Лазарева, И.В.Чеботарь, Ю.А.Бочарова, Н.А.Маянский

SPECTRUM OF ANTIBIOTIC RESISTANCE AND PREVALENCE OF OXA-CARBAPENEMASES AMONG ACINETOBACTER BAUMANNII STRAINS, ISOLATED FROM PATIENTS OF SURGICAL AND REANIMATION DEPARTMENTS IN MOSCOW

Scientific Centre of Children's Health, Moscow, Russia

Aim. Characterize spectrum of antibiotics resistance of *Acinetobacter baumannii* strains, isolated from patients of 8 surgical and reanimation departments of 3 medical institution of Moscow, and determine molecular-genetic mechanisms of stability of their carbapenem-resistant forms. *Materials and methods.* 95 strains of *A. baumannii*, isolated from patients of reanimation and surgical departments of Moscow in 2012 — 2014, were studied. Sensitivity of strains to antibiotics was tested phenotypically according to recommendations of EUCAST. The presence of VIM, IMP, OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-58 and NDM genes in the studied strains was determined by polymerase chain reaction in real time. *Results.* 86.3% of strains turned out to be non-sensitive to carbapenems, sensitive — 13.7%. 80.0% of strains were non-sensitive to gentamicin, 80.0% of strains — to netilmicin, 94.7% of strains — to ciprofloxacin, 2.1% — to colistin. 91.6% of isolates have shown non-sensitivity to members of 2 and more classes of antibiotics, 78.9% of strains — to members of 3 classes. 2 strains were panresistant, 4.2% (4/95) of the isolates were sensitive to all

the classes of antibiotics. Metallo- β -lactamases were not detected. Genes of carbapenemases (OXA-23 and/or OXA-40) were detected in 85.3% (81/95) of strains, characterized phenotypically as non-sensitive to carbapenems. *Conclusion.* The results obtained shown an increase of resistance to carbapenems and multiple resistance in clinically significant strains of *A. baumannii*. Resistance to carbapenems is associated with OXA-23 and OXA-40 genes. The conclusions allow to justify perspectives of introduction of technologies of molecular-genetic testing of antibiotics resistance.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 40—45

Key words: *Acinetobacter baumannii*, antibiotics, resistance, carbapenemase genes

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, вызванные *Acinetobacter baumannii*, занимают важнейшее место в структуре инфекционной заболеваемости в госпитальных условиях [4, 5, 8]. Летальность при ацинетобактериальных госпитальных инфекциях может достигать 59% [5]. Крайне негативным клиническим свойством ацинетобактерий является антибиотикорезистентность, которая проявляется в устойчивости многих госпитальных штаммов к антибиотикам различных групп. Большое значение имеет резистентность к β -лактамам антибиотикам, связанная с продукцией ферментов β -лактамаз [2]. Важную роль играют карбапенемазы — β -лактамазы, которые вызывают разрушение карбапенемов, делая штаммы неуязвимыми для имипенема, меропенема, дорипенема. Доказано, что от 4 до 85% штаммов *A. baumannii* продуцируют карбапенемазы [11, 13]. Особое значение в прогрессировании ацинетобактериальных инфекций связано с феноменом множественной антибиотикорезистентности, которая проявляется в потере чувствительности к антибиотикам разных классов [5]. В связи с этим, важно обеспечить не только диагностику ацинетобактериальной инфекции, но и оценить спектр чувствительности выделенного изолята к антибиотикам. Традиционная диагностика резистентности производится при помощи фенотипических методов, основанных на оценке задержки роста бактерий при культивировании в присутствии антибиотиков. Однако эти достаточно надежные способы не позволяют сделать выводы о молекулярных основах резистентности. Использование молекулярно-генетических методов исследования позволяет получить дополнительную информацию о механизмах формирования устойчивых штаммов, что бывает необходимым для оптимизации стратегии антибиотикотерапии и прогнозирования эволюции резистентности.

Цель настоящей работы — при помощи фенотипических методов охарактеризовать спектр антибиотикорезистентности штаммов *A. baumannii*, изолированных от пациентов хирургических и реанимационных отделений в городе Москва, и определить молекулярно-генетические механизмы устойчивости их карбапенем-резистентных форм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были штаммы *A. baumannii*, изолированные из патологических локусов у детей и взрослых пациентов из 8 реанимационных и хирургических отделений 3 лечебно-профилактических учреждений города Москва в 2012 — 2014 годах. Видовая идентификация штаммов проводилась при помощи рутинных методов, на MALDI-TOF масс-спектрометре Biotyper MicroFlex (Bruker) и на автоматическом анализаторе Vitek 2 Compact (BioMerieux). Фенотипическое исследование антибиотикорезистентности дублировалось двумя способами — на автоматическом анализаторе Vitek 2 Compact (BioMerieux) и диффузионным спо-

собом при помощи E-тестов (BioMerieux). Оценка результатов фенотипического тестирования проводилась при помощи программного обеспечения для Vitek 2 Compact и на основе критериев Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам (EUCAST) — для E-тестов. При помощи фенотипических способов была протестирована резистентность к карбапенемам (имипенем, меропенем), ципрофлоксацину, гентамицину, нетилмицину и колистину, которые входят в список антибиотиков с валидированными оценочными критериями EUCAST для тестирования ацинетобактерий (данные с сайта EUCAST, режим доступа: <http://www.eucast.org>). Минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотика для 50% исследованных штаммов приведены в табл. Фенотипическое выявление продукции металло-β-лактамаз (МБЛ) осуществляли по описанной ранее методике [6].

При оценке результатов использовали терминологию EUCAST, описывая штаммы как резистентные, чувствительные или штаммы с промежуточной чувствительностью. Под термином нечувствительные подразумевали объединенные в одну группу резистентные и промежуточные штаммы.

Все штаммы были протестированы молекулярно-генетическим методом для выявления генов карбапенемаз. Исследование было основано на использовании в одной реакции двух пар праймеров к внутренним участкам bla-генов. Метод был реализован при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РТ) на платформе амплификатора BioRad CFX1000 (BioRad). Протокол подготовки включал выделение бактериальной ДНК с помощью наборов «ГК-экспресс» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). В качестве целевых генов были выбраны VIM, IMP, OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-58 — гены, вносящие наиболее весомый вклад в формирование резистентности к карбапенемам [13, 17]. Кроме перечисленных генов был проведен поиск NDM — редкого для ацинетобактерий, но интересного с позиции эволюции резистентности гена [13, 17]. Гены определялись с помощью коммерческих наборов «АмплиСенс MDR MBL-FL», «АмплиСенс MDR Ab-OXA-FL», «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL», включающих соответствующие праймеры и реакционные растворы, согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (ЦНИИ эпидемиологии).

Каждый штамм был протестирован не менее трех раз. Статистическая обработка результатов проводилась при помощи стандартных приемов. Для сравнения результатов двух методов оценки чувствительности к антибиотикам (фенотипического и молекулярно-генетического) применяли стандартный статистический критерий, направленный на определение степени парной согласованности результатов — каппу Коэна. Значения каппы Коэна >0,75 считали подтверждением достаточной степени согласованности результатов [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе было исследовано 95 штаммов. Фенотипические характеристики их чувствительности к антибиотикам, отражены в табл. Фенотипическая оценка отношения штаммов *A. baumannii* к карбапенемам показала абсолютное соответствие между чувствительностью/резистентностью исследуемых изолятов к имипенему и меропенему. Нечувствительными к карбапенемам оказались 86,3% (82/95) штаммов, среди которых было 84,2% (80/95) резистентных штам-

Спектр антибиотикорезистентности исследованных штаммов *A. baumannii* (n=95)

Антибиотик	МПК (мкг/мл) для нечувств. шт.	Доля нечувств. шт., % (абс.)	МПК ₅₀ (мкг/мл)
Имипенем	2	86,3 (82)	>32
Меропенем	2	86,3 (82)	>32
Гентамицин	4	80,0 (76)	16
Нетилмицин	4	80,0 (78)	>32
Ципрофлоксацин	1	94,7 (90)	4
Колистин	2	2,1 (2)	0,3

мов и 2,1% (2/95) штаммов с промежуточной чувствительностью. Все штаммы, нечувствительные к имипенему, были нечувствительны к меропенему, и наоборот, МБЛ не были обнаружены ни у одного из исследованных штаммов.

К гентамицину были нечувствительны 80,0% (76/95) штаммов, к нетилмицину — 80,0% (76/95) штаммов, к ципрофлоксацину — 94,7% (90/95) штаммов. Два штамма (2,1%) были резистентны к колистину с МПК 3 мкг/мл, они составляли группу панрезистентных штаммов. Нечувствительными к представителям двух и более классов антибиотиков были 91,6% (87/95) штаммов. Нечувствительностью к представителям трех классов антибиотиков обладали 78,9% (75/95) штаммов, а 4,2% (4/95) изолятов были чувствительны ко всем классам антибиотиков.

Результаты, отражающие наличие у *A. baumannii* генов карбапенемаз, показали следующее: гены карбапенемаз были обнаружены у 85,3% (81/95) штаммов *A. baumannii*, причем все эти штаммы относились к категории нечувствительных к карбапенемам. Кроме того, у одного штамма, который фенотипически характеризовался как нечувствительный к карбапенемам (МПК имипенема — 4 мкг/мл, МПК меропенема — 6 мкг/мл), не было выявлено ни одного из исследованных генов, включая VIM, IMP, OXA-23/40/48/58 и NDM. У всех карбапенем-чувствительных изолятов гены карбапенемаз отсутствовали. Большинство карбапенем-нечувствительных штаммов (84,1%; 69/82) были носителями генов OXA-40, у 18,3% (15/82) карбапенем-нечувствительных штаммов определялся ген OXA-23. У 3 штаммов (3,7%) было выявлено присутствие одновременно двух генов карбапенемаз — OXA-40 и OXA-23. Степень согласованности результатов, полученных двумя методами определения чувствительности ацинетобактерий к карбапенемам (фенотипическая оценка и выявление генов карбапенемаз), была очень высокой — значение каппы Коэна составило 0,957 ($p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, вызывают тревогу: среди исследованных изолятов из инфекционно-воспалительных локусов лишь около 5% штаммов были чувствительны к антибиотикам из всех групп, тестирование с которыми рекомендуется EUCAST. Более 95% изолятов демонстрировали нечувствительность к представителям одного или более классов антибиотиков. Несмотря на то, что феномен множественной резистентности является весьма распространенным среди госпитальных ацинетобактерий, его выявление должно сопровождаться существенной корректировкой лечебно-профилактических мероприятий. Это обусловлено значительным (до 68%) возрастанием смертности при инфекциях, вызванных мультирезистентными штаммами ацинетобактерий [9, 14]. Наши результаты показали значительное нарастание резистентности по сравнению с данными межрегиональных исследований, проведенных в России в 2002 — 2004 годах, когда количество выявляемых в отделениях реанимации и интенсивной терапии карбапенем-резистентных ацинетобактерий составляло около 2%, устойчивых к ципрофлоксацину — 73,9% [3]. Более поздние исследования, проведенные Горбичем Ю.Р. и др. в Республике Беларусь в 2010 году [1], говорят о росте уровня карбапенем-резистентности: устойчивость к имипенему составляла 53,5%, к меропенему — 60,6%. В нашей работе изучаемые штаммы были изолированы только от реанимационных и хирургических больных, тогда как Горбич Ю.Р. и др. анализировали все нозокомиальные штаммы. Именно с этим может быть связан полученный нами более высокий уровень карбапенем-резистентности (около 85%).

В целом, рост числа карбапенем- и мультирезистентных штаммов *A. baumannii*, изолированных от пациентов московских госпиталей, соответствует мировым тенденциям [13].

В ходе исследования не было обнаружено ни одного штамма, продуцирующего МБЛ, что было подтверждено фенотипическими и молекулярно-генетическими методами. Отсутствие МБЛ-штаммов является позитивным признаком, потому что VIM-, IMP- и NDM-карбапенемазы обладают более высокой каталитической активностью, расширенным спектром субстратной специфичности, охватывающей практически все β -лактамы, и индифферентностью к ингибиторам β -лактамаз [7]. Все перечисленные свойства говорят о большей клинической и эпидемиологической опасности МБЛ-продуцирующих бактерий.

Полученные нами данные о контроле устойчивости к имипенему и меропенему лишь двумя генами (OXA-23 и OXA-40) не противоречат информации о распространенности генов, определяющих карбапенем-резистентность госпитальных штаммов *A. baumannii*. OXA-23- и OXA-40-подобные гены являются характерными для нозокомиальных изолятов ацинетобактерий во многих регионах мира, включая европейские страны [12].

В трех случаях нами установлены интересные факты наличия у одного штамма одновременно двух генов (bla_{OXA-23} и bla_{OXA-40}). Хотя такие случаи и являются редкими, они были описаны ранее. Исследования, проводившиеся в Мексике, выявили наличие у одного штамма одновременно генов OXA-58 и OXA-239 (OXA-23-подобный ген) [16].

Исследование подтвердило высокую степень соответствия между результатами фенотипического тестирования чувствительности к карбапенемам и ПЦР-определением генов карбапенемаз.

Был зарегистрирован лишь один случай расхождения между результатами молекулярно-генетического и фенотипического исследования, когда у штамма с промежуточной чувствительностью к имипенему и меропенему отсутствовали гены карбапенемаз. Такие случаи нечасты, но возможны. Они могут быть обусловлены двумя причинами. Первая связана с продукцией штаммом карбапенемазы, ген которой не тестировался в настоящем исследовании. Подобные карбапенемазы встречаются редко, но их перечень включает достаточное количество разновидностей [15]. Во-вторых, отсутствие гена при наличии фенотипической нечувствительности может объясняться нелактамазными механизмами, например, эффлюкс-активностью, которая может осуществляться у ацинетобактерий в отношении представителей любых классов антибиотиков [5]. Таким образом, полученные результаты позволяют обосновать перспективность внедрения технологий молекулярно-генетического тестирования антибиотикорезистентности. Конечно, идентификация генов не может рассматриваться как абсолютная альтернатива общепринятым способам. Однако применение этого метода имеет одно важное достоинство: метод существенно ускоряет процесс тестирования резистентности, что может быть крайне важно для выбора антибиотиков в неотложных клинических случаях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.607.21.0064, уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60714X0064).

ЛИТЕРАТУРА

1. Горбич Ю.Р., Карпов И.А., Мартинович А.А., Левшина Н.Н. Особенности резистентности *Acinetobacter baumannii* к карбапенемам в Республике Беларусь. Здравоохранение. 2011, 5: 25-30.
2. Дьячкова В.С., Бажукова Т.А. Механизмы резистентности микроорганизмов к β -лактамам антибиотикам. Журн. микробиол. 2014, 4: 101-109.
3. Решедько Г. К., Рябкова Е. Л., Кречикова О. И., Сухорукова М. В., Шевченко О. В., Эйдельштейн М. В., Козлов Р.С. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных

- возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России. *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2008, 10: 96-112.
4. Руднов В. А., Бельский Д.В., Дехнич А.В. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования. *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2011, 13: 4: 294-304.
 5. Чеботарь И.В., Лазарева А.В., Масалов Я.К., Михайлович В.М., Маянский Н.А. Acinetobacter: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства. *Вестн. РАМН.* 2014, 9-10: 39-50.
 6. Шевченко О. В., Эйдельштейн М. В., Степанова М. Н. Металло-β-лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий. *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2007, 1: 211-218.
 7. Cornaglia G., Giamarellou H., Rossolini G. M. Metallo-β-lactamases: a last frontier for β-lactams? *Lancet Infect. Dis.* 2011, 11 (5): 381-393.
 8. Custovic A., Smajlovic J., Hadzic S. et al. Epidemiological surveillance of bacterial nosocomial infections in the surgical intensive care unit. *Materia socio-medica.* 2014, 26 (1): 7-11.
 9. Falagas M.E., Koletsi P.K., Bliziotis I.A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. *J. Med. Microbiol.* 2006, 55 (12): 1619-1629.
 10. Fleiss J.L. Statistical methods for rates and proportions. John Wiley & Sons Inc., New York, 1981.
 11. Fritsche T.R., Sader H.S., Toleman M.A. et al. Emerging metallo-β-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41 (Suppl. 4): S276-S278.
 12. Higgins P.G., Dammhayn C., Hackel M., Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010, 65 (2): 233-238.
 13. Kempf M., Rolain J.M. Emergence of resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2012, 39 (2): 105-114.
 14. Maragakis L.L., Perl T.M. Acinetobacter baumannii: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 46 (8): 1254-1263.
 15. Perez F., Hujer A. M., Hujer K. M. et al. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrob. Agents Chemotherapy.* 2007, 51 (10) : 3471-3484
 16. Tamayo-Legorreta E.M., Garza-Ramos U., Barrios-Camacho H. et al. Identification of OXA-23 carbapenemases: novel variant OXA-239 in Acinetobacter baumannii ST758 clinical isolates in Mexico. *New Microbes New Infect.* 2014, 2 (6): 173-174.
 17. Zarrilli R., Pournaras S., Giannouli M., Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal lineages. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2013, 41 (1): 11-19.

Поступила 10.05.15

Контактная информация: Чеботарь Игорь Викторович, д.м.н.,
119991, Москва, Ломоносовский пр., 2, р.т. (495)967-14-20

*И.В.Фельдблюм¹, А.М.Николаева², К.А.Павроз¹, Т.В.Данилина²,
О.Ю.Соснина², Т.В.Вязникова², А.Е.Ершов², Д.М.Трофимов², А.В.Полушкина¹*

БЕЗОПАСНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОКЛЮША, ДИФТЕРИИ, СТОЛБНЯКА, ГЕПАТИТА В И Нib-ИНФЕКЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ БЕСКЛЕТОЧНЫЙ КОКЛЮШНЫЙ КОМПОНЕНТ, ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ВЗРОСЛЫХ

¹Пермский государственный медицинский университет; ²НПО «Микроген», Москва

Цель. Изучение безопасности, реактогенности и иммунологической эффективности отечественной комбинированной вакцины против дифтерии, коклюша (ацеллюлярный компонент), столбняка, гепатита В и Нib-инфекции при иммунизации добровольцев в возрасте от 18 до 60 лет. *Материалы и методы.* Исследование проводилось в соответствии с этическими нормами и требованиями, регламентированными Хельсинской декларацией и Надлежащей клинической практикой (ICHGCP). В простом нерандомизированном клиническом исследовании приняли участие 20 взрослых добровольцев, средний возраст которых составил 46,9 лет. *Результаты.* Зарегистрированные поствакцинальные реакции (как местные, так и системные) были слабой и средней степени выраженности, купировались самостоятельно на 2 — 3 сутки без применения медикаментозной терапии. Поствакцинальных осложнений отмечено не было. Показатели общего и биохимического анализов крови, мочи, содержание IgE в динамике иммунизации находились в пределах нормы. Однократное введение вакцины аАКДС-ГепВ+Нib лицам от 18 до 60 лет обусловило выработку антител ко всем компонентам препарата. Фактор сероконверсии колебался от 6,9 до 53,5. *Заключение.* Полученные результаты позволяют рекомендовать данную вакцину для оценки ее безопасности, реактогенности, иммунологической и профилактической эффективности в рандомизированных клинических исследованиях в наблюдениях на детях.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 46—51

Ключевые слова: комбинированная вакцина аАКДС-ГепВ+Нib, иммунизация, взрослые 18 — 60 лет, безопасность, иммуногенность

*I.V.Feldblyum¹, A.M.Nikolaeva², K.A.Pavroz¹, T.V.Danilina²,
O.Yu.Sosnina², T.V.Vyaznikova², A.E.Ershov², D.M.Trofimov², A.V.Polushkina¹*

SAFETY AND IMMUNOGENICITY OF A NATIONAL COMBINED VACCINE AGAINST PERTUSSIS, DIPHTHERIA, TETANUS, HEPATITIS B AND HIB-INFECTIOIN, CONTAINING ACELLULAR PERTUSSIS COMPONENT, DURING IMMUNIZATION OF ADULTS

¹Perm State Medical University; ²«Microgen», Moscow, Russia

Aim. Study safety, reactogenicity and immunologic effectiveness of a national combined vaccine against diphtheria, pertussis (acellular component), tetanus, hepatitis B and Hib-infection during immunization of volunteers aged 18 — 60 years. *Materials and methods.* The study was carried out in accordance with ethical standards and requirements, regulated by Helsinki declaration and Good clinical practice (ICHGCP). In a simple non-randomized clinical trial 20 adult volunteers took part, the mean age of those was 46.9 years. *Results.* Registered post-vaccination reactions (both local and systemic) were mild and of moderate degree of severity, stopped independently after 2 — 3 days without administration of drug treatment. Postvaccinal complications were not noted. Parameters of general and biochemical analysis of blood, urine, IgE content in dynamics of immunization were within normal limits. A single administration of aAPDT-HepB+Hib to individuals aged 18 — 60 years resulted in development of antibodies against all the components of the preparation. Seroconversion factor fluctuated from 6.9 to 53.5. *Conclusion.* The results obtained allow to recommend the vaccine for evaluation of its safety, reactogenicity,

immunologic and prophylaxis effectiveness in randomized clinical observation trials in children.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 46—51

Key words: combined vaccine aAPDT-HepB+Hib, immunization, adults aged 18 — 60 years, safety, immunogenicity

ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени коклюш остается серьезной проблемой не только для России, но и для всего мирового сообщества. Ежегодно в мире регистрируется около 50 млн случаев коклюша и около 300 тыс. летальных исходов. Коклюш занимает пятое место в структуре причин смертности у детей младше 5 лет среди инфекций, контролируемых средствами специфической профилактики [7, 10, 12]. В России ежегодно регистрируется более 4000 случаев коклюша. Следует заметить, что для коклюша, как и для многих других инфекций (гепатит В, ВИЧ-инфекция и др.), характерен феномен айсберга, когда данные официальной статистики не соответствуют истинному распространению инфекции [2, 5].

Вакцинация против коклюша впервые начала проводиться в США в 1940 г. цельноклеточной вакциной (ЦКВ), и к 1950 г. она применялась уже во многих странах мира. Однако в связи с высокой реактогенностью ЦКВ, возникла необходимость в проведении исследований, направленных на разработку бесклеточных коклюшных вакцин (БКВ) — менее реактогенных, обладающих высокой иммунологической и эпидемиологической активностью [11]. В настоящее время именно бесклеточные вакцины являются основными в календарях прививок большинства стран Европы и Америки [6, 8, 9].

В нашей стране в рамках Национального календаря прививок применяется ЦКВ в сочетании с дифтерийным и столбнячным анатоксинами в составе АКДС-вакцины. Однако до 10% детей первого года жизни имеют противопоказания к ее введению, и 5 — 15% не заканчивают полный курс прививок из-за развивающихся сильных общих поствакцинальных реакций и осложнений [3].

В рамках альтернативной иммунизации в России для вакцинации детей против коклюша используются зарубежные комбинированные вакцины, содержащие бесклеточный коклюшный компонент, характеризующиеся безопасностью и высокой иммунологической эффективностью [6].

В свете выше изложенного возникла необходимость разработки отечественной ацеллюлярной коклюшной вакцины для иммунизации детей, имеющих медицинские отводы, а также для бустерной вакцинации детей 6 — 7 лет и взрослого населения.

НПО «Микроген» (филиал предприятия «Пермское НПО «Биомед») разработана оригинальная технология получения пентавалентной комбинированной вакцины (аАКДС-ГепВ+Hib), содержащей бесклеточный коклюшный компонент.

Следует отметить, что в отличие от зарубежных вакцинных препаратов, зарегистрированных в России (Инфанрикс и Пентаксим), отечественная комбинированная вакцина содержит в своем составе в 2 раза меньше столбнячного и в 1,25 — 1,5 раза меньше дифтерийного антигенов, а также в 2 раза меньше HBsAg, в отличие от моновакцины гепатита В.

Вакцина успешно прошла доклинические испытания и была рекомендована для проведения клинических исследований по оценке ее безопасности и эффективности [1].

Целью настоящего исследования явилось изучение безопасности и иммуно-

генности новой отечественной вакцины против дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша и инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, аАКДС-ГепВ+Ніb при иммунизации взрослых в возрасте 18 — 60 лет (I фаза клинических исследований).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вакцина аАКДС-ГепВ+Ніb для профилактики вирусного гепатита В, дифтерии, коклюша, столбняка, и инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа b, является комплектом из 2 компонентов: аАКДС-ГепВ компонента (суспензия для внутримышечного введения) и Ніb-компонента (лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения).

аАКДС-ГепВ компонент вакцины представляет собой сорбированную на геле алюминия гидроксида обезвреженную антигенную фракцию *Bordetella pertussis*, очищенную без разделения отдельных компонентов (60 мкг в дозе), дифтерийный анатоксин (20 Lf в дозе), столбнячный анатоксин (5 Lf в дозе) и рекомбинантный дрожжевой поверхностный антиген вируса гепатита В (НВsAg) (5 мкг в дозе). Ніb-компонент представляет собой полирибозилрибитола фосфат, конъюгированный со столбнячным анатоксином (10 мкг в дозе).

Ректогенность, безопасность и иммуногенность вакцины были изучены в простом нерандомизированном клиническом исследовании, в котором приняли участие 20 добровольцев 18 — 60 лет. Средний возраст участвующих в исследовании составил 46,9 лет.

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

Критериями включения в исследование явились: здоровые добровольцы обоих полов, подписавшие информированное согласие на участие в исследовании, обязующиеся использовать полноценную контрацепцию в течение всего периода исследования, а также последующих 3 месяцев после завершения исследования с отсутствием в сыворотке крови протективного уровня антител к коклюшному компоненту ($\leq 1:80$) и дифтерийному анатоксину ($\leq 0,01$ МЕ/мл).

Осмотр перед вакцинацией включал оценку критериев включения и невключения в исследование в соответствии с протоколом, сбор анамнеза, термометрию, измерение АД, подсчет числа сердечных сокращений, ЭКГ, консультацию врача-невролога, а также лабораторное обследование. После клинико-лабораторного скрининга были отобраны взрослые, удовлетворяющие критериям включения в исследование, которые были привиты вакциной аАКДС-ГепВ+Ніb. Вакцина вводилась внутримышечно в дозе 0,5 мл в переднюю наружную область бедра с проверкой на попадание иглы в кровеносный сосуд.

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.). Активное наблюдение за привитыми в течение первых 24 часов после вакцинации проводили в условиях стационара для своевременного оказания медицинской помощи в случае возникновения нежелательных реакций. В последующие 6 дней привитые находились под наблюдением врача-терапевта в условиях поликлиники. На 7 день после вакцинации пациенты получали дневник самонаблюдения, в который с 8 по 30 день вносили данные об общем состоянии, температуре тела, наличии поствакцинальных реакций, осложнений и нежелательных явлений.

Безопасность вакцины оценивали по показателям общего анализа крови,

мочи, биохимического анализа крови и определения содержания сывороточных IgA, IgM, IgG и IgE в динамике перед вакцинацией и на 31 сутки после введения вакцины.

Иммуногенную активность оценивали по содержанию специфических антител в сыворотках крови людей до и на 31 день после иммунизации в отношении каждого антигена, входящего в состав вакцины, с помощью следующих зарегистрированных и разрешенных к применению в РФ тест-систем: «ИФА Анти-ДС» и «МикрАТ-НВs» (НПО «Микроген»), диагностикум коклюшный жидкий для реакции агглютинации (АООТ «Биомед» им. И.И. Мечникова), тест-система иммуноферментная для определения IgG к полирибозилрибитолфосфату *Haemophilus influenzae b* («IBL-International», Гамбург Германия).

Статистический анализ проведен с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Достоверность различий оценивали при помощи компьютерной программы Statistica (версия 6.0) с использованием теста *t*-распределения Стьюдента. Уровень статистической значимости (вероятность получения ошибки) в 95,0% расценивали как наличие статистической значимости между двумя явлениями. Для создания базы данных была применена программа MSExcel. При анализе полученных результатов определяли средние величины и стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При наблюдении за привитыми в поствакцинальном периоде в течение первых суток после иммунизации местные поствакцинальные реакции были отмечены у 13 добровольцев (65,0±10,7%). У двух добровольцев местные реакции возникли на 3 сутки после введения препарата. Наряду с местными поствакцинальными реакциями у добровольцев отмечались системные реакции слабой и средней степени выраженности.

Местные реакции проявлялись незначительной болезненностью при надавливании в месте инъекции. Системные поствакцинальные реакции были представлены гипертермией слабой степени выраженности с подъемом температуры до 37,8°C (10,0±6,7%) и миалгией передней мышцы бедра (35,0±10,7%) средней степени выраженности. Все реакции купировались самостоятельно в течение 3 дней без приема медикаментозных препаратов.

Оценка результатов общего анализа крови в группе привитых в динамике наблюдения не выявила статистически достоверных различий показателей.

При исследовании биохимического анализа крови также не обнаружено статистически достоверных отличий исходных данных от результатов, полученных на 31 сутки после вакцинации. Нарушений пигментного обмена по показателям билирубина не выявлено. Ферментативная активность печени (АЛТ и АСТ) оставалась без патологических изменений. Показатели

Таблица 1. Показатели биохимического анализа крови и содержание в сыворотке крови Ig класса А, М, G и E до и после иммунизации (ср. значения)

Показатели (норма)	До вакцинации	На 31 сутки
	M±m	M±m
Глюкоза, (3,3—6,4 ммоль/л)	4,4±0,2	4,6±0,1
АЛТ (≤41,0 Ед/л)	21,7±1,3	27,3±1,7
АСТ (≤35,0 Ед/л)	21,0±1,1	26,2±1,7
Билирубин общий (1,7—21,0 ммоль/л)	14,4±1,4	12,3±0,5
Билирубин прямой (≤3,4 ммоль/л)	2,8±0,8	3,2±0,9
Креатинин (44,0—100,0 мкмоль/л)	75,8±2,0	72,6±1,3
Щел. фосфатаза (≤258 ед/л)	159,9±8,3	139,1±8,7
Мочевина (2,5—8,3 ммоль/л)	4,4±0,2	5,0±0,2
Общий белок (66,0—88,0 г/л)	72,5±1,0	69,8±0,8
ЛДГ (170—480 ЕД/л)	250,0±7,5	298,0±8,6
СРБ (≤5,0 мг/л)	2,5±1,0	1,5±1,0
IgA (70—400,0 мг/дл)	182,3±4,2	231,0±5,2
IgM (40,0—230,0 мг/дл)	137,2±3,8	162,9±4,8
IgG (700—1600 мг/дл)	1250±6,5	1314±7,2
IgE (0,1—150,0 МЕ/л)	65,8±4,2	55,5±3,8

затели очищения крови (креатинин и мочевины) оставались в пределах нормы. Кроме того, наблюдалось отсутствие достоверных изменений уровня сывороточного IgE в течение всего периода наблюдения, что свидетельствует об отсутствии латентной сенсibilизации организма к препарату и высоком профиле безопасности вакцины (табл. 1).

В общем анализе мочи у привитых плотность и реакция мочи, а также число лейкоцитов, эритроцитов и плоского эпителия были в пределах нормы и не менялись в динамике наблюдения. В осадке мочи белок, цилиндры, соли и бактерии отсутствовали.

Поствакцинальных осложнений и нежелательных явлений выявлено не было.

Оценка иммуногенности новой пятивалентной вакцины показала, что аАКДС-ГепВ+НіВ вакцина вызывает выработку антител ко всем антигенам, входящим в ее состав (табл. 2).

Наиболее выраженный рост средней геометрической титра антител был выявлен на столбнячный и дифтерийный компоненты вакцины с кратностью нарастания титров антител в 53,5 и 30,0 раз соответственно. К гепатитному, коклюшному и НіВ-компонентам вакцины фактор сероконверсии составил 13,8; 6,9 и 7,6 раз соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка отечественных комбинированных вакцин, содержащих ацеллюлярный коклюшный компонент, в условиях сложившейся эпидемической ситуации и действующего Национального календаря профилактических прививок является одной из приоритетных задач вакцинологии. В соответствии с Федеральным законом Российской Федерации «Об обращении лекарственных средств» для внедрения медицинского иммунобиологического препарата в педиатрическую практику необходимо предварительное проведение клинического исследования на совершеннолетних добровольцах. Простое нерандомизированное исследование, проведенное на группе добровольцев 18 — 60 лет, выявило низкую реактогенность и высокий профиль безопасности отечественной комбинированной вакцины против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и гемофильной инфекции тип b, содержащей бесклеточный коклюшный компонент. Местные поствакцинальные реакции слабой степени выраженности были выявлены у 75,0% привитых в виде болезненности в месте введения препарата при надавливании. Системные поствакцинальные реакции слабой и средней степени выраженности отмечались у 35,0% иммунизированных. Все реакции купировались самостоятельно на 2 — 3 сутки без применения медикаментозных препаратов. Возникновение болезненности и миалгии при введении вакцины у значительного числа добровольцев явилось, на наш взгляд, результатом неудачного выбора места введения препарата для взрослых — переднюю наружную область бедра. Как известно, внутримышечное введение иммунобиологического препарата взрослым предполагает введение в дельтовидную мышцу. Кроме того, техника введения вакцины (согласно протоколу исследования) предусматривала проверку на попадание иглы в кровеносный сосуд, что, по мнению В.К. Таточенко, увеличивает риск развития местных поствакцинальных реакций [4]. Возникновение поствакцинальных реакций на введение вакцины могло быть обусловлено и вы-

Таблица 2. Иммуный ответ на компоненты вакцины аАКДС-ГепВ+ХИБ после однократной иммунизации

Компоненты вакцины	Уровень антител (ср. геом. титра)	
	Фон	После прививки
Дифтерийный, МЕ/мл	<0,1	3,0 [1,8—4,9]
Столбнячный, МЕ/мл	0,2 [0,2—0,3]	10,7 [7,4—15,6]
Гепатитный, мМЕ/мл	<10	23,4 [7,3—75,7]
Коклюшный (величина, обратная разведению)	12,2 [5,5—27,3]	84,4 [43,1—165,4]
ХИБ, мкг/мл	0,8 [0,4—1,5]	6,1 [4,8—7,8]

соким содержанием дифтерийного компонента в составе вакцины (20 Lf), предназначенной для педиатрической практики. При бустерной иммунизации взрослых доза дифтерийного анатоксина в препарате составляет 5 Lf.

Вакцина аАКДС-ГепВ+Ніb характеризовалась высокой иммунологической эффективностью. Однократное введение ее лицам от 18 до 60 лет обусловило выработку антител ко всем компонентам препарата. Фактор сероконверсии колебался от 6,9 до 53,5.

Полученные результаты позволяют рекомендовать данную вакцину для оценки ее безопасности, реактогенности, иммунологической и профилактической эффективности в рандомизированных клинических исследованиях в наблюдениях на детях.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Николаева А.М., Соснина О.Ю., Белякова О.В., Вязникова Т.В., Афанасьева Т.М., Языкова М.Н. Доклинические исследования новой комбинированной вакцины против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и гемофильной инфекции типа b, содержащей бесклеточный коклюшный компонент. Российский иммунологический журнал. 2014; 8 (17)3: 911-914.
2. Сперанская В.Н., Николаева А.М., Фельдблюм И.В., Казьянин А.В., Гореликова Е.В. Совершенствование лабораторной диагностики коклюшной инфекции. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2011; 3: 46-50.
3. Письмо Федеральной Службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека «О регистрации поствакцинальных осложнений в Российской Федерации в 2008 году». 01/14263-9-32 от 25 сентября 2009 г.
4. Таточенко В.К., Озерецковский Н.А., Федоров А.М. Иммунопрофилактика-2014. Справочник. М., 2014.
5. Фельдблюм И.В., Гореликова Е.В., Сперанская Н.В., Николаева А.М. Стандартное эпидемиологическое определение случая коклюша и его использование при расследовании вспышки коклюшной инфекции. Здоровье населения и среда обитания. 2011; 3: 24-28.
6. Харит С.М., Воронина О.Л., Лакоткина Е.А., Черняева Т.В. Специфическая профилактика коклюша: проблемы и перспективы. Вопросы современной педиатрии. 2007; 6 (2): 71-77.
7. Crowcroft N.S., Stein C., Duclos P. et al. How best to estimate the global burden of pertussis? Lancet Infect. Dis. 2003. 3: 413-418.
8. Forsyth K.D., Wirsing von Konig C.H. et al. Prevention of pertussis: recommendations derived from the second global pertussis initiative roundtable meeting. Vaccine. 2007, 25: 2634-2642.
9. Plotkin S. The global pertussis initiative: process overview. Pediatr. Infect. Dis. 2005, 24 (Suppl.5): S7-9.
10. Rolando Ulloa-Gutierrez, María L. Avila-Aguero. Pertussis in Latin America: current situation and future vaccination challenges. Expert Rev. Vaccines. 2007, 7 (10): 1569-1580.
11. Vaccines. S.A. Plotkin, W.A. Orenstein (ed.). Elsevier, 2004.
12. World Health Organization. Immunization, vaccines and biologicals: Pertussis. www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/index.html[accessed 07.04.11].

Поступила 15.06.15

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

Т.В.Припутневич¹, А.Р.Мелкумян¹, Л.А.Любасовская¹,
В.В.Муравьева¹, Е.Н.Ильина², Г.Т.Сухих¹

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ НАУЧНОГО ЦЕНТРА АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ

¹Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии, ²НИИ физико-химической медицины, Москва

Цель. Сравнительная оценка видовой идентификации микроорганизмов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и с помощью автоматического биохимического анализатора VITEK2 Compact30. *Материал и методы.* Проведена видовая идентификация 18 400 изолятов микроорганизмов (стафилококки, стрептококки, энтерококки, энтеробактерии, неферментирующие грамотрицательные бактерии, лактобациллы, анаэробы, дрожжевые грибы, нейссерии), выделенных из влагалища беременных и небеременных женщин и от новорожденных детей. Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили с помощью автоматического бактериологического анализатора VITEK2 Compact30 (BioMerieux, Франция) и методом MALDI-TOF-MS анализа на масс-спектрометре AutoflexIII (Bruker Daltonics, Германия). *Результаты.* Выполнена сравнительная оценка идентификации 2005 изолятов микроорганизмов. В качестве референс-метода использовано секвенирование рибосомальной РНК. Достоверность видовой идентификации методом MALDI-TOF-MS анализа составила для стафилококков (95,8%), энтерококков (97,5%), энтеробактерий (98,4%), неферментирующих грамотрицательных бактерий (93,6%), β-гемолитических стрептококков (93,8%), лактобацилл (92,8%), дрожжевых грибов (99,9%). *Заключение.* Внедрение технологии MALDI-TOF-MS анализа в практическую работу микробиологических лабораторий превосходит ранее использованные способы микробиологического тестирования с точки зрения скорости, стоимости и достоверности идентификации широкого спектра микроорганизмов.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 52—58

Ключевые слова: масс-спектрометрия, MALDI-TOF-MS, VITEK2 Compact30, видовая идентификация, стафилококки, стрептококки, энтерококки, энтеробактерии, неферментирующие грамотрицательные бактерии, лактобациллы, анаэробы, дрожжевые грибы, нейссерии

Т.В.Припутневич¹, А.Р.Мелкумян¹, Л.А.Любасовская¹,
В.В.Муравьева¹, Е.Н.Ильина², Г.Т.Сухих¹

MASS-SPECTROMETRY IN MICROBIOLOGICAL PRACTICE OF SCIENTIFIC CENTRE OF OBSTETRICS, GYNECOLOGY AND PERINATOLOGY

¹Scientific Centre of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, ²Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

Aim. Comparative evaluation of species identification of microorganisms by MALDI-TOF mass-spectrometry and automatic biochemical analyzer VITEK2 Compact30. *Materials and methods.* Species identification of 18 400 isolates of microorganisms (staphylococci, streptococci, enterococci, enterobacteria, nonfermenting gram-negative bacteria, lactobacilli, anaerobes, yeast fungi, neisseriae), isolated from vagina of pregnant and non-pregnant women and from newborns, was carried out. Identification of the isolated microorganisms was carried out by automatic bacteriologic analyzer VITEK2 Compact30 (BioMerieux, France) and MALDI-TOF-MS analysis method on AutoflexIII (Bruker Daltonics, Germany) mass-spectrometer. *Results.* Comparative identification of 2005 isolates of microorganisms was carried out. Sequencing of ribosomal RNA was used as a reference method. Authenticity of species identification by MALDI-TOF-MS analysis method was: for staphylococci (95.8%), enterococci (97.5%), enterobacteria (98.4%), nonfermenting gram-negative bacteria (93.6%), β-hemolytic staphylococci (93.8%), lactobacilli

(92.8%), yeast fungi (99.9%). *Conclusion.* Introduction of MALDI-TOF-MS analysis technology into practical work of microbiological laboratories exceeds previously used methods of microbiological testing in terms of speed, cost and authenticity of identification of a wide spectrum of microorganisms.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 52—58

Key words: mass-spectrometry, MALDI-TOF-MS, VITEK2 Compact30, species identification, staphylococci, streptococci, enterococci, enterobacteria, nonfermenting gram-negative bacteria, lactobacilli, anaerobes, yeast fungi, neisseria

ВВЕДЕНИЕ

Научно-технический прогресс последних десятилетий, приведший к методологическому и техническому развитию различных областей медицины и практической реализации новых технологий, в том числе и в практике акушерства, гинекологии и перинатологии, обуславливает необходимость модернизации и усовершенствования диагностического поиска. Удовлетворение возросших требований клиницистов к качеству и срокам выполнения микробиологических исследований реализуется путем внедрения измерительных приборов и тест-систем нового поколения с использованием методов молекулярного анализа и принципов быстрой бактериологии, способных в максимально короткие сроки решать широкий круг диагностических задач.

Для решения этих вопросов инструментом в руках микробиологов становятся методы масс-спектрометрии, в частности, времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF-MS), ставшая абсолютной альтернативой классической биохимической и молекулярно-генетической диагностике [3, 5 — 7]. В настоящее время масс-спектрометрическая детекция позволяет проводить точную идентификацию более 4000 видов микроорганизмов, сокращать сроки идентификации на 24 — 72 часа.

С использованием методики масс-спектрометрии впервые появилась возможность видовой идентификации микроорганизмов (лактобациллы, облигатные анаэробы, гемофилы, нейссерии, коринебактерии, актиномицеты и др.), ранее требовавшая дорогих и длительных процедур [4, 8].

В акушерско-гинекологических и неонатальных отделениях НЦАГиП им. В.И. Кулакова уже более 20 лет ведется мониторинг за изменениями микрофлоры различных локусов пациенток и микробной колонизацией новорожденных. За последние годы внедрение методов масс-спектрометрической детекции в практику работы микробиологической службы Центра позволило в максимально короткие сроки определять возбудителей инфекционной патологии, прогнозировать развитие резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам и проводить раннюю коррекцию антибиотикотерапии [1].

Целью данного исследования явилась сравнительная оценка идентификации микроорганизмов из выделенной культуры методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и с помощью автоматического биохимического анализатора VITEK2 Compact30.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведена видовая идентификация 18 400 изолятов различных микроорганизмов: стафилококки, стрептококки, энтерококки, энтеробактерии, неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОб), лактобациллы, анаэробы, дрожжевые грибы, нейссерии, выделенных из влагалища беременных и небеременных женщин и различных локусов (зев, кал, конъюнктивы, раны, кровь и т.д.) новорожденных детей.

Посевы биологического материала (кал, мазки из зева, отделяемое конъюнктивы, уретры, цервикального канала, ран и др.) проводили на 5% кровяной агар, Шадлер агар, шоколадный агар, кандиселект агар (BioRad, Франция), маннит-солевой агар, среду Эндо (Conda, Испания), агар Сабуро, энтерококкагар (ГНЦ ПМБ, Оболенск). Количественный посев мочи производили на 5% кровяной агар и среду Сабуро с последующим учетом результатов по международной методике количественного бактериологического исследования мочи Clinical Microbiology Procedures (Ed. by H.D. Isenberg, 1992): 1.17.6 — 1.17.7. Культивирование осуществляли по стандартной методике. Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили с использованием коммерческих тест-систем по биохимическим показателям с помощью автоматического бактериологического анализатора VITEK2 Compact30 (BioMerieux, Франция) и методом MALDI-TOF-MS анализа на масс-спектрометре AutoflexIII (Bruker Daltonics, Германия).

Для видовой идентификации выделенных микроорганизмов методом MALDI-TOF-MS анализа использовали изолированные колонии, полученные при первичном росте на плотных питательных средах. В большинстве измерений бактериальные культуры не подвергали предварительной пробоподготовке (экстракции) и использовали метод прямого нанесения материала на мишень тонким мазком [2]. Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного масс-спектрометра AutoflexIII, оснащенного азотным лазером 337 нм.

Программное обеспечение аппарата позволяет проводить идентификацию микроорганизмов и расчет коэффициента достоверности (score) в автоматическом режиме и для каждого результата приводится ссылка на NCBI (National Center for Biotechnology Information). При этом достоверными считаются результаты, при score > 1,7. Уровень достоверности идентификации с полученным значением score 2,0 и выше свидетельствовал о точной видовой идентификации, score от 1,7 до 2,0 — об идентификации до рода, отрицательными считали результаты со score ниже 1,7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведена сравнительная оценка видовой идентификации 2005 изолятов условно патогенных микроорганизмов (УПМ), выполненной с помощью бактериологического анализатора VITEK2 Compact30 и методом MALDI-TOF-MS анализа на масс-спектрометре AutoflexIII. Все случаи несовпадений проверяли дополнительными диагностическими тестами классической микробиологии и/или секвенированием генов 16S (или 18S) рРНК.

При идентификации 117 изолятов стафилококков в 115 случаях (98,3%) отмечено совпадение идентификации обоими методами. В отношении видов *Staphylococcus aureus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* и *S. cohnii* получено полное совпадение результатов. Изоляты *S. pasteurii*, идентифицированные методом MALDI-TOF-MS анализа с высоким score, на VITEK2 Compact30 были ложно определены как *S. warneri* (с пометкой, что при наличии желтого пигмента штамм может быть отнесен к виду *S. pasteurii*) и вид *S. vitulinus* с вероятностью 97%. Секвенированием генов 16S рРНК подтверждена видовая принадлежность штаммов *S. pasteurii* и *S. warneri*. Подтверждена видовая принадлежность идентифицированных методом MALDI-TOF-MS анализа 76 штаммов различных видов коагулазонегативных стафилококков (CoNS) из них: 41 — *S. haemolyticus*; 28 — *S. epidermidis*; 4 — *S. hominis*, 3 — *S. warneri*, 1 — *S. lugdunensis*, 1 — *S. pasteurii*, 2 — *S. cohnii*.

При сопоставлении результатов идентификации 96 изолятов стрептококков получено совпадение результатов идентификации β-гемолитических стрептококков в 93,2% случаев, при этом полное совпадение отмечено при тестировании *Streptococcus agalactiae* и *S. pyogenes*. Виды *S. equinus* и *S. salivarius* расценены

VITEK2 Compact30 как различные виды микрококков. Наибольшие разночтения обнаружены при идентификации методом MALDI-TOF-MS анализа 37 изолятов *S. pneumoniae*, 15 из которых бактериологический анализатор с высокой степенью вероятности (более 80%) идентифицировал как *S. mitis/oralis*. При идентификации других видов α -гемолитических стрептококков (*sanguinis*, *parasanguinis*, *infantarius*) наблюдалось несоответствие биохимической и масс-спектрометрической идентификации.

Для определения достоверности идентификации стрептококков методом MALDI-TOF-MS анализа параллельно проводили реакцию латекс-агглютинации с сыворотками Pneumo-Kit (BioMerieux, Франция), Strepto-B, Strepto-A (тест-система Pastorex-Strepto (BioRad, Франция)) и тест с оптохином. Дополнительно учитывали морфологические свойства выросших колоний и микроскопическую картину.

При изучении 502 изолятов, идентифицированных методом MALDI-TOF-MS как *S. pneumoniae* и постановке тест-агглютинации, положительная реакция отмечена только у 6,0%. Зона задержки роста более 6 мм у диска с оптохином обнаружена у 4,5% изолятов, у которых морфологические свойства соответствовали виду *S. pneumoniae*. Остальные 95,5% α -гемолитических стрептококков в бульоне образовывали длинные цепочки, по морфологическим свойствам колонии походили на представителей видов *S. mitis/oralis*. Учитывая вышеизложенные данные 479 (95,4%) α -гемолитических стрептококков были отнесены к виду *S. mitis/oralis*.

В результате параллельного тестирования 155 изолятов энтерококков в 99,0% случаев получено полное совпадение идентификаций. В одном случае с помощью VITEK2 Compact30 *E. casseliflavus* идентифицирован с равной вероятностью 50,0% как *E. casseliflavus* и *E. gallinarum*. В результате секвенирования генов 16S рНК подтверждена правильность идентификации методом MALDI-TOF-MS анализа.

При оценке идентификации 145 изолятов наиболее часто встречающихся и клинически значимых энтеробактерий отмечено совпадение (97,9%) результатов обоих методов. Однако в базе данных VITEK2 Compact30 отсутствуют некоторые виды энтеробактерий. Так, отсутствующий вид *E. kobei* определялся как *Brevundimonas* spp. или *E. asburiae* (*ludwigii*), а *E. vulneris* как *Pantoea* spp. Результаты секвенирования генов 16S рНК десяти штаммов энтеробактерий: *K. pneumoniae* (n=5), *C. braakii* (n=1), *E. aerogenes* (n=1), *S. marcescens* (n=1) и *E. vulneris* (n=1) совпали с данными MALDI-TOF-MS идентификации. Для двух штаммов *E. kobei* (у MALDI-TOF-MS вероятность 99%) по результатам секвенирования получено *E. kobei/cloacae/ludwigii*, что говорит о близкородственном как генетическом, так и белковом профиле и невозможности на сегодняшнем этапе четкого разделения этих видов.

При тестировании 140 изолятов НГОБ с помощью обоих приборов получен низкий процент совпадений идентификаций — 53,6%. Расхождения в результатах касались нескольких видов (*Acinetobacter genomospecies*, *A. ursingii*, *Pseudomonas hibiscicola*, *Stenotrophomonas maltophilia*) и были обусловлены скудной базой данных VITEK2 Compact30, двойкой видовой идентификацией и/или низким score для некоторых видов НГОБ методом MALDI-TOF-MS. Секвенирование генов 16S рНК 15 штаммов НГОБ, определенных методом MALDI-TOF-MS как *S. maltophilia*/*P. hibiscicola*, получена *S. maltophilia*, также подтверждена идентификация MALDI-TOF-MS для *A. radioresistens* и *A. genomospecies*.

Неожиданными оказались результаты параллельной идентификации на двух приборах 30 изолятов лактобацилл. При идентификации штаммов лактобацилл на VITEK2 Compact30 во всех случаях получены ложные результаты: в 30,0% случаев идентификация была недостоверной, в 70,0% — получены ложные результаты идентификации, из которых в 60,0% лактобациллы с высокой вероятностью (96 — 98%) отнесены к роду *Clostridium* spp. По 1 изоляту (3,3%) лактобацилл с

высокой вероятностью (85 — 95%) отнесены к *Bifidobacterium* spp., *Actinomyces* *paeslundii* и *Corynebacterium* *jeikeium*. В исследовании показано, что несмотря на наличие лактобацилл в перечне микроорганизмов в базе данных VITEK2 Compact30, этот прибор не рекомендуется нами для идентификации лактобацилл, так как не способен корректно определить родовую принадлежность и ложно определяет лактобациллы как актиномицеты, коринебактерии и даже клостридии.

За период исследования методом MALDI-TOF-MS анализа проведена видовая идентификация 301 изолята 21 вида коринебактерий, выделенных из отделяемого влагалища женщин репродуктивного возраста. Основными видами были: *Corynebacterium* *amycolatum* — 36,0%, *C. aurimucosum* — 23,3% и *C. coyleae* — 13,3%.

Учитывая отсутствие разнообразия видов в базе данных VITEK2 Compact30, параллельные исследования нами не проводились.

Из отделяемого влагалища женщин репродуктивного возраста в облигатно-анаэробных условиях выделено и идентифицировано методом MALDI-TOF-MS анализа 166 изолятов строгих анаэробных бактерий 27 различных видов. По частоте встречаемости (%) это были: *Anaerococcus* spp. (10,9), *Bifidobacterium* *longum* (10,3), *Alloscardovia* *omnicolens* (9,1), *Propionibacterium* *acnes* (6,6), *Veillonella* *parvula* (5,4), *Weissella* *viridescens* (5,4), *Atopobium* *vaginae* (5,4), *Fingoldia* *magna* (4,2), *Peptoniphilus* *harei* (4,2), *Prevotella* *bivia* (29,5), другие (10,9).

В микроаэрофильных условиях от пациенток с бактериальным вагинозом выделено и идентифицировано 111 изолятов *Gardnerella* *vaginalis*. В нашем исследовании методом MALDI-TOF-MS анализа впервые идентифицированы не определяемые ранее традиционными бактериологическими методами многие виды строгих анаэробных бактерий и получено их широкое видовое разнообразие, что подчеркивает ценность данного метода при идентификации этой группы микроорганизмов.

Методом MALDI-TOF-MS анализа проведена идентификация 115 изолятов трудноидентифицируемых аэробных и факультативно-анаэробных грамотрицательных палочек 21 вида, 178 грамположительных кокков 20 видов, относящихся в основном к роду *Rothia* (46,6%) и *Micrococcus* (21,0%), и 156 изолятов грамположительных палочек 26 видов, среди которых *Bacillus* (79,4%), *Arthrobacter* (6,4%), *Actinomyces* (3,8%). Видовая идентификация этих микроорганизмов другими методами затруднена из-за отсутствия широкой видовой базы данных в существующих классических тест-системах и полу- и автоматических бактериологических анализаторах.

В работе изучено 2569 изолятов дрожжевых грибов, выделенных от беременных и небеременных женщин и новорожденных детей. Всего определен 21 вид.

Лидирующее место среди грибов, выделенных из вагинального отделяемого, занимает вид *Candida* *albicans* — 1762 штамма (76,5%), доля *C. non-albicans* видов (542 штамма) составила 23,5%. Наиболее часто среди *C. non-albicans* видов встречались *C. glabrata* (42,4%), *C. parapsilosis* (13,7%), *Saccharomyces* *cerevisiae* (11,8%), *C. krusei* (10,9%), *C. kefyr* (7,2%). Доля видов *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. lambica*, *C. norvegensis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. nivariensis*, *C. utilis*, *Trichosporon* *asahii*, *C. pelliculosa*, *C. famata*, *Rhodotorula* *rubra*, *Pichia* *fabianii* составила от 0,2 до 3,7%.

Выделенные от новорожденных дрожжевые грибы (n=265) отнесены к трем родам — *Candida* (99,2%), *Saccharomyces* (0,4%) и *Malassezia* (0,4%). *C. albicans* составила 36,2%. Среди грибов *C. non-albicans* видов были *C. famata* (39,8%), *C. glabrata* (15,1%) и *C. parapsilosis* (8%). Определение видовой принадлежности 1294 дрожжевых изолятов (1009 — *C. albicans* и 285 — *C. non-albicans*), идентифицированных методом MALDI-TOF-MS анализа, проведено параллельно на VITEK2 Compact30.

Полное совпадение результатов отмечено у 1287 штаммов (99,4%), у всех штаммов *S. albicans* (100%) и у 278 (97,5%) *S. non-albicans*.

Сравнение результатов идентификации 285 штаммов *S. non-albicans* видов показывает идентичные результаты в 278 случаях (97,5%). Исключение составили 7 штаммов 4 видов: *S. nivariensis*, *S. lambica*, *S. famata* и *P. fabianii*.

По данным биохимического типирования видовая принадлежность грибов установлена в 98,6% случаев (281 штамм). Два штамма *S. nivariensis* не идентифицированы с помощью VITEK2 Compact30 из-за отсутствия этого вида в базе данных. Ложно идентифицированы виды *S. lambica* и *P. fabianii*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Метод прямого MALDI-TOF-MS анализа микроорганизмов в клинической микробиологии является на сегодня самым перспективным направлением. В ходе настоящей работы возможности и ограничения метода MALDI-TOF-MS изучены на 18400 изолятах различных бактерий и дрожжевых грибов, из которых на 2005 изолятах проведена сравнительная оценка идентификаций методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и с помощью автоматического биохимического анализатора VITEK2 Compact30.

В результате исследования нами сделаны следующие заключения.

Идентификация микроорганизмов рода *Staphylococcus* методом MALDI-TOF-MS анализа в 95,8% случаев получена с высокой степенью достоверности (score $\geq 2,0$) и в 99,0% случаев совпадает с результатами идентификации биохимическими способами.

Методом MALDI-TOF-MS анализа получена неоднозначная идентификация микроорганизмов рода *Streptococcus*, при которой α -гемолитические стрептококки в 90,0% случаев определяются как *S. pneumoniae*. Для подтверждения их видовой принадлежности необходимо использовать дополнительные биохимические и иммунологические тесты. Результаты тестирования методом MALDI-TOF-MS анализа β -гемолитических видов совпадают с биохимической и иммунологической идентификацией на 99,0%.

Определение энтерококков методом MALDI-TOF-MS показало высокую достоверность результатов (в 97,5% случаев score $\geq 2,0$) и высокую степень совпадений (99,0%) идентификации.

Методом MALDI-TOF-MS энтеробактерии в 98,4% случаев типированы с высокими значениями score (2,0 и выше), и в 99,0% случаев идентификация совпадает с результатами биохимического тестирования.

Большинство штаммов НГОБ идентифицируются методом MALDI-TOF-MS с высоким значением score (93,6%). В 53,6% случаев результаты масс-спектрометрической идентификации совпадали с биохимическим тестированием. Невысокий процент совпадений обусловлен отсутствием в базе данных VITEK2 Compact30 некоторых видов, а также близкородственностью как генетического, так и белкового профилей данной группы микроорганизмов.

Ввиду отсутствия возможности или некорректной идентификации на VITEK2 Compact30 лактобацилл, коринебактерий, актиномицетов, строгих анаэробных и редко встречающихся аэробных и факультативно-анаэробных бактерий метод MALDI-TOF-MS анализ может успешно использоваться для их видовой идентификации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубков В.В., Любасовская Л.А., Рюмина И.И., Припутневич Т.В., Анкирская А.С., Тютюнник В.Л. Микробиологический мониторинг в системе инфекционного контроля неонатальных стационаров. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2014, 1: 51-56.

- Ильина Е.Н., Говорун В.М. Масс-спектрометрия нуклеиновых кислот в молекулярной медицине. Биоорганическая химия. 2009, 35 (2): 149-164.
- Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. М., Техносфера, 2012.
- Мелкумян А.Р., Припутневич Т.В., Анкирская А.С., Трофимов Д.Ю., Муравьева В.В., Муллабаева С.М., Завьялова М.Г. Видовой состав лактобактерий при различном состоянии микробиоты влагалища у беременных. Клиническая микробиология и анти-микробная химиотерапия. 2013, 15 (1): 72 —79.
- Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Donna M. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 2013, 26 (3): 547.
- Fournier P. E., Drancourt M., Colson P. et al. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. Nature Rev. Microbiology. 2013, 11: 574-585.
- Seng P., Drancourt M., Gouriet F. et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. Clin. Infect. Dis. 2009, 49: 543-551.
- Theel E.S., Schmitt B.H., Hall L. et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and Corynebacterium species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 2012, 50: 3093-3095.

Поступила 10.06.15

Контактная информация: Припутневич Татьяна Валерьевна, д.м.н.,
117997, Москва, ул.Академика Опарина, 4, р.т. (495)531-44-44

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

© Т.А.ТРИФОНОВА, А.А.МАРЦЕВ, 2016

Т.А. Трифонова, А.А. Марцев

ОЦЕНКА И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ ПО ИКСОДОВОМУ КЛЕЩЕВОМУ БОРРЕЛИОЗУ ВО ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Владимирский государственный университет

Цель. Оценка и прогнозирование эпидемиологического процесса по иксодовому клещевому боррелиозу (ИКБ) во Владимирской области. *Материалы и методы.* Отчетная форма № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях». Территориальная дифференциация заболеваемости проводилась в программе ArcView 3.1. Были использованы следующие климатические показатели: среднемесячная температура воздуха, количество дней в месяце с осадками, влажность воздуха, атмосферное давление, величина снежного покрова и содержание кислорода в воздухе в каждом месяце за период 2004 — 2012 гг. Статистическую обработку данных, корреляционно-регрессионный анализ проводили в программе Statistica. *Результаты.* За период с 2005 по 2012 гг. во Владимирской области было зарегистрировано 1211 случаев заболеваемости ИКБ, которая выросла на 46%. Отмечается территориальная дифференциация заболевания. Было установлено, что наиболее значимыми показателями, оказывающими влияние на эпидемиологический процесс, являются среднемесячная температура июля и сентября предыдущего года. Была построена математическая модель, которую можно использовать для прогнозирования эпидемиологической обстановки по ИКБ. *Заключение.* Математическая модель показывает, что повышенных значений заболеваемости можно ожидать, если июль предыдущего года был довольно жарким, а сентябрь, наоборот, отличался пониженными значениями температуры воздуха.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 58—62

Ключевые слова: Владимирская область, болезнь Лайма, прогнозирование

T.A. Trifonova, A.A. Martsev

EVALUATION AND PROGNOSIS OF EPIDEMIOLOGIC SITUATION FOR LYME BORRELIOSIS IN VLADIMIR REGION

Vladimir State University, Russia

Aim. Evaluation and prognosis of epidemiologic process for Lyme borreliosis (Lb) in Vladimir region. *Materials and methods.* Report form No. 2 «Data on infectious and parasitic diseases». Territorial differentiation of morbidity was carried out in ArcView 3.1 program. The following climate parameters were used: average monthly air temperature, number of days of the month with precipitation, air humidity, atmospheric pressure, size of snow cover and content of oxygen in air in every month for the period of 2004 — 2012. Statistical treatment, correlation-regression analysis was carried out in Statistica program. *Results.* 1211 cases of Lb morbidity were registered for the period of 2005 — 2012 in Vladimir region, that had increased by 46%. A territorial differentiation of the disease is noted. Average monthly temperature of July and September of the preceding year were established to be the most significant parameters, that affect the epidemiologic process. A mathematical model, that can be used for prognosis of epidemiologic situation for Lb, was constructed. *Conclusion.* The mathematical model shows, that increased values of morbidity can be expected, if July of the preceding year was fairly warm, and September, on the contrary, differed by reduced values of air temperature.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 58—62

Key words: Vladimir region, Lyme borreliosis, prognosis

В настоящее время все большую актуальность приобретает изучение закономерностей циркуляции в природе возбудителей природно-очаговых инфекций. Это обусловлено, в первую очередь, антропогенным преобразованием территорий, миграционными процессами, с переселением в различные зоны природных очагов людей без соответствующего иммунитета. Возрастает риск заражения населения в связи с садоводством, огородничеством и активным отдыхом на природе [3].

Актуальной задачей современной эпидемиологии является выявление факторов, влияющих на уровень заболеваемости, анализ территориального распределения, районирование по степени эпидемиологической опасности, выявление групп риска [7].

Ряд авторов указывает на зависимость процесса заболеваемости зооантропонозами от различных факторов среды (экологических, социально-экономических и климатических) [1, 2, 4, 7]. На численность клещей существенное влияние оказывают экологические и географические характеристики региона, на зараженность — климатические [5]. Этот же автор указывает, что у зараженных боррелиями клещей активность нападения на хозяев ниже, чем у незараженных. Зараженность клещей, снятых с растительности, достоверно выше, чем у снятых с людей [5]. В некоторых работах отмечается, что на заболеваемость природно-очаговыми инфекциями влияют такие климатические показатели, как количество осадков, влажность воздуха и среднемесячная температура в разные месяцы, предшествующие эпидемиологическому сезону. На основе полученных статистически значимых данных предпринимаются попытки построения прогностических моделей [2, 4].

Отсутствие необходимого финансирования, недостаток специалистов энтомологов и зоологов, а порой и полное их отсутствие в региональных отделениях Роспотребнадзора, недостаточное количество или полное отсутствие тест-систем

на определение наличия возбудителей природно-очаговых инфекций у переносчика — все это очень сильно осложняет или вовсе не позволяет проводить объективные исследования. В виду выше перечисленных проблем, в настоящее время, пожалуй, единственным показателем, объективно отражающим эпидемиологическую обстановку, является уровень заболеваемости.

Природные условия Владимирской области определяют возможность циркуляции возбудителей ряда природно-очаговых инфекций, что подтверждает собранная статистическая информация. Во Владимирской области мониторинг заболеваемости иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ) проводится с 2005 года. За период с 2005 по 2012 гг. здесь было зарегистрировано 1211 случаев заболеваемости ИКБ, которая выросла на 46%.

Самая высокая заболеваемость отмечается в Ковровском, Кольчугинском и Петушинском районах. Наблюдается неравномерное пространственное распределение заболевания: так, например, в Меленковском районе за весь период наблюдений зафиксирован всего один случай заражения данной инфекцией. При этом можно отметить, что наиболее напряженная ситуация складывается в северной части области, хотя бóльшим размером лесных ландшафтов отличаются южные районы.

На первом этапе настоящего исследования было проанализировано возможное влияние землеустройства на заболеваемость населения ИКБ. Т.е. был проведен пространственный корреляционный анализ по районам области между заболеваемостью населения ИКБ и следующими показателями: размер лесных ландшафтов и заболоченность территории. Было установлено, что во Владимирской области статистически достоверной корреляционной зависимости между вышеперечисленными показателями не выявлено ($r=-0,19$ $p=0,47$; $r=-0,26$ $p=0,33$ соответственно).

Этот факт, на наш взгляд, заслуживает внимания. Известно, что еще несколько десятилетий тому назад инфекции, связанные с клещами, в основном поражали жителей таежных, лесных ландшафтов; они были не сильно распространены, например, у горожан центрально-нечерноземных областей. Вероятно, поэтому и не было острой необходимости в организации здесь специального медицинского мониторинга. В настоящее время ситуация значительно изменилась: заболеваемость территориально «расплывается» независимо от ландшафтных особенностей. Это можно объяснить тем, что раньше и земельные угодья, и селитебные объекты имели достаточно четкую обособленность. В последние же 20 — 30 лет в нашей стране произошло заметное изменение в образе жизни населения (его экологической нише), увеличилась его мобильность, появилось много загородного жилья, коттеджей, дачных участков, зон загородного отдыха, транспортных путей и др. Структура сельских поселений также трансформировалась за счет внедрения городских жителей. Часто осваиваются и лесные массивы (особенно их окраинные части), и луга, и бывшие пашни. Зброшенные пахотные угодья интенсивно зарастают, создавая новые удобные ниши для жизнедеятельности иксодовых клещей и их прокормителей. Таким образом, границы ранее более-менее обособленных (природно-структурированных) экосистем разрушаются, что приводит к их негативной трансформации. По-видимому, можно утверждать, что в процессе распространения инфекции не столь виновно изменение климата (достаточно распространенная в последнее время версия, кстати, очень удобная, поскольку никто не виноват), сколько антропогенная деятельность, нарушающая экологическое равновесие в природе.

Далее в нашей работе было проанализировано возможное влияние на заболеваемость населения Владимирской области иксодовым клещевым боррелиозом комплекса климатических показателей.

В результате проведения корреляционного анализа из всего массива показателей статистически достоверная зависимость была установлена между уровнем заболеваемости населения ИКБ и следующими климатическими показателями: среднемесячная температура августа ($r=-0,75$ $p<0,05$), среднемесячная температура июля предыдущего года ($r=0,77$ $p<0,05$), среднемесячная температура сентября предыдущего года ($r=-0,91$ $p<0,05$), влажность воздуха в январе предыдущего года ($r=0,71$ $p<0,05$), высота снежного покрова в марте ($r=0,94$ $p<0,05$) и содержание кислорода в воздухе в июле предыдущего года ($r=-0,94$ $p<0,05$).

Для дальнейшего моделирования из расчетов был исключен показатель среднемесячной температуры августа как заведомо неинформативный, поскольку эпидемиологический процесс по ИКБ начинается с конца апреля, т.е. в модель корректно включать только показатели, предшествующие началу эпидемиологического процесса. Также было исключено явление мультиколлениарности, т.е. из расчетов были изъяты предикторы, имеющие парные корреляции друг с другом, иначе их наличие повлечет за собой существенное искажение результатов.

Таким образом, для прогностической модели были использованы следующие предикторы: среднемесячная температура июля предыдущего года, среднемесячная температура сентября предыдущего года и влажность воздуха в январе предыдущего года (данные показатели не имеют парных корреляций друг с другом).

В результате проведения множественного нелинейного регрессионного анализа методом пошагового включения были определены наиболее значимые предикторы. Было построено прогностическое уравнение, достоверность которого определялась по значению R^2 и распределению остатков.

Программа определила, что наиболее значимыми показателями, оказывающими влияние на эпидемиологический процесс, являются среднемесячная температура июля и сентября предыдущего года. Показатель влажности воздуха в январе прошлого года программа исключила как не оказывающий существенного влияния на эпидемиологический процесс (несмотря на наличие высокой корреляции с заболеваемостью).

Согласно уравнению множественной нелинейной регрессии, эпидемиологический процесс по ИКБ во Владимирской области зависит от среднемесячной температуры июля и сентября предыдущего года, причем от температуры июля в большей степени.

Уровень детерминации позволяет сделать предположение, что данная модель описывает эпидемиологический процесс с вероятностью в 99%.

Для проверки корректности полученного уравнения регрессии был проведен анализ распределения остатков: составленный график показал, что все точки лежат близко относительно прямой, т.е. подчиняются нормальному распределению. Следовательно, полученный нами вывод статистически корректен [6].

Также показателем адекватности модели послужила и гистограмма распределения остатков, указывающая на распределение остатков, близкое к нормальному закону.

Полученные результаты, вероятно, можно объяснить особенностями жизненного цикла иксодовых клещей. Так, положительную зависимость заболеваемости ИКБ от температуры июля можно объяснить как следствие обилия прокормителей в данный период, что способствует размножению клещей и, соответственно, распространению возбудителя ИКБ. Обратную корреляционную зависимость заболеваемости ИКБ с температурой в сентябре можно трактовать следующим образом: повышенные значения температуры в сентябре побуждают недавно перелинявших самок к поиску прокормителей, что в дальнейшем (с наступлением заморозков) приводит к их гибели и гибели отложенных ими яиц (если самки

нашли прокормителя и напитались). Пониженные же показатели температуры сентября побуждают самок клещей, недавно перелинявших, впадать в состояние диапаузы и успешно переносить низкую зимнюю температуру.

Таким образом, во Владимирской области обнаружены активные очаги иксодового клещевого боррелиоза, которые имеют определенную территориальную приуроченность. К наибольшему риску заражения ИКБ предрасположены жители Ковровского, Кольчугинского и Петушинского районов области. Установлено, что уровень заболеваемости населения ИКБ во Владимирской области достоверно не связан с размером лесных ландшафтов и заболоченностью территории. Известно, что данные показатели традиционно считались определяющими при распространении иксодовых клещей, однако на циркуляцию возбудителя в настоящее время, по всей видимости, влияют и другие факторы. Показано, что антропогенная деятельность приводит к разрушению природных экосистем и децентрализации заболевания. Выявленные климатические показатели (среднемесячная температура июля и сентября предыдущего года), вероятно, оказывают влияние на жизненный цикл клещей, что в дальнейшем находит отражение в эпидемиологической обстановке в регионе. Составлена математическая модель, которую можно использовать для прогнозирования эпидемиологической обстановки, что будет способствовать принятию своевременных мер по борьбе с данным заболеванием. Модель показывает, что повышенных значений заболеваемости в текущем году можно ожидать, если июль предыдущего года был довольно жарким, а сентябрь, наоборот, отличался пониженными значениями температуры воздуха.

Работа осуществлена в рамках Государственного задания ВлГУ № 2014/13 на выполнение госработ в сфере научной деятельности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аитов К.И. Природно-очаговые трансмиссивные клещевые инфекции Прибайкалья. Автореф. дис. д-ра мед. наук. Иркутск, 2005.
2. Аминев Р.М. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности гемморагической лихорадки с почечным синдромом в степных ландшафтах и их влияние на заболеваемость военнослужащих. Автореф. дис. канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 2013.
3. Истомин А.В. Региональный мониторинг природно-очаговых инфекций. Псковский региональный журнал. 2006, 1: 122-135.
4. 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.
5. Сунцова О.В. Эколого-паразитологическая характеристика природных очагов клещевого боррелиоза в Прибайкалье. Автореф. дис. канд. биол. наук. Иркутск, 2004.
6. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М., ГЕОТАР-Медиа, 2013.
7. Утенкова Е.О. Природно-очаговые инфекции в Волго-Вятском регионе. Автореф. дис. д-ра мед. наук. Киров, 2009.

Поступила 10.06.15

Контактная информация: Трифонова Татьяна Анатольевна, д.б.н., проф., 600000, Владимир, ул. Горького, 87, р.т. (492)232-33-91

*О.В.Маркина¹, Е.В.Максименко², Н.В.Маркин², Н.А.Селянская¹,
А.И.Шелохович¹, А.Б.Мазрухо¹, Н.И.Борисенко²*

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫМ ЭФФЕКТОМ В ОТНОШЕНИИ *VIBRIO CHOLERAЕ EL TOR*, С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

¹Ростовский-на-Дону противочумный институт, ²Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону

Цель. Изучение состава экстрактов растений с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и оценка их антимикробного эффекта в отношении штаммов *Vibrio cholerae El Tor*. *Материалы и методы.* Качественный и количественный состав растительных экстрактов был изучен с помощью ВЭЖХ. Определение чувствительности микроорганизмов к растительным экстрактам проводили методом диффузии в агаре и методом серийных разведений. *Результаты.* Исследован антибактериальный эффект водных, водно-спиртовых и ацетоновых экстрактов корней кермека, барбариса, солодки. Определены наиболее эффективные способы экстрагирования биологически активных веществ, обладающих антимикробным действием против различных штаммов *V.cholerae El Tor*. *Заключение.* Применение ВЭЖХ позволило установить наличие в экстрактах, обладающих антимикробным эффектом в отношении штаммов *V.cholerae El Tor*, катехинов, алкалоидов протоберберинов и глицирризиновой кислоты.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 63—66

Ключевые слова: растительные экстракты, ВЭЖХ, *Vibrio cholerae El Tor*

*O.V.Markina¹, E.V.Maksimenko², N.V.Markin², N.A.Selyanskaya¹,
A.I.Shelokhovich¹, A.B.Mazrukho¹, N.I.Borisenko²*

STUDY OF COMPOSITION OF PLANT EXTRACTS, POSSESSING ANTIMICROBIAL EFFECT AGAINST *VIBRIO CHOLERAЕ EL TOR*, USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

¹Rostov-on-Don Institute for Plague Control, ²Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Aim. Study the composition of plant extracts using high-performance liquid chromatography (HPLC) and evaluation of their antimicrobial effect against *Vibrio cholerae El Tor*. *Materials and methods.* Qualitative and quantitative composition of plant extracts was studied using HPLC. Determination of sensitivity of microorganisms to plant extracts was carried out by diffusion into agar method and serial dilutions method. *Results.* Antibacterial effect of water, water-alcohol and acetone extracts of roots of *Limonium gmelinii L.*, *Berberis vulgaris L.* and *Glycyrrhiza glabra L.* was studied. The most effective methods of extraction of biologically active substances, possessing antimicrobial effect against various strains of *V.cholerae El Tor*, were determined. *Conclusion.* The use of HPLC allowed to establish the presence of catechines, alkaloids protoberberines and glycyrrhizic acid in extracts, possessing antimicrobial effect against *V.cholerae El Tor* strains.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 63—66

Key words: plant extracts, HPLC, *Vibrio cholerae El Tor*

Одним из источников противомикробных средств природного происхождения могут явиться традиционные растения, которые содержат целый комплекс фармакологически активных соединений, обладающих выраженным антимикробным действием. Действие этих веществ основано на денатурации белков мембраны, дестабилизации систем переноса протонов и электронов, нарушении активного

транспорта, ингибирование синтеза ДНК, РНК, белков и полисахаридов. В настоящее время эти соединения представляют особый интерес в связи с появлением антибиотикорезистентных микроорганизмов, в том числе и холерных вибрионов. Описаны экстракты видов растений, обладающих антибактериальным эффектом в отношении *Vibrio cholerae* [3, 6 — 9]. Их качественный и количественный состав изучается с помощью различных современных методов, одним из которых является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), позволяющая разделять сложные смеси веществ до отдельных составляющих. Отечественных работ, касающихся изучения антибактериальных свойств растительных экстрактов в отношении холерных вибрионов, практически нет. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение состава экстрактов растений с помощью ВЭЖХ и оценка их антимикробного эффекта в отношении штаммов *Vibrio cholerae* El Tor.

Водные и водно-спиртовые экстракты корней кермека (*Limonium gmelinii* L.), барбариса (*Berberis vulgaris* L.) и солодки (*Glycyrrhiza glabra* L.) приготовлены следующим образом: к высушенному и измельченному растительному материалу (10 г) добавляли 50 мл дистиллированной воды или 50% водного раствора этанола и оставляли при +4°C или + 25°C соответственно на 18 часов. Затем экстракты центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 20 минут и фильтровали через фильтровальную бумагу. Водные экстракты были обеззаражены с использованием нитроцеллюлозных мембран (диаметры пор 0,45 мкм и 0,22 мкм; Millipore). Для получения ацетонового препарата солодки навеску измельченного корня настаивали в ацетоне в течение 1 часа при интенсивном перемешивании, экстракт фильтровали, а сырье заливали ацетоном и кипятили на водяной бане в течение 5 минут с обратным холодильником. Стадию экстракции горячим ацетоном повторяли еще 2 раза. Растворитель выпаривали, а сухой осадок растворяли в 50% этаноле. В качестве контроля использовали воду и 50% раствор этанола. Качественный и количественный состав экстрактов изучали с помощью обращенно-фазового варианта ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «Agilent 1200» (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany) с диодно-матричным детектированием (ДАД). Использовали следующие условия хроматографирования: колонка «Zorbax SB-C18» (2,1x150 мм, 3,5µм), подвижная фаза: ацетонитрил (CH₃CN): 0,01н H₂SO₄ — 20:80 об. %, температура колонки 28°C, скорость потока подвижной фазы 0,14 мл/мин, длина волны на УФ-детекторе — 205, 280 нм, время хроматографирования — 40 мин, объем вводимой пробы — 1,0 мкл. При детальном изучении экстрактов, содержащих катехины, использовали следующие условия хроматографирования: подвижная фаза — CH₃CN: 0,01н серная кислота — 8:92 (градиент), температура колонки 35°C, скорость элюента 0,14 мл/мин, УФ-детектор 320, 290, 264, 254 и 205 нм. Количественное определение суммы катехинов в экстрактах кермека проводили по методу абсолютной калибровки. В качестве стандартов использовали следующие препараты: катехин и эпикатехин (ICN Biomedicals Inc.), гидрохлорид берберина (Fluka), глицирризиновая кислота (Fluka). Антимикробный эффект экстрактов изучали с помощью токсигенных штаммов *V.cholerae* El Tor P-18895, P-18826, P-4696, P-12214, *V.cholerae* classica P-1391 и атоксигенных штаммов *V.cholerae* El Tor P-18943, P-18960, P-17905, *V.cholerae* nonO1/nonO139 P-9741, полученных из музея Ростовского-на-Дону противочумного института. Среди них штамм *V.cholerae* El Tor P-18826 являлся высокорезистентным к налidikсовой кислоте, стрептомицину, ампициллину, триметоприму/сульфаметоксазолу, умеренно резистентным к цефтриаксону и цефотаксиму, имел перекрестную устойчивость к фторхинолонам (ципрофлоксацину, офлоксацину, пефлоксацину, норфлоксацину). Для оценки антибактериального действия экстрактов колонии суточных культур вибрионов суспендировали в ФСБ (рН 7,4) с таким расчетом, чтобы плотность клеток достигала 10⁹ КОЕ/мл. На чашки с агаром LB (рН 7,2) высевали по 0,1 мл бактериальной суспензии. Металлическим пробойником асептически делали лунки d=5мм, в которые вносили испытуемые препараты растений в различных концентрациях в объеме 50 мкл. Результаты

учитывали на следующие сутки, измеряя диаметры зон подавления роста вибрионов. Определение чувствительности микроорганизмов к растительным препаратам методом серийных разведений проводили на агаре LB, в который добавляли растительные препараты в разных концентрациях. Для этого стерильно вносили во флакон с 18 мл агара по 2 мл различных препаратов. Тщательно перемешивали и выливали в чашку Петри. После этого на поверхность агара наносили бактериальную суспензию (10^9 КОЕ/мл). Через сутки учитывали интенсивность роста бактерий. Для статистической обработки результатов использовали пакет программ Office XP (Excel).

При изучении хроматограммы водного экстракта кермека были зарегистрированы несколько пиков в области УФ спектра 205 нм. Согласно данным литературы, таким поглощением характеризуются хромофоры класса R-OH [2]. К ним относятся гидролизуемые и негидролизуемые танины, в частности, катехин, эпикатехин и их производные. Испытание полученного экстракта, содержащего катехин и его производные в концентрации 4,6 мг/мл, показало, что диаметры зон подавления роста (ЗПР) холерных вибрионов в концентрации 10^9 КОЕ/мл, составили от 10 до 16 мм. Если концентрацию микроорганизмов снижали до 10^8 КОЕ/мл, то диаметр ЗПР увеличивался в некоторых случаях до 36 мм. В методе серийных разведений нами было установлено, что при добавлении в питательный агар LB экстракта кермека, содержащего катехины в концентрациях от 1,0 до 2,3 мг/мл, полностью подавлялся рост холерных вибрионов. На хроматограммах водных экстрактов корней барбариса и стандарта берберина зарегистрированы пики с $t_R=18,2; 19,99; 35,97$ и $38,58$ минут, свидетельствующие об одинаковой химической природе данных соединений, а именно — алкалоиды протоберберины; наличие пиков с t_R в пределах 2 — 7 минут свидетельствовало о содержании в экстракте также соединений из группы катехинов. Данный экстракт барбариса, содержащий 5,3 мг/мл бербериновых алкалоидов, обладал более слабой активностью в отношении вибрионов, чем экстракт кермека и, в частности, не ингибировал рост штаммов *V.cholerae* El Tor P-18895, P-4696, P-18826. Диаметры ЗПР остальных штаммов не превышали 10,0 мм. На хроматограмме водного экстракта корней солодки регистрировали небольшие пики, соответствующие пикам глицирризиновой кислоты и ее производных — главных биологически активных веществ этого растения. Однако данный экстракт оказался неактивным в отношении всех изученных штаммов холерных вибрионов.

Поскольку считается, что вода достаточно слабо экстрагирует такие соединения как алкалоиды, полифенолы, флавонолы и терпеноиды, то на следующем этапе работы для их экстракции из корней кермека, барбариса и солодки использовали 50% этанол. В результате, были получены водно-спиртовые экстракты кермека, которые обладали активностью, не превышающей активность водных экстрактов. Водно-спиртовые экстракты корней барбариса содержали бербериновые алкалоиды в концентрации 7,2 мг/мл и обладали активностью в отношении всех штаммов холерных вибрионов; диаметры ЗПР составляли от 10 до 18 мм. В методе серийных разведений экстракты с содержанием алкалоидов в концентрации 3 — 4 мг/мл ингибировали рост всех штаммов *V.cholerae*. В водно-спиртовом экстракте корней солодки концентрация глицирризиновой кислоты составляла 16,2 мг/мл. При его испытании установлено, что диаметры ЗПР штаммов *V.cholerae* были на уровне 11,0 — 15,0 мм. Одновременно нами были получены ацетоновые экстракты корней солодки с концентрацией глицирризиновой кислоты 20,2 мг/мл. Антимикробная активность ацетоновых экстрактов в сравнении с водно-спиртовыми увеличивалась в 1,5 — 2 раза.

Таким образом, в настоящем исследовании нами был изучен антимикробный эффект в отношении штаммов холерных вибрионов экстрактов корней кермека, барбариса и солодки, полученных различными способами и охарактеризованных с помощью ВЭЖХ. Установлено, что экстракты обладают различной антимикробной активностью в отношении штаммов *V.cholerae* El Tor. Так, высоким антибак-

териальным эффектом обладал водный экстракт кермека, что, по-видимому, связано с наличием в нем соединений, принадлежащих группе катехинов (эпикатехины, эпигаллокатехины и др.), обладающих способностью связываться с различными структурными белками клеточной стенки, токсинами, ферментами, адгезинами вибрионов, которые представлены в корнях кермека. Считается, что из индивидуальных веществ, именно эпигаллокатехин-3-О-галлат имеет высокий показатель противомикробной активности при минимальной концентрации. Антибактериальная активность экстрактов барбариса в отношении некоторых грамотрицательных микроорганизмов, как известно, связана с алкалоидами протоберберинами [4]. Эти соединения непосредственно воздействуют на ДНК клетки путем интеркаляции (образование вставок между парами оснований), запускают механизм свободно-радикального окисления с повреждением мембран клеток и внутриклеточных структур, ДНК, что ведет к нарушению процессов репликации и транскрипции [5]. Эти вещества и были нами обнаружены в водном и водно-спиртовом экстрактах барбариса. Однако не исключено, что определенный вклад в их антимикробный эффект вносят и соединения группы катехинов, обнаруженные в экстракте корней барбариса. Антибактериальную активность экстрактов корней солодки, как правило, связывают с тритерпеноидами, в частности, глицирризиновой кислотой и ее солями, изофлавоноидами, например, глабридином и др. [1]. В нашем эксперименте высокой активностью обладали только водно-спиртовой и ацетоновый экстракты, тогда как водные были неактивны, хотя в них также регистрировали присутствие глицирризиновой кислоты. Не исключено, что наиболее высокое биологическое действие ацетоновых экстрактов связано не только с глицирризиновой кислотой, но и с присутствием в них каких-то других антибактериальных соединений. Можно заключить, что благодаря ВЭЖХ нам удалось провести качественную и количественную характеристику экстрактов растений и определить наиболее эффективные способы экстрагирования биологически активных веществ, обладающих антимикробным действием в отношении различных штаммов *V.cholerae* El Tor, в том числе и антибиотикорезистентных.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 13-03-12271 офу_м).

ЛИТЕРАТУРА

1. Астафьева О.В. Использование *Glycyrriza glabra*, *Achillea micrantha* Willd. и *Helichrysum aeneum* L. для разработки биопрепаратов с антибактериальными свойствами. Автореф. дис. канд. биол. наук. Ставрополь, 2013.
2. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М., 1976.
3. Akinsinde K.A., Olukoya D.K. Vibriocidal activities of some local herbs. *J. Diarrhoeal. Dis. Res.* 1995, 13 (2): 127-129.
4. Cernáková M., Kostálová D. Antimicrobial activity of berberine — a constituent of *Mahonia aquifolium*. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2002, 47 (4): 375-378.
5. Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical. Microbial. Rev.* 1999, 12 (4): 564-582.
6. Kumar P., Selvi S.S., Govindaraju M. et al. In vitro anti-biofilm and anti-bacterial activity of *Juncella juncea* for its biomedical application. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 2012, 2 (12): 930-935.
7. Mutalib A. A., Ashwell R. N., Kannan R. R. et al. Antimicrobial and selected in vitro enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *croton menyanthii*. *Molecules*. 2013, 18: 12633-12644.
8. Sánchez E., García S., Heredia N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76 (20): 6888-6894.
9. Yamasaki S., Asakura M., Basu N. S. et al. Inhibition of virulence potential of *Vibrio cholerae* by natural compounds. *Indian. J. Med. Res.* 2011, 133 (2): 232-239.

Поступила 10.06.15

Контактная информация: Маркина О.В.,
344002, Ростов-на-дону, ул. М.Горького, 117/40, р.т. (863)234-23-11

Н.Г.Саркисян^{1,3,5}, Л.В.Ганковская², И.А.Тузанкина^{1,3}, О.А.Свитич⁴,
Г.И.Ронь⁵, В.Н.Шершнева⁶, О.Н.Колядина², М.А.Долгих⁵

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ В ГЕНАХ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

¹Уральский федеральный университет, Екатеринбург; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва; ³Институт иммунологии и физиологии, Екатеринбург; ⁴НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ⁵Уральский медицинский университет, ⁶Институт промышленной экологии, Екатеринбург

Цель. Поиск ассоциации полиморфизмов в генах DEFB1, IL-10, TNF- α и TLR2 с развитием хронического генерализованного пародонтита у представителей уральского региона (европеоидной расы). *Материалы и методы.* В исследовании участвовали 142 пациента, которые были поделены на три группы: группа пациентов с пародонтитом, группа с частыми воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей и группа сравнения — здоровые доноры. В работе было проведено исследование полиморфных маркеров: DEFB1 (-44G/C), DEFB1 (-20A/G), IL-10 (-1082 A/G), TNF- α (-308 G/A), Arg753Gln и Arg677Trp с помощью ПЦР в режиме реального времени. *Результаты.* Определена ассоциация инфекционной патологии верхних дыхательных путей и возникновения заболеваний пародонта с полиморфными маркерами в генах DEFB1 (-44G/C) и Arg753Gln и Arg677Trp. Не выявлено достоверных различий в распределении генотипов и аллелей генов IL-10 и TNF- α в группе пациентов с пародонтитом и группе сравнения. *Заключение.* Полиморфизм DEFB1 (-44G/C) может рассматриваться в качестве маркера риска развития пародонтита.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 67—71

Ключевые слова: пародонтит, полиморфизм, врожденный иммунитет, TLR, цитокины, дефенсины, инфекция

N.G.Sarkisyan^{1,3,5}, L.V.Gankovskaya², I.A.Tuzankina^{1,3}, O.A.Svitich⁴,
G.I.Ron⁵, V.N.Shershnev⁶, O.N.Kolyadina², M.A.Dolgikh⁵

ASSOCIATION OF POLYMORPHIC MARKERS IN GENES OF INNATE IMMUNITY IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS AND INFLAMMATORY DISEASES OF UPPER RESPIRATORY TRACT

¹Ural Federal University, Ekaterinburg; ²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow; ³Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg; ⁴Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ⁵Ural Medical University, ⁶Institute of Industrial Ecology, Ekaterinburg, Russia

Aim. Search of association of polymorphisms in DEFB1, IL-10, TNF- α and TLR2 genes with development of chronic generalized periodontitis in representatives of Ural region (Caucasian race). *Materials and methods.* 142 patients, that were split into 3 groups, took part in the study: a group of patients with periodontitis, a group with frequent inflammatory disease of upper respiratory tract and a comparison group — healthy donors. A study of polymorphic markers was carried out: DEFB1 (-44G/C), DEFB1 (-20A/G), IL-10 (-1082 A/G), TNF- α (-308 G/A), Arg753Gln and Arg677Trp using PCR in real time mode. *Results.* Association of infectious pathology of upper respiratory tract and development of periodontitis diseases with markers in DEFB1 (-44G/C) and Arg753Gln and Arg677Trp genes was determined. Significant differences in distribution of genotypes and alleles of genes IL-10 and TNF- α in the group of patients with periodontitis and comparison group were not detected. *Conclusion.* DEFB1 (-44G/C) polymorphism can be examined as a marker of periodontitis development risk.

Key words: periodontitis, polymorphism, innate immunity, TLR, cytokines, defensins, infection

Патология пародонта по значимости занимает второе место после кариеса зубов. С каждым годом увеличивается число публикаций, подчеркивающих связь пародонтита с различными хроническими заболеваниями, к примеру: с атеросклерозом и ассоциированными с ним сердечно-сосудистыми заболеваниями, сахарным диабетом, желудочно-кишечными заболеваниями, заболеваниями почек, ожирением, метаболическим синдромом, заболеваниями щитовидной железы, иммунными нарушениями и др. [2, 6, 7, 11]. По данным ВОЗ распространенность заболеваний пародонта различной степени тяжести составляет более 90% у взрослого населения. Несмотря на интенсивное исследование патогенеза пародонтита и риска развития данной патологии, до настоящего времени не выявлено определенной взаимосвязи между конкретными маркерами и развитием заболевания [2 — 4].

Показано, что этиологическими факторами хронического генерализованного пародонтита являются бактерии *P. intermedia*, *B. forsythus*, *T. denticola* и *A. actinomycetemcomitans*, а также вирусы семейства *Herpesviridae*. В последние годы в литературе появились данные о роли иммунной системы, в частности факторов врожденного иммунитета, в патогенезе пародонтита. Особое место среди факторов иммунитета занимают цитокины, и баланс про- и противовоспалительных цитокинов имеет большое значение при пародонтите. Считается, что полиморфные маркеры в генах *CD-14* и *TNF- α* могут быть ассоциированы с метаболическими нарушениями в системе соединительной ткани и деструктивными процессами в кости. Так, полиморфизмы *C(-260)T* в гене *CD14* и *G(-308)A* в гене *TNF- α* ассоциированы с высоким риском развития хронического воспаления в тканях пародонта. При наличии хронического генерализованного пародонтита в зубодесневой жидкости определяется повышение провоспалительных цитокинов *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-1 α* и снижение — *IL-10*. Показано, что к протективным маркерам хронического пародонтита относятся специфичность *DRB1*04* и аллель *DQA1*0101*, которые ассоциированы с устойчивостью к различным формам данной патологии [9].

В литературе имеются единичные и противоречивые исследования, касающиеся ассоциации полиморфных маркеров в генах, белковые продукты которых участвуют в иммунных реакциях с риском развития заболеваний пародонта [10, 13]. Практически нет данных о маркерах в генах противомикробных пептидов (дефенсинов), которые являются одним из основных факторов защиты слизистой ротовой полости. Следует отметить, что рецепторы врожденного иммунитета, распознающие патогены — *Toll*-подобные рецепторы (*TLR*) и др. могут участвовать в патогенезе пародонтита. В связи с этим, поиск генетических маркеров в генах врожденного иммунитета (*TLR*, дефенсинов, цитокинов) воспалительных заболеваний пародонта является актуальной задачей. Полученные данные позволяют прогнозировать развитие и тяжесть воспалительных заболеваний пародонта.

Цель исследования — поиск ассоциации полиморфизмов в генах *DEFB1*, *IL-10*, *TNF- α* и *TLR2* с развитием хронического генерализованного пародонтита у представителей уральского региона (европеоидной расы).

В данной работе были обследованы 142 пациента, среди них 57 мужчин и 85 женщин, в возрасте от 35 до 55 лет. Все пациенты были разделены на три группы: пациенты с пародонтитом (67 человек: 23 мужчины, 44 женщины, возраст 37 — 55 лет), пациенты с частыми воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей (48 человек: 19 мужчин, 29 женщин, возраст 35 — 52 года) и группа сравне-

ния — здоровые доноры (27 человек: 15 мужчин, 12 женщин, возраст 40 — 55 лет). По расширенному сбору анамнеза выявлено наличие соматической патологии (гайморит, тонзиллит, ларингит, этмоидит, отит, трахеит, фарингит). Проведено комплексное стоматологическое обследование: заполнение амбулаторной карты формы 043У, сбор жалоб, анамнеза, осмотра с индексной оценкой гигиенического состояния полости рта.

Биологическим материалом служил соскоб эпителиальных клеток со слизистой щеки пациента. Анализ материала выполнялся на кафедре иммунологии РНИМУ им. Н.И.Пирогова.

В работе было проведено исследование полиморфных маркеров: DEFBI (-44G/C), DEFBI (-20A/G), IL-10 (-1082 A/G), TNF- α (-308 G/A), Arg753Gln и Arg677Trp. Для оценки полиморфизмов из эпителиальных клеток была выделена ДНК с использованием наборов «К-сорб» («Синтол», РФ). Далее проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для приготовления ПЦР-смеси в реакциях использовали Hot Start Taq DNA Polymerase («Синтол», РФ) а также наборы «Набор реактивов для проведения ПЦР-РВ» («Синтол», РФ). Реакцию для оценки маркеров в генах дефензина проводили на приборе RotorGene («QIAGEN», Германия). Праймеры, задействованные в работе с генетическими маркерами, были разработаны с помощью программы Vector NTI 8.0 и синтезированы фирмой «Синтол» (РФ). Системы для проведения ПЦР-РВ для определения исследуемых полиморфизмов была разработаны на кафедре иммунологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова [1, 5, 8].

Для оценки полиморфных маркеров Arg753Gln и Arg677Trp в гене TLR2 проводили ПЦР и реакцию рестрикции. При исследовании полиморфных маркеров, локализованных в гене TLR2, был использован подход, предложенный Schröder N.W. et al. [12]. Реакцию рестрикции продуктов ПЦР проводили для выявления наличия полиморфных участков в генах TLR2. Для определения полиморфных маркеров Arg677Trp и Arg753Gln в гене TLR2 использовали рестриктазу BspAC I («СибЭнзим», РФ). Температурный и временной режим реакции полностью соответствовал таковым в инструкции фирмы-производителя.

Статистическая обработка данных проводилась в программе Microsoft Excel 2007 с использованием статистического пакета STATISTICA 6.0, а также при использовании формул «Pearson Chi-square» и «M-L Chi-square». Для оценки достоверности различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров применяли критерий χ^2 . Различия между показателями в группах считались достоверными при $p < 0,05$.

При исследовании распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg677Trp гена TLR2 среди пациентов с пародонтитом, с воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей и в группе сравнения обнаружено преобладание частоты аллеля Trp над частотой аллеля Arg и встречаемости генотипа TrpTrp над встречаемостью генотипов TrpArg и ArgArg во всех исследуемых группах. Отличия распределения аллелей и генотипов в группе пациентов с пародонтитом и в группе сравнения были недостоверны. Однако следует отметить, что у пациентов с инфекцией достоверно доминировал гетерозиготный генотип и отсутствовал генотип Arg/Arg.

Таким образом, можно заключить, что полиморфный маркер Arg677Trp гена TLR2 не ассоциирован с пародонтитом. Можно предположить, что хотя замена аминокислоты в 677 положении могла привести к нарушению передачи сигнала с TIR-домена TLR2 рецептора, но в наших исследованиях в группе с пародонтитом это не было показано. В то же время, у пациентов с частыми заболеваниями верхних дыхательных путей выявлена ассоциация маркера Arg677Trp.

Другой полиморфный маркер Arg753Gln также был локализован в районе TIR-домена TLR2. В группе пациентов с воспалительными заболеваниями верх-

них дыхательных путей частота аллеля Gln преобладала над частотой аллеля Arg, а встречаемость генотипа GlnArg — над другими генотипами. Следует отметить, что в группе с пародонтитом соотношение частоты аллелей и генотипов было сопоставимо с показателями в группе сравнения.

В группе пациентов с пародонтитом распределение частоты аллелей и генотипов полиморфизмов IL-10 (-1082 A/G) и TNF- α (-308 G/A) недостоверно отличалось от такового в норме. При рассмотрении распределения частоты генотипов можно отметить, что в группе с пародонтитом недостоверно преобладали генотипы TNF- α (GG) и IL-10 (GG). Сравнительный анализ исследуемых маркеров в генах цитокинов не выявил статистически значимых отличий в группе с пародонтитом и в группе пациентов с воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей относительно показателей в группе сравнения.

Другие полиморфные маркеры, которые были изучены в работе, относились к нетранслируемой области гена дефенсина. Для данного исследования нами были выбраны полиморфные маркеры G(-20)A и C(-44)G гена DEFB1, расположенные в нетранслируемой области. Предположительно данные SNPs могут влиять на уровень экспрессии гена дефенсина. SNPs в положениях -44C/G (rs1800972) и -20G/A (rs11362), которые находятся в 5'-нетранслируемой области (UTR) гена DEFB1, не приводили к изменению аминокислотной последовательности, но могли быть связаны с изменением в транскрипции или в трансляции [14]. Ассоциация данных полиморфных маркеров с патологиями пародонта до настоящего времени не исследовалась.

Различия в распределении аллелей и генотипов полиморфного маркера A(-20)G между исследуемыми группами были статистически недостоверными. Таким образом, можно говорить об отсутствии ассоциации полиморфного маркера A(-20)G гена DEFB1 с пародонтитом и воспалительными патологиями верхних дыхательных путей. Показано, что пародонтит ассоциирован с генотипом CC -44C/G (rs1800972). Частота генотипов в группе пациентов с инфекцией относительно показателей в группе сравнения были следующими: генотип GG — 0,2 и 0,04, генотип GC — 0,41 и 0,46, генотип CC — 0,39 и 0,50, соответственно. Риск развития воспалительных патологий в верхних дыхательных путях связан с носительством генотипа GG, генотип CC является протективным.

Полученные результаты дают возможность выявления генетической предрасположенности к пародонтиту и воспалительной патологии верхних дыхательных путей. Исследование позволяет рекомендовать проведение генетического анализа на полиморфизм гена DEFB1 в детском возрасте, что даст возможность направленной профилактики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганковская О.А. Исследование ассоциации полиморфных маркеров генов TLR2 и TLR9 с преждевременными родами и внутриутробным инфицированием. Медицинская иммунология. 2010, 12 (1-2): 87-94.
2. Козодаева М.В., Иванова Е.В., Манулов Б.М. Состояние пародонта у больных сахарным диабетом (обзор). Пародонтология. 2011, 1 (58): 3-7.
3. Мирсаева Ф.З. Экспресс-диагностика заболеваний внутренних органов у больных хроническим генерализованным пародонтитом. Пародонтология. 2013, 3 (68): 55-58.
4. Ореховой Л.Ю. Заболевания пародонта. М., Поли Медиа Пресс, 2004.
5. Свитич О.А., Ганковская Л.В., Рахманова И.В. и др. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена DEFB1, с гипертрофией аденоидных вегетаций. Вестник РГМУ. 2012, 3: 59-62.
6. Al-Zahrani M. S., Kayal R. A., Bissada N. F. Periodontitis and cardiovascular disease: a review of shared risk factors and new findings supporting a causality hypothesis. Quint. Int. 2006, 37 (1): 11-18.
7. Chapple I. L., Genco R. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/

- AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. J. Periodontol. 2013, 84 (4): 106-112.
8. Gankovskaya L.V., Svitich O.A., Lavrov V.F. et al. Herpes simplex virus type 2 infection during pregnancy is correlated with elevated TLR9 and TNF α expression in cervical cells. Intern. Trends Immunology. 2014, 2: 62-66.
 9. Jazi M.M., Solgi G., Roosta H.A. et al. HLA-DRB and HLA-DQA/HLA-DQB allele and haplotype frequencies in Iranian patients with aggressive periodontitis. J. Periodontal Res. 2013, 48 (4): 533-539.
 10. Karimbux N.Y., Saraiya V.M., Elangovan S. et al. Interleukin-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. J. Periodontol. 2012, 83 (11): 1407-1419.
 11. Luis-Delgado O., Echevarría-García J. J., Berini-Aytés L. et al. Periodontitis as a risk factor in patients with ischemic heart disease. Med. Oral. 2004, 9(2):125-137.
 12. Schröder N.W., Hermann C., Hamann L. et al. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. J. Mol. Med. 2003, 81 (6): 368-372.
 13. Taba M. Jr., Souza S.L., Mariguela V.C. Periodontal disease: a genetic perspective. Braz. Oral. Res. 2012, 26 (1): 32-8.
 14. Tesse R., Cardinale F., Santostasi T. et al. Association of beta-defensin-1 gene polymorphisms with Pseudomonas aeruginosa airway colonization in cystic fibrosis. Genes Immun. 2008, 9 (1): 57-60.

Поступила 15.05.15

Контактная информация: Свитич Оксана Анатольевна,
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)674-55-01

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

П.Д.Лопухов¹, Н.И.Брико¹, А.А.Халдин², Н.Н.Цапкова¹, О.В.Лунашко²

ПАПИЛЛОМАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ, КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ, ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

¹Первый Московский государственный медицинский университет И.М. Сеченова,
²Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии

Папилломавирусы — большая и разнообразная группа вирусов. Она включает около двухсот полностью описанных типов, которые были обнаружены у людей. Вирусы папилломы человека (ВПЧ) выступают этиологическим агентом при различных доброкачественных и злокачественных поражениях эпителия слизистых оболочек и кожи. Крайне важно, что персистирующая ВПЧ инфекция определенных типов является ведущей причиной рака шейки матки, полового члена, вульвы, влагалища, анального канала и ротоглотки (включая основание языка и миндаины). Профилактика ВПЧ инфекции — лучший способ борьбы с обусловленными ВПЧ заболеваниями, а вакцинация, как было показано, самый эффективный метод ее профилактики. В данной статье рассмотрены основные характеристики и клинические проявления папилломавирусной инфекции, а также эффективность вакцинации против ВПЧ.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 71—78

Ключевые слова: папилломавирус, рак шейки матки, аногентиальные бородавки, вакцинация

PAPILLOMAVIRUS INFECTION: PRINCIPLE CHARACTERISTICS, CLINICAL MANIFESTATIONS, VACCINE PROPHYLAXIS

¹Sechenov First Moscow State Medical University, ²Moscow Scientific-Practical Centre of Dermatovenerology and Cosmetology, Russia

Papillomaviruses are a large and diverse group of viruses. It includes approximately 200 fully described types that have been detected in humans. Human papilloma viruses (HPV) are etiologic agents during various benign and malignant lesions of mucous membrane and skin epithelium. Very importantly, persistent HPV infection of certain types is a leading cause of carcinoma of uterine cervix, penis, vulva, vagina, anal canal and fauces (including tongue base and tonsils). HPV infection prophylaxis is the best means to control HPV-conditioned diseases, and vaccination, as had been demonstrated, — the most effective method of its prophylaxis. In this paper principle characteristics and clinical manifestations of papillomavirus infection, as well as effectiveness of vaccination against HPV are examined.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 71—78

Key words: papillomavirus, cervical carcinoma, anogenital warts, vaccination

Папилломавирусная инфекция (ПВИ) широко распространена по всей планете, она обнаруживается у большинства высших позвоночных (млекопитающих, птиц, рептилий) и у человека. ПВИ может иметь как бессимптомное, так и клинически выраженное течение — в виде новообразований кожи и слизистых оболочек [9]. В семействе Papillomaviridae на текущий момент описано более 200 типов вируса, естественным хозяином для которых является человек, они носят общее название — вирус папилломы человека (ВПЧ) [14]. Типы ВПЧ разделяются на пять родов: Alpapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Mupapillomavirus и Nupapillomavirus. ВПЧ инфицируют эпителиальные клетки слизистой оболочки аногенитального тракта (только Альфа-папилломавирусы), слизистой ротовой полости или эпителиальные клетки кожи (представители всех пяти родов) [7]. Особое значение данным вирусам придает тот факт, что они относятся к инфекционным агентам, для которых установлена роль в возникновении онкологических заболеваний. Международным агентством по изучению рака (МАИР, IARC) декларирована связь между ВПЧ и раком шейки матки, полового члена, вульвы, влагалища, анального канала и ротоглотки (включая основание языка и миндалин). Из расчетных 12,7 млн новых случаев рака по всему миру в 2008 году около 4,8% могли быть связаны с ВПЧ [5]. Помимо роли в образовании злокачественных новообразований, ВПЧ является этиологическим агентом для различных видов вирусных бородавок, аногенитальных кондилом и папилломатоза гортани.

Одним из ведущих способов борьбы со злокачественными новообразованиями, ассоциированными с ВПЧ, является профилактика, а наиболее эффективный метод профилактики — вакцинация против ВПЧ. Она стала доступна лишь с 2006 года, однако получила широкое распространение и уже к 2012 году входила в Национальные программы иммунизации (НПИ) 40 стран мира. В Европе число стран, включивших ВПЧ-вакцинацию в свои НПИ, выросло с 3 в 2007 году до 22 в 2012 [5]. По данным ВОЗ (WHO/IVB Database) на сентябрь 2015 года вакцинация против ВПЧ включена в НПИ 62 стран мира и в 3 странах включена частично (например, в России ВПЧ-вакцинация входит в ряд Региональных календарей профилактических прививок субъектов федерации).

Вирус папилломы человека. ВПЧ является ДНК-содержащим вирусом, его геном представлен циркулярной двуспиральной ДНК, насчитывающей около 8000 спаренных оснований (bp). Геном всех типов ВПЧ состоит из восьми открытых рамок

считывания (ORF), в которых выделяются 3 функциональные части: ранний (E, early) участок, который кодирует белки E1-E7, необходимые для репликации вируса; поздний (L, late) участок, кодирующий структурные белки L1-L2, участвующие в сборке вирусных частиц и формировании капсомеров; длинный регулирующий участок (LCR, long control region), содержащий цис-регуляторные элементы, необходимые для репликации и транскрипции вирусной ДНК [10]. Ключевую роль в канцерогенезе при ВПЧ-инфекции играют белки E6 и E7. Они инактивируют белки-супрессоры опухолевого роста p53 и pRb, тем самым нарушая нормальный жизненный цикл клетки и предотвращая апоптоз, что в дальнейшем приводит к неоплазии [9].

Распределение ВПЧ по родам, видам и типам (табл.) основано на различиях в нуклеотидной последовательности наиболее постоянного участка открытой рамки считывания, отвечающей за кодирование структурного белка L1 (L1 ORF). Так, представители двух родов между собой имеют менее 60% сходства данной нуклеотидной последовательности, представители двух видов внутри одного рода имеют 60 — 70% сходства, а каждый новый тип ВПЧ должен быть схож с уже известными типами не более, чем на 90% [7].

Филогенетически близкие типы по биологическим и патогенетическим свойствам зачастую идентичны, однако встречаются случаи и значительных различий. Примером связи между филогенетикой и патологией для близкородственных типов служат пары: ВПЧ 2 и ВПЧ 27, ВПЧ 6 и ВПЧ 11, ВПЧ 16 и ВПЧ 31, которые

Распределение типов ВПЧ по родам и видам [13]

Род	Вид	Типовой вид	Другие типы	Род	Вид	Типовой вид	Другие типы		
Альфа	1	ВПЧ 32	ВПЧ 42	Гамма	7	ВПЧ 109	ВПЧ 123 / 134 / 138 / 139 / 149 / 155 / 170 / 186 / 189 / 193		
	2	ВПЧ 10	ВПЧ 3 / 28 / 29 / 77 / 78 / 94 / 117 / 125 / 160		8	ВПЧ 112	ВПЧ 119 / 147 / 164 / 168 / 176		
	3	ВПЧ 61	ВПЧ 62 / 72 / 81 / 83 / 84 / 86 / 87 / 89 / 102 / 114		9	ВПЧ 116	ВПЧ 129		
	4	ВПЧ 2	ВПЧ 27 / 57		10	ВПЧ 121	ВПЧ 130 / 133 / 142 / 180 / 191		
	5	ВПЧ 26	ВПЧ 51 / 69 / 82		11	ВПЧ 126	ВПЧ 136 / 140 / 141 / 154 / 169 / 171 / 181 / 202		
	6	ВПЧ 53	ВПЧ 30 / 56 / 66						
	7	ВПЧ 18	ВПЧ 39 / 45 / 59 / 68 / 70 / 85 / 97						
	8	ВПЧ 7	ВПЧ 40 / 43 / 91						
	9	ВПЧ 16	ВПЧ 31 / 33 / 35 / 52 / 58 / 67						
	10	ВПЧ 6	ВПЧ 11 / 13 / 44 / 74						
	11	ВПЧ 34	ВПЧ 73 / 177						
	13	ВПЧ 54							
	14	ВПЧ 71	ВПЧ 90 / 106						
	Бета	1	ВПЧ 5					ВПЧ 8 / 12 / 14 / 19 / 20 / 21 / 24 / 25 / 36 / 47 / 93 / 98 / 99 / 105 / 118 / 124 / 143 / 152 / 195 / 196	12
2		ВПЧ 9	ВПЧ 15 / 17 / 22 / 23 / 37 / 38 / 80 / 100 / 104 / 107 / 110 / 111 / 113 / 120 / 122 / 145 / 151 / 159 / 174 / 182 / 198	13				ВПЧ 128	ВПЧ 153
3		ВПЧ 49	ВПЧ 75 / 76 / 115	14	ВПЧ 131				
4		ВПЧ 92		15	ВПЧ 135	ВПЧ 146 / 179 / 192			
5		ВПЧ 96	ВПЧ 150 / 185	16	ВПЧ 137				
Гамма	1	ВПЧ 4	ВПЧ 65 / 95 / 158 / 173 / 205	17	ВПЧ 144				
	2	ВПЧ 48	ВПЧ 200	18	ВПЧ 156				
	3	ВПЧ 50	ВПЧ 188	19	ВПЧ 161	ВПЧ 162 / 166			
	4	ВПЧ 60		20	ВПЧ 163	ВПЧ 183 / 194			
	5	ВПЧ 88		21	ВПЧ 167				
	6	ВПЧ 101	ВПЧ 103 / 108	22	ВПЧ 172				
				23	ВПЧ 175				
				24	ВПЧ 178	ВПЧ 190 / 197			
				25	ВПЧ 184				
				26	ВПЧ 187				
				27	ВПЧ 201				
					ВПЧ 203				
				Мю	1	ВПЧ 1			
					2	ВПЧ 63			
						ВПЧ 204			
				Ню	1	ВПЧ 41			

являются причиной возникновения обыкновенных кожных бородавок, аногенитальных бородавок и рака шейки матки, соответственно. ВПЧ 2 — наглядный пример возможных различий между представителями одного рода: относясь филогенетически к роду Альфа, представители которого в большинстве своем вызывают заболевания аногенитальной области, он сам обнаруживается, главным образом, в вирусных бородавках на коже. В то же время, ВПЧ 2 и ВПЧ 4, которые относятся к разным родам (Альфа и Гамма, соответственно), являются причиной схожих вирусных бородавок на коже [7].

На современном этапе изучения ВПЧ установлено, что многие типы, включая большинство представителей родов Бета и Гамма, вызывают у иммунокомпетентных лиц лишь бессимптомный инфекционный процесс и обнаруживаются в соскобах кожи и смывах со слизистых (некоторые типы рода Гамма). Эти вирусы хорошо адаптированы к своим хозяевам и в большинстве случаев могут проходить жизненный цикл и поддерживать уровень популяции, не вызывая видимых патологических изменений. Данное наблюдение — свидетельство того, что взаимодействие папилломавирусов с популяциями своих естественных хозяев продолжается, вероятно, огромный промежуток времени, что позволило сформироваться балансу между репликацией вируса и иммунной системой макроорганизма [9].

Для представителей рода Альфа, инфицирующих слизистые оболочки аногенитального тракта, введена дополнительная эпидемиологическая классификация, основанная на риске возникновения злокачественных новообразований в результате инфицирования. Согласно данной классификации выделяются 15 ВПЧ типов высокого онкогенного риска (ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 и 82), 3 типа возможно высокого риска (ВПЧ 26, 53 и 66) и 12 типов низкого риска (ВПЧ 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 и 89) [19].

ВПЧ и злокачественные новообразования. На текущий момент, помимо ВПЧ, установлена роль нескольких инфекционных агентов как основной причины или как сопутствующего фактора специфических онкологических заболеваний. К ним относятся: два представителя семейства герпес вирусов (вирус Эпштейна-Барр и вирус герпеса 8 типа), вирусы гепатита В и С, полиомавирус человека (Merkel cell polyomavirus, МСV), Т-лимфотропный вирус человека 1 типа (HTLV-1), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) 1 и 2 типа, бактерия *Helicobacter pylori* (как основная причина рака желудка) и ряд паразитов: *Schistosoma haematobium* (основная причина рака мочевого пузыря в Египте), *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* (факторы развития холангиокарциномы и гепатоцеллюлярной карциномы на юго-востоке Таиланда и юге Китая) [26].

Роль инфицирования женщин ВПЧ в возникновении рака шейки матки (РШМ) была доказана в ходе ряда эпидемиологических и молекулярно-генетических исследований. ДНК ВПЧ различных типов обнаруживалась в 99,7% случаев как плоскоклеточного рака, так и аденокарциномы [24, 27]. Наиболее распространенными типами ВПЧ при инвазивном раке шейки матки (иРШМ) являются типы 16 и 18. На них приходится порядка 70 — 76% случаев иРШМ во всем мире (~55 — 60% на ВПЧ 16 и ~15 — 18% на ВПЧ 18). 12 наиболее часто встречающихся типов ВПЧ при иРШМ по мере убывания распространенности выглядят следующим образом: ВПЧ 16, 18, 58, 33, 45, 31, 52, 35, 59, 39, 51 и 56 [18]. В России, по данным мета-анализа, тремя наиболее распространенными типами ВПЧ при иРШМ являются ВПЧ 16 (~65 — 66%), ВПЧ 18 (~6 — 18%) и ВПЧ 45 (6 — 13%). ВПЧ 16 также был наиболее часто встречающимся типом, обнаруживаемым при обследовании женщин с нормальной цитологией (от 3 до 14%) [23].

Вскоре после обнаружения ДНК ВПЧ 16 и 18 в биопсиях РШМ ДНК этих же типов были обнаружены и при других типах рака аногенитальной области. Установлено, что примерно в 50% случаев карциномы вульвы обнаруживается ДНК ВПЧ (главным образом, ВПЧ 16). Карциномы полового члена содержат ДНК

ВПЧ в 30 — 50% случаев. Для карцином влагалища, анального канала и периаанального рака данный показатель составляет 60 — 90% [8, 12, 26]. ДНК ВПЧ также обнаруживается при плоскоклеточном раке головы и шеи в 22,1 — 45,8% случаев в зависимости от точной локализации процесса (ротоглотка, гортань или полость рта), из них до 82,2% приходится на ВПЧ 16 типа [20].

Глобальный вклад папилломавирусов в возникновение онкологических заболеваний у женщин и у мужчин не одинаков. Это в значительной степени обусловлено ролью ВПЧ в развитии рака шейки матки. Более 50% онкологических заболеваний, связанных с инфекциями, у женщин вызваны ВПЧ. Для мужчин аналогичная цифра составляет приблизительно 4,3% [28].

В 2012 году расчетное число новых случаев РШМ во всем мире составило 528 000 (четвертый по частоте встречаемости рак среди женщин), а расчетное число смертей — 266 000 (также четвертое место среди злокачественных новообразований, повлекших за собой смерть у женщин). Показатель заболеваемости РШМ сильно варьирует от страны к стране, большую роль играет уровень развития экономики и здравоохранения. Так, РШМ является наиболее частым раком в 38 из 184 странах по всему миру и в 45 странах — ведущей причиной смерти, эти страны в основном располагаются в Африке к Югу от Сахары, Азии, а также Центральной и Южной Америке. Наименьшие показатели заболеваемости отмечаются в Западной Европе, Северной Америке, Австралии, Новой Зеландии и странах Восточного Средиземноморья. За последние 30 лет во многих странах отмечалось снижение заболеваемости РШМ, что во многом связано с улучшением уровня жизни населения, а в некоторых странах — с внедрением эффективной системы вторичной профилактики. В то же время, в ряде стран даже с высоким уровнем жизни населения отмечается рост заболеваемости РШМ, к ним относятся, например, некоторые страны Восточной Европы и бывшего СССР. Изменения в сексуальном поведении людей повлекли за собой повышение риска инфицирования ВПЧ высокого риска, что в условиях отсутствия эффективных программ скрининга ведет к росту заболеваемости РШМ [25].

В России в 2013 году зарегистрировано 15 427 новых случаев РШМ, стандартизированный показатель заболеваемости составил 14,7 на 100 000 населения. За период с 1997 по 2013 гг. имеется достоверная тенденция к росту заболеваемости РШМ. Однако данная картина не характерна для всей страны, и в ряде регионов (наиболее экономически развитых) отмечается снижение заболеваемости. Например, в Москве в 2013 году зарегистрировано 844 новых случая РШМ, стандартизированный показатель заболеваемости — 8,46 на 100 000 населения, а за период с 2007 по 2013 гг. отмечается тенденция к снижению заболеваемости [1].

Одной из особенностей РШМ является сравнительно молодой средний возраст заболевших. Если для большинства злокачественных новообразований в России характерен рост среднего возраста впервые установленного диагноза, то для РШМ данный показатель снижается, и на 2013 год он составлял ~52 года [1].

Расчетное число новых случаев злокачественных новообразований, возникновение которых связывают с ВПЧ, в 2008 году в мире составило 700 000. Из них непосредственно ВПЧ мог послужить причиной 610 000 случаев [11].

ВПЧ и доброкачественные новообразования. Доброкачественные новообразования, вызываемые ВПЧ, условно разделяются на два типа: слизистые и кожные. К слизистым относятся: аногенитальные бородавки (или остроконечные кондиломы), бородавки полости рта и папилломатоз гортани. К кожным — различные виды кожных (вирусных) бородавок.

Аногенитальные бородавки (АБ) — клинически выраженная форма ПВИ, которая проявляется в виде единичных или множественных папул на влагалище, вульве, половом члене, мошонке, матке, уретре, анальном канале и в перианальной области. ВПЧ 6 и 11 обнаруживаются в 96 — 100% случаев АБ и являются

главной причиной их возникновения [5]. АБ крайне заразное заболевание: приблизительно у 65% лиц, имеющих инфицированного полового партнера, в течение непродолжительного периода времени (от 3 недель до 8 месяцев) также возникают АБ [16]. В среднем, инкубационный период для АБ составляет от 1 до 3 месяцев [21]. Однако проведенное в США когортное исследование среди молодых мужчин показало, что АБ могут появиться и в течение двух лет после случайного обнаружения бессимптомного инфицирования гениталий ВПЧ типами 6 и 11 [4]. АБ широко распространены среди взрослого населения по всему миру: заболеваемость ими составляет от 160 до 289 случаев на 100 000 населения, в зависимости от региона [22].

Зачастую, именно те типы ВПЧ, которые вызывают видимые и длительно сохраняющиеся папилломы гениталий и ротовой полости, вызывают наибольшее беспокойство у пациентов. Примерно у одной трети пациентов, начинающих лечение от АБ, спустя 3 месяца данные образования все еще сохраняются или возникают повторно. Типы ВПЧ, которые вызывают АБ (представители 10 вида рода Альфа, ВПЧ 6 и 11) также являются причиной возникновения рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП). Это достаточно редкое заболевание, поражающее детей с частотой порядка 4 случаев на 100 000, имеющее тяжелое течение и требующее хирургического вмешательства, зачастую неоднократного. А в отдельных случаях (~5%), когда инфекция сохраняется длительное время и проникает вниз по дыхательным путям в легкие, РРП может прогрессировать в рак [9].

Кожные бородавки — доброкачественные новообразования кожи, которые различаются по клинической морфологии и гистологической картине в зависимости от типов ВПЧ, которыми они индуцированы. К кожным бородавкам относятся: обыкновенные (вульгарные) бородавки (*verruca vulgaris*; главным образом ассоциированные с ВПЧ 2, 4, 7 и 57), глубокие подошвенные и ладонные бородавки (ВПЧ 1), плоские бородавки (*verruca planar*, ВПЧ 3, 10 и 41), промежуточные бородавки (смесь обыкновенных и плоских бородавок; ВПЧ 26, 27, 28 и 29) и кистозные или пятнистые бородавки (ВПЧ 60, 63 и 65), которые имеют сходство с плоскими [15]. Кожные бородавки доброкачественны, обычно ограничены в росте и зачастую сами спонтанно регрессируют. Однако при нарушениях в иммунной системе, у лиц с иммунодефицитами, кожные бородавки могут стать серьезной проблемой. Исследования показали, что кожные бородавки возникают у 90% реципиентов трансплантируемых органов, проживших более 5 лет после начала иммуносупрессии, при этом в большинстве случаев обнаруживается более двух различных типов ВПЧ [17]. Лечение в таких случаях осложнено отягощенным анамнезом и частыми рецидивами.

Говорить о заболеваемости и распространенности кожных бородавок затруднительно, ввиду отсутствия системы регистрации и учета данных новообразований, практически, во всем мире. По оценкам, распространенность кожных бородавок может достигать 20% от популяции, а большинство людей в течение жизни, как минимум, хотя бы один раз переносили данное заболевание [15]. В Москве в Московском научно-практическом центре дерматовенерологии и косметологии ДЗМ на базе Центра вирусной патологии кожи с 2014 года ведется статистический учет данных новообразований, что в дальнейшем должно способствовать усовершенствованию системы эпидемиологического надзора и возможной профилактики кожных проявлений ПВИ.

О возможной связи между злокачественными и доброкачественными новообразованиями, обусловленными ВПЧ, говорит тот факт, что наличие у мужчин в анамнезе аногенитальных бородавок повышает риск обнаружения бессимптомной папилломавирусной инфекции гениталий, обусловленной как высокоонкогенными, так и низкоонкогенными типами. Кроме того, аналогичное повышение риска может отмечаться и при наличии в анамнезе вирусных бородавок, локализующихся на пальцах рук, кистях и туловище [13].

Вакцинация против ВПЧ. На текущий момент во многих странах мира (в том числе, в России) доступны две ВПЧ-вакцины: двухвалентная (ВПЧ 16 и 18) и четырехвалентная (ВПЧ 6, 11, 16 и 18). Кроме того, в декабре 2014 года в США была зарегистрирована третья — девятивалентная вакцина (ВПЧ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 и 58).

Антигенной основой ВПЧ-вакцин являются полученные по рекомбинантной ДНК-технологии вирусные белки L1, одним из свойств которых является склонность к самосборке в вирусоподобные частицы (VLP). VLP не содержат в себе ДНК и, следовательно, не могут вызывать инфекционный процесс. Инъекция VLP ВПЧ вызывает сильный и продолжительный типоспецифический иммунный ответ [3].

Двухвалентная и четырехвалентная вакцины продемонстрировали высокую эффективность в отношении образований, обусловленных вакцинными типами, показав также возможность формирования перекрестного иммунитета к ряду невакцинных типов. Каждая вакцина прошла по два крупных клинических исследования 3 фазы (FUTURE I и FUTURE II — четырехвалентная, PATRICIA и CVT — двухвалентная). Все исследования имели большую выборку участников (5 000 — 18 500 вакцинированных), были слепыми, рандомизированными и контролируемыми, включали девушек в возрасте 15 — 26 лет. В ходе данных исследований была показана высокая иммуногенность, безопасность и эффективность вакцин [5].

Внедрение вакцинации в НПИ позволяет получать сведения об эффективности вакцин непосредственно в полевых условиях. Первой страной, включившей ВПЧ-вакцинацию в свою НПИ, была Австралия (с 2007 года, четырехвалентная вакцина). Изначально была введена плановая иммунизация девочек 12 — 13 лет и туровая иммунизация девушек 14 — 26 лет. В дальнейшем программа иммунизации претерпела ряд изменений и на данный момент она включает: плановую вакцинацию мальчиков и девочек 12 — 13 лет (в 2014 году была проведена туровая вакцинация для мальчиков 14 — 15 лет). Опыт применения четырехвалентной ВПЧ вакцины в Австралии продемонстрировал ее эффективность в отношении дисплазий шейки матки высокой степени (снижение риска возникновения на 46%) и низкой степени (снижение риска на 34%) среди молодых женщин [6]. Помимо того, поскольку вакцина включает антигены ВПЧ 6 и 11 типов, она показывает высокую эффективность в снижении заболеваемости АБ, что особенно наглядно ввиду сравнительно более короткого инкубационного периода АБ по сравнению со злокачественными проявлениями ПВИ. В течение 5 лет в Австралии произошло значительное снижение заболеваемости АБ: среди девушек до 21 года — на 92,6%, 21 — 30 лет — на 72,6%; среди гетеросексуальных мужчин до 21 года — на 81,8%, 21 — 30 лет — на 51,1% [2].

Таким образом, вакцинация от ВПЧ демонстрирует высокую эффективность и безопасность и на пути борьбы со злокачественными и рядом доброкачественных ВПЧ-ассоциированных заболеваний должна получить максимально широкое распространение среди подлежащих вакцинации групп.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д.Каприна, В.В.Старинского, Г.В.Петровой. М.: МНИОИ им. П.А.Герцена, 2015.
2. Ali H., Donovan B., Wand H. et al. Genital warts in young Australians five years into national human papillomavirus vaccination programme: National surveillance data. *BMJ*. 2013, 346: F2942.
3. Arbyn M., Dillner J. Review of current knowledge on HPV vaccination: an appendix to the European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. *J. Clin. Virol.* 2007, 38 (3): 189-197.
4. Arima Y., Winer R.L., Feng Q.A. et al. Development of genital warts after incident detection of human papillomavirus infection in young men. *J. Infect. Dis.* 2010, 202: 1181-1184.

5. Bosch F.X., Broker T.R., Forman D. et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 2013, 31 (6): G1-G31.
6. Crowe E., Pandeya N., Brotherton J.M. et al. Effectiveness of quadrivalent human papillomavirus vaccine for the prevention of cervical abnormalities: case-control study nested within a population based screening programme in Australia. *BMJ*. 2014, 348: g1458.
7. de Villiers E.M., Fauquet C., Bernard H.U. et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004, 324: 17-27.
8. de Vuyst H., Clifford G.M., Nascimento M.C. et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int. J. Cancer*. 2009, 124: 1626-1636.
9. Doorbar J., Quint W., Banks L. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012, 30 (5): F55-70.
10. Fehrman F., Laimins L.A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003, 22: 5201-5207.
11. Forman D., de Martel C., Lacey C.J. et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012, 30 (5): F12-F23.
12. Gross G., Pfister H. Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts. *Med. Microbiol. Immunol.* 2004, 193: 35-44.
13. Hernandez B.Y., Shvetsov Y.B., Goodman M.T. et al. Genital and extra-genital warts increase the risk of asymptomatic genital human papillomavirus infection in men. *Sex. Transm. Infect.* 2011, 87: 391-395.
14. International Human Papillomavirus Reference Center. Available at: [www.http://hpvcenter.se](http://hpvcenter.se).
15. Jablonska S., Majewski S., Obalek S. et al. Cutaneous warts. *Clin. Dermatol.* 1997, 15 (3): 309-319.
16. Lacey C.J., Lowndes C.M., Shah K.V. Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine*. 2006, 24 (3): S3/S35-S3/41.
17. Leigh I.M., Buchanan J.A., Harwood C.A. et al. Role of human papillomaviruses in cutaneous and oral manifestations of immunosuppression. *J. Acq. Immune Def. Syndr.* 1999, 21 (1): S49-S57.
18. Li N., Franceschi S., Howell-Jones R. et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int. J. Cancer*. 2011, 128 (4): 927-935.
19. Muñoz N., Bosch F.X., de Sanjose S. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348: 518-527.
20. Ndiaye C., Mena M., Alemany L. et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2014, 15 (12): 1319-1331.
21. Oriel J.D. Natural history of genital warts. *Br. J. Vener. Dis.* 1971, 47: 1-13.
22. Patel H., Wagner M., Singhal P. et al. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC Infect. Dis.* 2013, 13: 39.
23. Rogovskaya S.I., Shabalova I.P., Mikheeva I.V. et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution, cervical cancer screening practices and current status of vaccination implementation in Russian Federation, the Western Countries of the former Soviet Union Caucasus Region and Central Asia. *Vaccine*. 2013, 31 (7): H46-H58.
24. Schiffman M. H., Bauer H. M., Hoover R. N. et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Nat. Cancer Institute*. 1993, 85 (12): 958-964.
25. World cancer report 2014 (ed. Bernard W. et al.), 2014.
26. Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology*. 2009, 384 (2): 260-265.
27. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*. 2002, 2: 342-350.
28. Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology*. 2009, 392: 1-10.

Поступила 10.08.15

Контактная информация: Лопухов Платон Дмитриевич,
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, р.т. (499)248-18-33

© П.Ю.ПОПОВА, Н.И.МИКШИС, 2016

П.Ю.Попова, Н.И.Микшис

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ЖИВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ И НЕПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Живые генно-инженерные сибиреязвенные вакцины на платформе авирулентных и пробиотических микроорганизмов являются безопасной и адекватной альтернативой препаратам на основе аттенуированных штаммов *Bacillus anthracis*. Мукозальная аппликация приводит к непосредственному контакту вакцинных препаратов со слизистыми оболочками в тех органах и тканях макроорганизма, которые в первую очередь подвергаются воздействию патогена, приводя к развитию местного и системного иммунного ответа. Живые рекомбинантные сибиреязвенные вакцины могут применяться как самостоятельно, так и в схеме прайм-бустерной иммунизации. В обзоре сделан акцент на иммуногенных и протективных свойствах экспериментальных живых генно-инженерных препаратов, созданных на основе представителей родов *Salmonella*, *Lactobacillus* и аденовирусов.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 79—89

Ключевые слова: сибиреязвенные вакцины, иммунизация, мукозальный иммунитет, сальмонеллы, лактобациллы, аденовирусы

P.Yu.Popova, N.I.Mikshis

PERSPECTIVES OF DEVELOPMENT OF LIVE RECOMBINANT ANTHRAX VACCINES BASED ON OPPORTUNISTIC AND APATHOGENIC MICROORGANISMS

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

Live genetic engineering anthrax vaccines on the platform of avirulent and probiotic microorganisms are a safe and adequate alternative to preparations based on attenuated *Bacillus anthracis* strains. Mucosal application results in a direct contact of the vaccine preparations with mucous membranes in those organs and tissues of the macro-organisms, that are exposed to the pathogen in the first place, resulting in a development of local and systemic immune response. Live recombinant anthrax vaccines could be used both separately as well as in a prime-boost immunization scheme. The review focuses on immunogenic and protective properties of experimental live genetic engineering preparations, created based on members of geni of *Salmonella*, *Lactobacillus* and adenoviruses.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 79—89

Key words: anthrax vaccines, immunization, mucosal immunity, Salmonella, Lactobacillus, adenoviruses

Острое особо опасное инфекционное заболевание — сибирская язва является угрозой санитарно-эпидемиологическому благополучию населения, что обусловлено комплексом факторов. Среди них важную роль играют наличие множества стационарно неблагоприятных по сибирской язве пунктов, способность возбудителя к образованию чрезвычайно устойчивых спор, высокая летальность при аэрозольном заражении.

Центральная роль в патогенезе сибиреязвенной инфекции отведена бинарному экзотоксину. Экзотоксин состоит из трех белков, детерминанты синтеза которых расположены на плазмиде рХО1. Протективный антиген (ПА), неток-

сичная субъединица, ответственен за связывание с клеточными рецепторами и транслокацию токсичных субъединиц — отечного (ОФ) и летального (ЛФ) факторов в клетку. Белковая молекула ПА включает четыре функциональных домена. Домен 1 (249 аминокислотных остатков) содержит сайт протеолитической активации. Под действием клеточной протеазы фурина *in vivo* или трипсина *in vitro* молекула ПА расщепляется на фрагменты ПА20 и ПА63 с молекулярной массой 20 кДа и 63 кДа, соответственно. Аминокислотные остатки с 250 по 487 представляют домен 2, содержащий сайт расщепления хемотрипсином, необходимый для реализации токсичных свойств *Bacillus anthracis*. Наименьшим числом аминокислотных остатков, с 488 по 594, представлен домен 3. Он включает в себя гидрофобную часть, участвующую во взаимодействиях с ОФ и ЛФ. Последовательности с 595 по 735 составляют домен 4. Эта часть молекулы ПА отвечает за закрепление токсина на специфическом рецепторе клетки-мишени [2, 8, 39].

ПА обладает выраженным защитным потенциалом и является базисом для создания эффективных сибиреязвенных вакцин. При этом возможно включение в генетическую конструкцию детерминант синтеза как полноразмерной молекулы ПА, так и его отдельных доменов, например, домены 1 и 4.

В России для профилактики сибирской язвы лицензирована живая вакцина на основе токсигенного бескапсульного штамма *B. anthracis* СТИ-1. В США и Великобритании лицензированы химические вакцины, представляющие собой адсорбированный на солях алюминия ПА, выделенный из аттенуированного бескапсульного штамма возбудителя сибирской язвы [6, 7, 20, 21]. Несмотря на доказанную многолетними исследованиями эффективность, указанные препараты не лишены ряда недостатков. В настоящее время усилия ученых направлены на создание усовершенствованной сибиреязвенной вакцины, которая должна сочетать в себе высокую иммуногенность и безопасность. Подобным требованиям в полной мере отвечают химические вакцины на основе рекомбинантных высокоочищенных протективных антигенов сибиреязвенного микроба. Работы по созданию рекомбинантных вакцин активно ведутся в крупнейших институтах мира. Нами был разработан иммуногенный, протективный и безопасный прототип химической вакцины на основе рекомбинантного ПА (рПА) [1]. В последнее время широко обсуждается парадигма прайм-бустерной схемы иммунизации, включающей первичное введение живой вакцины и бустерную иммунизацию химической вакциной.

Создание живых вакцин нового поколения также подразумевает использование рекомбинантных технологий, позволяющих создавать штаммы с заданными свойствами. Перспективными экспериментальными разработками являются живые вакцины с клонированными детерминантами иммуногенности, кодирующими синтез ПА, на основе аттенуированных штаммов *B. anthracis*, штаммов гетерологичных видов бактерий, вирусов.

В течение последнего десятилетия активно ведутся разработки по созданию живых вакцин на платформе условно патогенных и непатогенных бактерий, таких как представители родов *Salmonella* и *Lactobacillus*. Преимуществом подобных вакцин является пероральный или интраназальный способ их введения. Неинвазивность указанных способов позволяет снизить затраты на проведение вакцинации, в случае необходимости препараты могут применяться самостоятельно. Важно, что при мукозальной аппликации вакцинный препарат контактирует непосредственно со слизистыми оболочками в тех органах и тканях организма человека, которые в первую очередь подвергаются воздействию патогена. Активируются как местный, мукозальный, так и системный иммунный ответ, как гуморальные, так и клеточные механизмы защиты [4, 23, 41, 51].

Штамм *S. enterica* serovar Typhi Ty21a лицензирован для применения у людей, что позволяет использовать его как реципиента при конструировании живых про-

филактических препаратов для иммунизации людей. Длительное наблюдение (25 лет) не выявило случаев реверсии штамма к вирулентному фенотипу и фактов развития серьезных побочных реакций у привитых людей [15, 53]. Разработаны термостабильные формы, позволяющие сохранять иммуногенность вакцины при хранении при 4°C в течение 5 — 10 лет, при комнатной температуре — больше года. Хорошо изучена безопасность штамма *S. enterica* serovar Typhi CVD908, являющегося ауксотрофным мутантом штамма Ty2 [9, 11].

Особенностью конструирования живых сибирезвенных вакцин на основе сальмонелл является необходимость включения систем экспорта, обеспечивающих эффективную продукцию иммуногенного белка. Наиболее часто используется система экспорта гемолизина кишечной палочки HlyA, благодаря которой антиген попадает во внеклеточную среду, проходя через внутреннюю и внешнюю мембраны. Интеграция кодирующей последовательности полной молекулы ПА (ПА83) в сочетании с системой HlyA в хромосому ауксотрофных дериватов *S. typhimurium* приводила к выраженной экспрессии ПА83 по результатам иммуноферментного анализа. Показана эффективность рекомбинантного штамма при внутривенном введении линейным мышам дозы 10^5 КОЕ. Титры специфических антител были в 2 — 4 раза выше, чем при введении того же штамма в дозе 10^9 КОЕ per os. После заражения 100 ЛД₅₀ *V. anthracis* СТИ-1 выжили 9 из 10 внутривенно иммунизированных мышей, при этом у выживших животных детектировали высокие титры специфических антител до окончания срока наблюдения (в течение 72 дней) [14]. Osorio M. et al. [37] на основе штамма *S. typhi* Ty21a сконструировали прототипы пероральной сибирезвенной вакцины, которые различались по наличию или отсутствию системы экспорта HlyA и по промотору — htrA или nirB. Иммунизацию мышей линии A/J осуществляли трехкратно интраназально в дозе $5 \cdot 10^8$ КОЕ или трехкратно интраперитонеально в дозе $5 \cdot 10^7$ КОЕ. Максимальные титры антител по результатам ИФА (GMT 30000) и теста токсин-нейтрализации (титр 16241) наблюдали после внутрибрюшинного введения биомоделям штамма, экспрессирующего ПА с HlyA под htrA промотором. Интраназальная иммунизация тем же штаммом приводила к менее выраженному антителообразованию — GMT 3900, титр нейтрализации 1702. Тем не менее, все опытные животные выжили после интраназального заражения токсигенным бескапсульным штаммом *V. anthracis* 7702 в дозе $5 \cdot 10^9$ /мл, что позволило авторам заявить об эффективности и перспективности предлагаемого прототипа вакцины.

Для увеличения экспрессии целевого антигена и минимизации метаболической нагрузки на реципиентный штамм сальмонелл предложена система экспорта на основе эндогенного криптоического гемолизина ClyA, который способствует выведению гетерологичного антигена в межклеточное пространство в составе липидной везикулы, что повышает степень его распознавания иммунной системой [13]. Было создано две конструкции на основе штамма *S. typhi* CVD908htrA. В одном случае реципиентный штамм синтезировал слитный белок ClyA-d4 (домен 4 ПА с системой ClyA) во внеклеточное пространство, а в другом — синтезировал только домен 4 ПА в цитоплазму. Линейных мышей иммунизировали двукратно интраназально в дозе 1 — $3 \cdot 10^9$ КОЕ. Титры анти-ПА антител детектировали в сыворотках крови 11 из 15 биомоделей, иммунизированных *S. typhi* CVD908htrA, экспрессирующих слитный белок ClyA-d4. В то же время, в группе мышей, которым вводили штамм, продуцирующий домен 4 ПА в цитоплазму, лишь у одного животного выявили сероконверсию. При этом у биомоделей обеих групп не регистрировали достоверных различий по числу Т-клеток, продуцирующих гамма-интерферон и интерлейкин-5. Аналогичный подход применили в 2007 году Stokes M. et al. [46]. Авторы сконструировали и провели сравнение иммуногенности штаммов сальмонелл, экспрессирующих в составе мультикопийной плазмиды полную молекулу ПА или домен 4 ПА, или слитные

домены 1 и 4 ПА в сочетании с системой экспорта ClyA. Штамм *Salmonella*, экспрессирующий полную молекулу иммуногена, при трехкратной пероральной иммунизации в дозе $1 \cdot 10^8$ — $5 \cdot 10^9$ КОЕ обеспечивал лучшую защиту от аэрозольного заражения 200 ЛД₅₀ *B. anthracis* СТИ — выжили 5 из 6 животных. В дальнейшем та же группа авторов провела сравнение двух систем экспорта белковых молекул на примере прототипов пероральной вакцины на основе штамма *S. typhi* Ty21a. Были созданы две экспрессирующие конструкции. В первом случае полноразмерный ген синтеза ПА с системой экспорта гемолизина кишечной палочки (HlyA-PA) вводили в состав низкокопийной плазмиды pVDL9.3. Во втором случае тот же ген в сочетании с системой экспорта ClyA *S. typhi* (ClyA-PA) входил в состав мультикопийной плазмиды pSEC. Мышей линии BALB/c иммунизировали штаммами *S. typhi* Ty21a(pVDL9.3PA83ec) или *S. typhi* Ty21a(pSECPA) интраназально трехкратно дозой 1 — $2 \cdot 10^9$ КОЕ. Замечено, что конструкция с ClyA-PA стимулировала в 7 раз более выраженный иммунный ответ по сравнению со штаммом с HlyA-PA. В то же время, титры токсин-нейтрализующих антител в сыворотках биомоделей были сопоставимыми: 551 ЕД₅₀ и 349 ЕД₅₀ для конструкций с HlyA-PA и ClyA-PA, соответственно [5].

Активно разрабатывалась стратегия иммунизация, включающая первичное введение рекомбинантной живой вакцины на основе штаммов *Salmonella* и последующую бустерную иммунизацию лицензированной химической вакциной AVA или рПА, адсорбированным на альгидрогеле. Преимущество предлагаемой схемы в том, что мукозальная вакцинация препаратом, экспрессирующим ПА, предположительно будет стимулировать сильный иммунный ответ и образование В-клеток памяти, следовательно, в случае акта биотерроризма примированный контингент в ответ на однократную инъекцию химической вакцины на основе ПА продемонстрирует выраженный всплеск уровня токсин-нейтрализующих антител. Эффективность прайм-бустерного варианта иммунизации показана на модели мышей и приматов. В работе Baillie L. et al. [5] у примированных мышей линии BALB/c детектировали высокий уровень защитных специфических антител в течение года наблюдения после однократной бустерной инъекции рПА. Интенсивность иммунного ответа напрямую зависела от кратности первичной иммунизации прототипом живой вакцины на основе сальмонелл. В сыворотках крови трехкратно примированных животных значения титров анти-ПА антител почти в 100 раз превышали аналогичные показатели в группе однократно примированных мышей. Galen J. et al. [10] примировали резус-макак и обезьян цинномолгус интраназально штаммом *S. typhi* CVD908htrA, экспрессирующим слитный иммуноген ClyA-ПА83, бустерную иммунизацию осуществляли рПА или AVA. Токсин-нейтрализующие антитела появлялись в сыворотках экспериментальных животных уже на 7 сутки после бустерного введения ПА. Положительные результаты были получены при использовании генно-инженерных штаммов на основе *S. typhi* Ty21a, продуцирующих ПА, для примирования новорожденных мышей. После однократной интраназальной иммунизации штаммом в дозе $1 \cdot 10^9$ КОЕ у биомоделей выявлялся высокий уровень IgA-секретирующих В-клеток и IFN- γ -секретирующих Т-клеток, в отличие от животных, иммунизированных только рПА. Бустерная внутримышечная инъекция рПА приводила к повышению титров анти-ПА IgG, токсин-нейтрализующих антител и опсонофагоцитарных антител и увеличению количества плазматических клеток и В-клеток памяти. Защитная эффективность прайм-бустерной стратегии вакцинации после внутривенного заражения мышат BALB/c 2 MLD летального токсина составила 72% при первичном двукратном введении прототипа живой сибиреязвенной вакцины, 57% — при однократном примировании. Показан также протективный эффект после интраназального заражения мышат линии A/J 100 MLD *B. anthracis* Sterne. У животных, примированных двукратно *S. typhi* Ty21a(PA) и получивших бустерную

инъекцию рПА, наблюдали лишь слабовыраженные признаки заболевания, которые исчезали к 9 дню наблюдения. Все иммунизированные мыши выжили, в то время как летальность в интактной группе составила 100% [40].

Повышение безопасности живых вакцин на основе штаммов *Salmonella* достигается путем применения современных методик, с одной стороны, облегчающих отбор трансформантов, с другой стороны, позволяющих избежать включения маркеров антибиотикорезистентности. Galen J. et al. [12] разработали и апробировали систему селекции, основанную на необходимом для обеспечения жизнедеятельности клетки белке SSB (белок, связывающий одноцепочечную ДНК). Включение последовательности, кодирующей данный белок, в плазмидную ДНК делает плазмиду абсолютно необходимой для трансформированного вектора, а ее потеря становится губительной/летальной. В качестве платформы использовали *S. enterica* serovar Typhi, штаммы CVD908 и его производный CVD908htrA. Иммуногенность предлагаемых конструкций проверяли по титрам специфических и токсин-нейтрализующих антител в сыворотках мышей линии BALB/c, которых иммунизировали интраназально двукратно в дозе $2,5 \cdot 10^9$ КОЕ, бустерную иммунизацию проводили адсорбированным рПА. Максимальные титры специфических антител наблюдали при иммунизации штаммом *S. typhi* CVD908ssb, содержащим низкокопийную плазмиду — GMT 4929 до бустерной инъекции, постбустерное значение — GMT 500790. Уровень антител в сыворотках крови животных, *S. typhi* CVD908htrA с плазмидой с маркером устойчивости к канамицину, составили GMT 80 и GMT 13806, соответственно. Аналогичные тенденции прослеживались при анализе результатов теста определения титров токсин-нейтрализующих антител.

В работе Leckenby M. et al. [25] была предложена система на основе мутации хромосомного гена *dapD*, необходимого для стабилизации пептидогликана клеточной стенки. При конструировании штаммов нативный *dapD* промотор заменялся лактозным репрессором и оператором/промотором (*lacO/P*). После трансформации вектора мульткопийной плазмидой с *lac* оператором репрессор связывался с плазмидным *lacO*, таким образом, подавляя *dapD*, что дает возможность для роста и селекции трансформантов. Для оценки иммунизирующей активности применили трехкратную пероральную иммунизацию мышей линии A/J дозой $1 - 5 \cdot 10^8$ КОЕ генно-инженерными штаммами *S. enterica* serovar Typhimurium Zoosaloral H. Дополнительно мышам сделали бустерную инъекцию рПА. Заражение проводили интраперитонеально *B. anthracis* СТИ в дозе $5 \cdot 10^4$ спор (50 ЛД₅₀). Введение в штамм *Salmonella* стабилизированной плазмиды, несущей ген синтеза ПА83, приводило к выраженному синтезу специфических антител и защите 85% биомоделей от заражения.

Привлекательной основой для создания пероральных вакцин являются представители рода *Lactobacillus*. Препараты, содержащие лактобациллы, широко используются в качестве пробиотиков, они безопасны, не вызывают побочных реакций [32]. Сиквенс генома лактобацилл не выявил детерминант, кодирующих факторы патогенности и антибиотикорезистентности. Немаловажно, что лактобациллы способны выживать в кислой среде желудка. Помимо этого, доказаны их адьювантные свойства [52]. Клетки *Lactobacillus* содержат иммуностимулирующие компоненты, в том числе липотейхоевую кислоту и метилированную ДНК, которые способны влиять на экспрессию рецепторов врожденного иммунитета (толл-подобные рецепторы, NOD-рецепторы и пр.), располагающиеся на различных клетках, в том числе, дендритных клетках [18, 35, 45]. При иммунизации живыми рекомбинантными вакцинами на основе лактобацилл активируется и интестинальный, и системный иммунитет [38]. Аппликация лактобацилл на слизистые оболочки приводит к усилению продукции IgA.

Эффективность иммунизации препаратами на основе пробиотических микро-

организмов значительно увеличивается при использовании оригинальной стратегии доставки антигенов при помощи пептида, связывающего дендритные клетки [32]. Активация антиген-презентирующих дендритных клеток приводит к усиленной секреции провоспалительных цитокинов, привлечению Т-лимфоцитов и развитию В-клеточного ответа [36, 42, 50]. По мнению группы исследователей, использование пробиотических микроорганизмов, в частности, лактобацилл в качестве транспорта для доставки фьюжн-антигена усиливает презентацию компонентов вакцины дендритным клеткам и вызывает выраженный мукозальный иммунный ответ [31, 32].

В частности, показана эффективность штаммов *L. acidophilus*, экспрессирующих ПА, соединенный с пептидом, связывающим дендритные клетки (фьюжн-ПА). Экспериментальное подтверждение безопасности и протективности было получено на мышах линии A/J. Животным проводили комплекс инъекций экспрессирующего ПА штамма *L. acidophilus* NCFM. Первично вводили трехкратно перорально 10^9 КОЕ прототипа вакцины, через 2 недели проводили две бустерные иммунизации. Регистрировали выраженную активацию мукозальных антиген-презентирующих клеток (в частности, дендритных клеток), индукцию синтеза токсин-нейтрализующих антител, индукцию гуморального и Т-клеточного иммунного ответа, стимуляцию иммунного ответа в слизистой оболочке кишечника, высвобождение провоспалительных цитокинов дендритными клетками и макрофагами, повышение экспрессии генов патоген-распознающих рецепторов. Титры токсин-нейтрализующих антител и уровень IgA-экспрессирующих клеток были сопоставимы с показателями у мышей в группе сравнения, иммунизированных подкожно однократно адсорбированным рПА. Иммунизация биомоделей рекомбинантным штаммом *L. acidophilus* NCFM обеспечивала защиту 75% мышей (выжили 12 из 16 животных) от гибели после интраперитонеального заражения токсигенным бескапсульным штаммом *B. anthracis* Sterne в дозе $5 \cdot 10^4$ спор. Протективный потенциал не уступал защитной эффективности рПА [33].

Оптимизировать схему иммунизации позволило использование для экспрессии фьюжн-ПА высококопийной плазмиды, которая была встроена в штамм *L. gasseri*. Четырехкратная пероральная иммунизация дозой 10^8 КОЕ рекомбинантного штамма привела к 100% защите линейных мышей от заражения штаммом *B. anthracis* Sterne в дозе $5 \cdot 10^4$ спор. Хороший защитный эффект обусловлен, по мнению авторов, выраженной активацией гуморального и клеточного иммунного ответа [34]. Способность генно-инженерных штаммов *L. gasseri*, экспрессирующих ПА с пептидом, связывающим дендритные клетки, активировать интестинальный и системный иммунный ответ показана также в работе Kathania M. et al. [19]. Пероральное введение мышам C57BL/6 рекомбинантного штамма в дозах 10^7 , 10^9 и 10^{12} КОЕ стимулировало местный иммунный ответ в кишечнике, активацию клеток врожденной иммунной системы, включая дендритные клетки, что, в свою очередь, приводило к выраженному Т-клеточному иммунному ответу. Под влиянием экспрессирующего вектора *L. gasseri* происходило фенотипическое созревание дендритных клеток, а также высвобождение провоспалительных цитокинов дендритными клетками и макрофагами. Отмечалось усиление гуморального звена иммунного ответа и повышение экспрессии генов патоген-распознающих рецепторов врожденного иммунитета, включая толл-подобные рецепторы и NOD-подобные рецепторы. Необходимо отметить, что даже большие дозы *L. gasseri*, экспрессирующей фьюжн-ПА (10^{12} КОЕ), не были токсичны для мышей.

Конструирование эффективных и безопасных живых сибиреязвенных вакцин возможно на основе вирусных векторов. Сообщалось об экспрессии полноразмерного ПА и его отдельных доменов в различных вирусных векторах или частях, таких как вирус гриппа, вирус Синдбис, капсид бактериофага T4, вирус ко-

ровей оспы, частицы репликона вируса венесуэльского энцефалита лошадей. [17, 24, 26, 27, 44, 49]. Тем не менее, самой распространенной платформой для конструирования прототипов сибиреязвенных вакцин являются аденовирусы. Как правило, аденовирусы безопасны для здоровья человека даже при использовании в высоких дозах. Аденовирусы стимулируют быстрое развитие выраженного гуморального и цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа, при этом не требуя введения в вакцинную композицию дополнительных иммуностимуляторов [48]. Простота структуры генома аденовирусов позволяет легко осуществлять генетические манипуляции, в том числе, создавать нереплицирующиеся формы, включать кодирующие последовательности любых антигенов, изменять серотип аденовирусов с целью преодоления предсуществующего иммунитета. Использование современных технологий позволяет создавать вакцинные препараты на основе аденовирусов, не теряющие иммуногенных свойств при хранении при 4 — 45°C [3].

При конструировании вакцин, защищающих от сибиреязвенной инфекции, предпринимались попытки клонирования как полной молекулы ПА, так и домена 4 ПА в аденовирусные векторы. Результаты оценки эффективности генно-инженерных конструкций, кодирующих синтез домена 4 ПА, представлены в работах McConnell M. et al. [29, 30]. В сыворотках крови мышей BALB/c, иммунизированных двукратно внутримышечно различными дозами препарата ($1 \cdot 10^7$, $1 \cdot 10^8$, $1 \cdot 10^9$ вирусных частиц), детектировали выраженный уровень анти-ПА антител, сопоставимый с таковым после иммунизации лицензированной химической сибиреязвенной вакциной. Для заражения использовали летальный токсин в дозе 4 ЛД₅₀. В группе мышей, иммунизированных максимальной в данном опыте дозой $1 \cdot 10^9$ вирусных частиц, выжило 67% биомоделей [30]. Сконструированный штамм предложено использовать для бустерной иммунизации, что приводит к значительному повышению уровня специфических антител и 100% выживаемости экспериментальных животных после заражения спорами вакцинного штамма *V. anthracis* Sterne в дозе $8,1 \cdot 10^4$ (73,5 ЛД₅₀) [29].

Tan Y. et al. [47] клонировали в состав дефектного по репликации аденовируса 5 серотипа (Ad5) полноразмерный ген *pag*, кодирующий синтез ПА83. Установлено, что однократная внутримышечная инъекция дозы 10^9 вирусных частиц приводит к выраженному антителообразованию и обеспечивает в 2,7 раза более эффективную защиту от заражения летальным токсином по сравнению с протективностью рПА, адсорбированного на альгидрогеле. В работе, опубликованной той же группой авторов в 2005 году [16], в качестве вектора был выбран вирус другого серотипа — AdC7, что обусловлено наличием у 35 — 50% людей так называемых предсуществующих антител к Ad5. Иммунизирующую эффективность сконструированного штамма тестировали на мышах, имеющих иммунитет к Ad5. Биомоделей иммунизировали однократно внутримышечно различными дозами генно-инженерного прототипа — 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} вирусных частиц. В сыворотках крови животных обнаружили высокие титры нейтрализующих антител. Степень защиты от заражения летальным токсином зависела от иммунизирующей дозы. Введение 10^{10} и 10^{11} вирусных частиц обеспечивало защиту 100 % биомоделей от внутривенного введения летального токсина возбудителя сибирской язвы.

По мнению Zhang J. et al. [55], преодолеть барьер предсуществующего иммунитета возможно путем интраназальной иммунизации. Однократная интраназальная инокуляция Ad5, экспрессирующего ПА, в дозе 10^7 вирусных частиц приводила к защите всех иммунизированных мышей линии A/J от интраназального заражения 50 ЛД₅₀ *V. anthracis* Sterne. Исследование бронхо-альвеолярной жидкости с помощью ИФА показало, что интраназальная вакцинация индуцировала выраженный синтез специфических иммуноглобулинов класса А. Специфические антитела к ПА в сыворотках иммунизированных животных де-

тектировались в течение 1 года наблюдения. В этой же работе показано, что частичную защиту (30 — 40% животных) от заражения споровой культурой обеспечивал аденовирус 5 серотипа, кодирующий ЛФ возбудителя сибирской язвы.

Потенциал ЛФ как дополнительного иммуногена был продемонстрирован и в работе Liu T. et al. [28]. В данном случае последовательности, кодирующие фрагмент ПАБЗ или ЛФ клонировали в состав адено-ассоциированного вируса 1 типа (rAAV1). При этом последовательность ЛФ содержала мутацию, препятствующую связыванию его с ПА и образованию токсичного комплекса. В качестве биомоделей использовали белых новозеландских кроликов, которым проводили однократную внутримышечную иммунизацию рекомбинантными штаммами в дозе $3 \cdot 10^{11}$. По результатам иммунологических тестов (ИФА и тест токсин-нейтрализации) иммунный ответ достигал пика на 8 неделе после иммунизации и оставался на достаточно высоком уровне до окончания срока наблюдения — 5 месяцев. Отмечалось, что нарастание титров анти-ЛФ антител начиналось в более ранние сроки по сравнению с антителами к ПА.

Рекомбинантные аденовирусы, кодирующие синтез полной молекулы ПА, способны обеспечивать защиту и от ингаляционного заражения вирулентными сибиреязвенными штаммами. Новозеландских белых кроликов однократно интраназально иммунизировали дефектным по репликации аденовирусом 5 серотипа, экспрессирующим ПА, в дозах $7,5 \cdot 10^7$, $1,5 \cdot 10^9$, $3,5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц. Выживаемость биомоделей после ингаляционного заражения 200 ЛД₅₀ спор высоковирулентного штамма *V. anthracis* Ames составила 97 — 100% [22].

Оригинальная разработка сибиреязвенной вакцины на основе вирусного вектора была предложена отечественными учеными. Созданный ими рекомбинантный аденовирус содержал фьюжн-белок, состоящий из домена 4 ПА и Fc-фрагмента Ig2a. По мнению авторов, вследствие непосредственного взаимодействия Fc-фрагмента с рецепторами клеток иммунной системы макроорганизма подобная конструкция должна стимулировать развитие выраженного клеточного и гуморального иммунного ответа. Показано, что двукратная интраназальная иммунизация $4,6 \cdot 10^9$ вирусных частиц вектора, экспрессирующего слитный белок, надежно защищала мышей линии BALB/c от внутрибрюшинного заражения 4 ЛД₅₀ бескапсульного штамма *V. anthracis* Sterne [43].

Таким образом, актуальная задача создания современных безопасных и высокоэффективных средств специфической профилактики сибирской язвы реализуется с применением широкого спектра методических приемов, генно-инженерных манипуляций. Важное значение в рациональном дизайне вакцин имеет подбор оптимальных элементов вакцинного препарата — штамма-основы, рекомбинантных плазмид, системы экспорта протеинов. Использование в качестве платформы непатогенных или вакцинных штаммов микроорганизмов и вирусов, пробиотических культур обуславливает безвредность прототипов вакцин и возможность их применения для иммунизации лиц с изменениями иммунного статуса. Иммуногенность и протективность таких препаратов определяется наличием дополнительных систем, позволяющих обеспечить успешный контакт иммуногена с эффекторными клетками иммунной системы макроорганизма. Путь введения — интраназальный или пероральный — определяет развитие реакции со стороны лимфоидных образований слизистых оболочек, а также выраженную активацию врожденного иммунитета и последующий запуск клеточных и гуморальных механизмов иммунной системы. Испытания на лабораторных животных достоверно демонстрируют эффективность прототипов живых сибиреязвенных вакцин на основе штаммов микроорганизмов родов *Salmonella*, *Lactobacillus*, аденовирусов, в том числе в схемах иммунизации, подразумевающих примирование вакцинными штаммами и бустерную иммунизацию рекомбинантным протективным антигеном.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микшис Н.И., Попова П.Ю., Кудрявцева О.М., Семакова А.П., Новикова Л.В., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Шуковская Т.Н., Попов Ю.А., Кутырев В.В. Иммуногенность и безопасность прототипа химической сибиреязвенной вакцины на модели лабораторных животных. *Журн. микробиол.* 2014, 4: 22-30.
2. Abboud N., Casadevall A. Immunogenicity of *Bacillus anthracis* protective antigen domains and efficacy of elicited antibody responses depend on host genetic background. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008, 15 (7): 1115-1123.
3. Alcock R., Cottingham M., Rollier C. et al. Long-term thermostabilization of live poxviral and adenoviral vaccine vectors at supraphysiological temperatures in carbohydrate glass. *Sci. Transl. Med.* 2010, 2: 19ra12.
4. Alemayehu D., Utt E., Knirsch C. Vaccines: A review of immune-based interventions to prevent and treat disease. *J. Clinical Pharmacology.* 2015, 55 (S3): S93-S102.
5. Baillie L., Rodriguez A., Moore S. et al. Towards a human oral vaccine for anthrax: the utility of a *Salmonella typhi* Ty21a-based prime boost immunization strategy. *Vaccine.* 2008, 26 (48): 6083-6091.
6. Beierlein J., Anderson A. New developments in vaccines, inhibitors of anthrax toxins, and antibiotic therapeutics for *Bacillus anthracis*. *Curr. Med. Chem.* 2011, 18 (33): 5083-5094.
7. Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunol. Rev.* 2011, 239 (1): 221-236.
8. Flick-Smith H., Walker N., Gibson P. et al. A recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of *Bacillus anthracis* protects mice against anthrax infection. *Infect. Immun.* 2002, 70 (3): 1653-1656.
9. Galen J., Pasetti M., Tennant S. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines finally come of age. *Immunol. Cell Biol.* 2009, 87 (5): 400-412.
10. Galen J., Chinchilla M., Pasetti M. et al. Mucosal immunization with attenuated *Salmonella typhi* expressing anthrax PA83 primes monkeys for accelerated serum antibody responses to parenteral PA83 vaccine. *J. Infect. Dis.* 2009, 199 (3): 326-335.
11. Galen J., Curtiss R. The delicate balance in genetically engineering live vaccines. *Vaccine.* 2014, 32 (35): 4376-4385.
12. Galen J., Wang J., Chinchilla M. et al. A new generation of stable, nonantibiotic, low-copy-number plasmids improves immune responses to foreign antigens in *Salmonella enterica* serovar Typhi live vectors. *Infect. Immun.* 2010, 78 (1): 337-347.
13. Galen J., Zhao L., Chinchilla M. et al. Adaptation of the endogenous *Salmonella enterica* serovar Typhi *clyA*-encoded hemolysin for antigen export enhances the immunogenicity of anthrax protective antigen domain 4 expressed by the attenuated live-vector vaccine strain CVD 908-htrA. *Infect. Immun.* 2004, 72 (12): 7096-7106.
14. Garmory H., Titball R., Griffin K. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing a chromosomally integrated copy of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene protects mice against an anthrax spore challenge. *Infect. Immun.* 2003, 71 (7): 3831-3836.
15. Germanier R., Fürer E. Characteristics of the attenuated oral vaccine strain *S. typhi* Ty 21a. *Dev. Biol. Stand.* 1983, 53: 3-7.
16. Hashimoto M., Boyer J., Hackett N. et al. Induction of protective immunity to anthrax lethal toxin with a nonhuman primate adenovirus-based vaccine in the presence of preexisting anti-human adenovirus immunity. *Infect. Immun.* 2005, 73 (10): 6885-6891.
17. Iacono-Connors L., Welkos S., Ivins B., Dalrymple J. Protection against anthrax with recombinant virus-expressed protective antigen in experimental animals. *Infect. Immun.* 1991, 59 (6): 1961-1965.
18. Kalina W., Mohamadzadeh M. Lactobacilli as natural enhancer of cellular immune response. *Discov. Med.* 2005, 5 (26): 199-203.
19. Kathania M., Zadeh M., Lightfoot Y. et al. Colonic immune stimulation by targeted oral vaccine. *PLOS ONE.* 2013, 8 (1): e55143.
20. Kaur M., Bhatnagar R. Recent progress in the development of anthrax vaccines. *Recent Pat. Biotechnol.* 2011, 5 (3): 148-159.
21. Kaur M., Singh S., Bhatnagar R. Anthrax vaccines: present status and future prospects. *Expert Rev. Vaccines.* 2013, 12 (8): 955-970.

22. Krishnan V., Andersen B., Shoemaker C. et al. Efficacy and immunogenicity of single dose AdVAV intranasal anthrax vaccine compared to anthrax vaccine absorbed in a rabbit aerosolized spore challenge model. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015, 22 (4): 430-439.
23. Lamichhane A., Azegamia T., Kiyono H. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine.* 2014, 32 (49): 6711-6723.
24. Langley W., Bradley K., Li Z. et al. Induction of neutralizing antibody responses to anthrax protective antigen by using influenza virus vectors: implications for disparate immune system priming pathways. *J. Virol.* 2010, 84 (16): 8300-8307.
25. Leckenby M., Spear A., Neeson B. et al. Enhanced vaccine antigen delivery by *Salmonella* using antibiotic-free operator-repressor titration-based plasmid stabilisation compared to chromosomal integration. *Microbial Pathogenesis.* 2009, 46: 201-206.
26. Lee J., Groebner J., Hadjipanayis A. et al. Multiagent vaccines vectored by Venezuelan equine encephalitis virus replicon elicits immune responses to Marburg virus and protection against anthrax and botulinum neurotoxin in mice. *Vaccine.* 2006, 24 (47-48): 6886-6892.
27. Lee J., Hadjipanayis A., Welkos S. Venezuelan equine encephalitis virus-vectored vaccines protect mice against anthrax spore challenge. *Infect. Immun.* 2003, 71 (3): 1491-1496.
28. Liu T., Oscherwitz J., Schnepf B. et al. Genetic vaccines for anthrax based on recombinant adeno-associated virus vectors. *Molecular Therapy.* 2009, 17 (2): 373-379.
29. McConnell M., Hanna P., Imperiale M. Adenovirus-based prime-boost immunization for rapid vaccination against anthrax. *Molecular Therapy.* 2007, 15 (1): 203-210.
30. McConnell M., Hanna P., Imperiale M. Cytokine response and survival of mice immunized with an adenovirus expressing *Bacillus anthracis* protective antigen domain 4. *Infect. Immun.* 2006, 74 (2): 1009-1015.
31. Mohamadzadeh M. Induction of protective immunity against microbial challenge by targeting antigens expressed by probiotic bacteria to mucosal dendritic cells. *Curr. HIV Res.* 2010, 8 (4): 323-329.
32. Mohamadzadeh M., Duong T., Hoover T. Targeting mucosal dendritic cells with microbial antigens from probiotic lactic acid bacteria. *Expert Rev. Vaccines.* 2008, 7 (2):163-174.
33. Mohamadzadeh M., Duong T., Sandwick S. et al. Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge. *PNAS.* 2009, 106 (11): 4331-4336.
34. Mohamadzadeh M., Durmaz E., Zadeh M. , Targeted expression of anthrax protective antigen by *Lactobacillus gasseri* as an anthrax vaccine. *Future Microbiol.* 2010, 5 (8): 1289-1296.
35. Mohamadzadeh M., Klaenhammer T. Specific *Lactobacillus* species differentially activate Toll-like receptors and downstream signals in dendritic cells. *Expert Rev. Vaccines.* 2008, 7 (8): 1155-1164.
36. Mohamadzadeh M., Olson S., Kalina W. *Lactobacilli* activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, 102 (8): 2880-2885.
37. Osorio M., Wu Y., Singh S. Anthrax protective antigen delivered by *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a protects mice from a lethal anthrax spore challenge. *Infect. Immun.* 2009, 77 (4): 1475-1482.
38. Owen J., Sahay B., Mohamadzadeh M. New generation of oral mucosal vaccines targeting dendritic cells. *Curr. Op. Chemical Biology.* 2013, 17: 1-7.
39. Petosa C., Collier R., Klimpel K. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature.* 1997, 385: 833-838.
40. Ramirez K., Ditamo Y., Galen J. Mucosal priming of newborn mice with *S. typhi* Ty21a expressing anthrax protective antigen (PA) followed by parenteral PA-boost induces B and T cell-mediated immunity that protects against infection by passing maternal antibodies. *Vaccine.* 2010, 28 (37): 6065-6075.
41. Rose M. Mucosal immunization in perspective. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014, 10 (7): 2115-2117.
42. Sahay B., Owen J., Yang T. Activation of B-cells by a dendritic cell-targeted oral vaccine. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2013, 14 (10): 867-877.
43. Shcherbinin D., Esmagambetov I., Noskov A. Protective immune response against *Bacillus anthracis* induced by intranasal introduction of a recombinant adenovirus expressing the protective antigen fused to the Fc-fragment of IgG2a. *Acta Naturae.* 2014, 6 (1): 76-84.

44. Shivachandra S., Rao M., Janosi L. et al. In vitro binding of anthrax protective antigen on bacteriophage T4 capsid surface through Hoc-capsid interactions: a strategy for efficient display of large full-length proteins. *Virology*. 2006, 345 (1): 190-198.
45. Stoeker L., Nordone S., Gunderson S. et al. Assessment of *Lactobacillus gasseri* as a candidate oral vaccine vector. *Clin. Vacc. Immunol.* 2011, 18 (11): 1834-1844.
46. Stokes M., Titball R., Neeson B. et al. Oral administration of a *Salmonella enterica*-based vaccine expressing *Bacillus anthracis* protective antigen confers protection against aerosolized *B. anthracis*. *Infect. Immun.* 2007, 75 (4): 1827-1834.
47. Tan Y., Hackett N., Boyer J., Crystal R. Protective immunity evoked against anthrax lethal toxin after a single intramuscular administration of an adenovirus-based vaccine encoding humanized protective antigen. *Hum. Gene Ther.* 2003, 14 (17): 1673-1682.
48. Tatsis N., Ertl H. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol. Therapy*. 2004, 10 (4): 616-629.
49. Thomas J., Moen S., Gnade B. et al. Recombinant Sindbis virus vectors designed to express protective antigen of *Bacillus anthracis* protect animals from anthrax and display synergy with ciprofloxacin. *Clin. Vacc. Immunol.* 2009, 16 (11): 1696-1699.
50. Tournier J., Mohamadzadeh M. Key roles of dendritic cells in lung infection and improving anthrax vaccines. *Trends Mol. Med.* 2010, 16 (7): 303-312.
51. Wang M., Gao Z., Zhang Z. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014, 10 (12): 3544-3551.
52. Wells J. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microbial. Cell Factories*. 2011, 10 (Suppl 1): S17.
53. Xu D., Cisar J., Poly F. Genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhi oral vaccine strain Ty21a. *Genome Announc.* 2013, 1 (4): e00650-13.
54. Zhang J., Jex E., Feng T. et al. An adenovirus-vectored nasal vaccine confers rapid and sustained protection against anthrax in a single-dose regimen. *Clin. Vacc. Immunol.* 2013, 20 (1): 1-8.

Поступила 15.06.15

Контактная информация: Попова Полина Юрьевна, к.м.н.,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (845-2)26-21-31

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Г.Г.Онищенко¹, А.Ю.Попова², В.В.Кутырев³, Н.И.Смирнова³,
С.А.Щербакова³, Э.А.Москвитина⁴, С.В.Титова⁴*

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА, ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ХОЛЕРЫ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

¹Российская академия наук, Москва; ²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва; ³Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов; ⁴Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Обсуждаются основные проблемы действующей в Российской Федерации системы эпидемиологического надзора за холерой, а также лабораторной диагностики и вакцинопрофилактики этой особо опасной инфекции, которые возникли в современный период текущей 7 пандемии холеры. Рассматриваются также особенности генома природных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, имеющих потенциальную эпидемическую опасность, а также вопросы, возникшие при выделении таких штаммов из проб воды поверхностных водоемов при их мониторинге. Основные направления совершенствования системы эпидемиологического надзора за холерой состоят в разработке нового алгоритма дифференциации административных территорий РФ по типам эпидемических проявлений, а также оптимизации мониторинга объектов окружающей среды. Для повышения эффективности проводимой оперативной и ретроспективной диагностики в современный период необходимо внедрение в практику современных высокоинформативных техноло-

гий, а также разработка диагностических препаратов нового поколения на основе ДНК-чипов и иммуночипов. Требуется также создание отечественной холерной вакцины, обеспечивающей одновременную защиту от возбудителя холеры как O1, так и O139 серогруппы.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 89—101

Ключевые слова: холера, эпидемиологический надзор, районирование, мониторинг вибриофлоры, потенциально эпидемически опасные штаммы, SNR-типирование, лабораторная диагностика, мультилокусные ПЦР тест-системы, холерные вакцины

G.G.Onischenko¹, A.Yu.Popova², V.V.Kutyrev³, N.I.Smirnova³,
S.A.Scherbakova³, E.A.Moskvitina⁴, S.V.Titova⁴

ACTUAL PROBLEMS OF EPIDEMIOLOGIC CONTROL, LABORATORY DIAGNOSTICS AND PROPHYLAXIS OF CHOLERA IN RUSSIAN FEDERATION

¹Russian Academy of Sciences, Moscow; ²Federal Service for Surveillance on Consumer Rights' Protection and Human Wellbeing, Moscow; ³Russian Research Institute for Plague Control «Microbe», Saratov; ⁴Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

Main problems of system of epidemiologic control for cholera active in Russian Federation, as well as laboratory diagnostics and vaccine prophylaxis of this especially dangerous infection, that had emerged in the contemporary period of the ongoing 7th pandemic of cholera, are discussed. Features of the genome of natural strains of *Vibrio cholerae* of *El Tor* biovar, that possess a potential epidemic threat, as well as problems, that have emerged during isolation of these strains from samples of water of surface water bodies during their monitoring, are also examined. The main direction of enhancement of the system of epidemiologic control for cholera consist in development of a new algorithm of differentiation of administrative territories of Russian Federation by types of epidemic manifestations, as well as optimization of monitoring of environment objects. Integration of modern highly informative technologies into practice, as well as development of new generation diagnostic preparations based on DNA-chips and immunechips is necessary to increase effectiveness of the conducted operative and retrospective diagnostics in the contemporary period. Creation of national cholera vaccine, ensuring simultaneous protection from cholera causative agents of both O1 and O139 serogroups, is also required.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 89—101

Key words: cholera, epidemiologic control, zoning, vibrioflora monitoring, potentially epidemic dangerous strains, SNR-typing, laboratory diagnostics, multilocus PCR test systems, cholera vaccines

Продолжающиеся эпидемические вспышки и крупные эпидемии холеры в Юго-Восточной Азии, Африке и Америке, наносящие значительный социально-экономический ущерб, свидетельствуют о том, что холера остается одной из приоритетных проблем мирового здравоохранения [4, 14, 15, 20, 33, 50]. Сформированные на этих континентах эндемичные очаги холеры представляют реальную угрозу выноса инфекции за их пределы. Обострение эпидемиологической ситуации по холере в мире обусловлено не только природными и социальными факторами, способствующими активизации эпидемического процесса, но и возникновением в последние два десятилетия новых высокопатогенных геновариантов возбудителя холеры Эль Тор (*Vibrio cholerae* O1 серогруппы Эль Тор биовара) с множественной лекарственной устойчивостью. Глобальное распространение таких измененных штаммов возбудителя, содержащих в составе профага СТХф аллель гена В-субъединицы холерного токсина *V. cholerae* классического биовара, приводит к возникновению затянувшихся вспышек с тяжелым

клиническим течением заболевания [34, 36, 41, 47, 51]. Одним из ярких примеров такой ситуации является продолжающаяся более пяти лет эпидемическая вспышка холеры в Гаити, вызванная занесенным из Непала геновариантом возбудителя холеры Эль Тор [37, 47, 52]. Согласно официальным данным экспертов ВОЗ за более чем 50-летний период (1961 — 2014 гг.) зарегистрировано 7 652 480 случаев холеры в мире, однако реальная заболеваемость может быть значительно выше [25].

Активизация миграционных процессов, увеличение товарооборота, наличие общих границ с неблагополучными по холере странами — все это определяет реальную возможность заноса этой инфекции на территорию Российской Федерации. Непосредственным напоминанием об этой угрозе являются эпидемические вспышки или выявленные единичные случаи холеры в Дагестане (1994 г., 1998 г.), Татарстане (2001 г.), Башкортостане (2004 г.), России (Мурманск, 2006 г.; Москва, 2005, 2010, 2012, 2014 гг.) [22, 25, 30]. Штаммы, выделенные от заболевших, являются высокопатогенными вариантами возбудителя холеры Эль Тор, характерными для эндемичных по холере стран Юго-Восточной Азии [30]. Особую тревогу вызывает обнаружение высокопатогенных вариантов возбудителя холеры в объектах окружающей среды. Так, при мониторинге вибриофлоры поверхностных водоемов в 2005 — 2014 гг. из проб речной (2005, Санкт-Петербург; 2014, Ростов-на-Дону) и морской (2011, Таганрог) воды было выделено три эпидемически опасных штамма *V.cholerae* биовара Эль Тор, содержащих гены ключевых факторов патогенности — холерного токсина (*ctxAB*⁺), определяющего развитие диареи, и токсинорегулируемых пилей (*tcrA*⁺), обеспечивающих колонизацию вибрионами тонкого кишечника человека [39, 42]. Секвенирование полных геномов двух из них, изолированных в Ростовской области, показало, что они относятся к новым геновариантам, совмещающим свойства возбудителя холеры двух биоваров — классического и Эль Тор. На основании ретроспективного эпидемиологического анализа установлено, что за последние 25 лет (1990 — 2014 гг.) в России было зарегистрировано более 3200 больных холерой и вибрионосителей [25].

Эпидемиологический надзор. Для своевременной организации противоэпидемической работы в России была разработана система эпидемиологического надзора за холерой. Надзор включает в себя комплекс санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на своевременное выявление заносных случаев холеры, установление возможных источников контаминации поверхностных водоемов и предотвращение распространения этой инфекции на территории Российской Федерации [6, 13, 27, 28]. Эффективность эпиднадзора зависит от своевременного обеспечения системы контроля информацией, необходимой для коррекции стратегии профилактической деятельности и разработки прогнозов эпидемиологической ситуации. В этой связи, в настоящее время одним из важных компонентов надзора является использование созданных проблемно-ориентированных баз данных «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в мире», «Холера Эль-Тор. Мир. Административные территории», «Холера Эль Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в СНГ, России», а также геоинформационной системы (ГИС) «Холера-Интернет» в онлайн формате, содержащей данные о генетических свойствах штаммов холерного вибриона. Такая ГИС позволяет в режиме реального времени проводить анализ распределения генотипов выделяемых штаммов холерного вибриона во времени и по территориям [19, 20, 25]. Внедрение в практику разработанной системы эпидемиологического надзора имело решающее значение для обеспечения благополучия по холере в стране. Следует отметить, что цель, задачи и основные принципы эпидемиологического надзора за холерой в России согласуются с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) и отвечают между-

народным требованиям и нормам [16]. Вместе с тем, возросшие в современный период потенциальные и реальные риск и угроза осложнения ситуации по холере указывают на необходимость дальнейшего совершенствования системы эпидемиологического надзора.

Принципиально важным и оправданным в системе эпидемиологического надзора стал разработанный впервые в 1990 г. принцип районирования территории нашей страны по типам эпидемических проявлений холеры с учетом опасности возникновения вспышек и распространения инфекции при ее заносе. Предложенный системный подход, учитывающий природно-климатические, санитарно-гигиенические и социальные условия, а также выраженность миграционных процессов, позволил выделить три основных типа территорий по степени опасности возникновения вспышек и распространения холеры (территории I типа, II типа подтипа А и Б, III типа подтипа А и Б) с соответствующей тактикой эпидемиологического надзора [2, 21, 24, 25]. Внедрение в практику принципа районирования территории страны с целью дифференциации объема проводимых профилактических и противоэпидемических мероприятий позволяет более рационально использовать силы и средства учреждений Роспотребнадзора при осуществлении эпидемиологического надзора. Более того, дифференциация территорий по эпидемическому потенциалу имеет очевидное значение при прогнозе эпидемиологической ситуации. Методика определения эпидемического потенциала административных территорий совершенствовалась с учетом эпидемиологической обстановки, введения новых показателей, характеризующих эпидемические проявления холеры, интенсивность миграции населения, условия водоснабжения и водопользования в соответствии с новыми СанПиН, микробиологических показателей, используемых в системе социально-гигиенического мониторинга, что являлось совершенствованием методологической платформы эпидемиологического надзора за холерой [27, 28].

Вместе с тем, с учетом изменения в последние десятилетия эпидемиологической обстановки по холере, социально-экономических и экологических условий необходимо совершенствование алгоритма определения эпидемического потенциала административных территорий Российской Федерации для отнесения к определенному типу эпидемических проявлений холеры с пересмотром районирования и определением соответствующей тактики эпидемиологического надзора.

Одним из важнейших звеньев эпидемиологического надзора являются целенаправленные исследования вибриофлоры проб воды поверхностных водоемов и сточных вод, прежде всего, для предупреждения водного пути распространения холеры в случае ее завоза. При проведении мониторинга выполняется огромный объем работ по бактериологическому исследованию проб из объектов окружающей среды с учетом типов территорий по эпидемическим проявлениям холеры. Вместе с тем, всесторонний анализ получаемых сведений показывает относительно низкую эффективность микробиологического мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов по сравнению с материальными затратами на его проведение. Так, при обследовании в 2010 — 2014 гг. из около 500 тыс. проб воды было выделено 345 штаммов *V. cholerae* O1серогруппы, что составило 0,07% от общего количества. Среди них токсигенные эпидемически опасные штаммы (ctxAB⁺tcpA⁺) составляют 0,58%, нетоксигенные потенциально эпидемически опасные (ctxAB⁻tcpA⁺) — 5,0%. Оптимизации системы микробиологического мониторинга может быть решена за счет внедрения в практику средств и методов, позволяющих увеличить объем исследуемых проб воды и осуществлять селективное концентрирование холерных вибрионов (в частности, «магнитных ловушек»). Кроме того, принимая во внимание тот факт, что значительная часть популяции холерных вибрионов в водной среде имеет симбиотические связи с гидробионтами план-

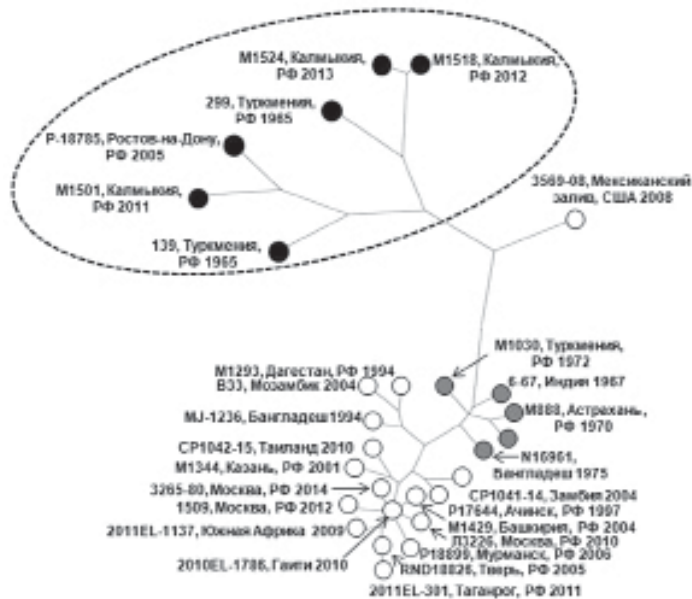
ктона (низшие ракообразные) или находится в составе биопленок [11, 43, 44, 53 — 56], необходимо увеличить количество исследуемых проб зоо- и фитопланктона по эпидпоказаниям. Перспективным является продолжение экспериментальных исследований по оценке роли биопленок холерного вибриона в длительной персистенции возбудителя в водных объектах на территории нашей страны. Полученная информация может быть также использована для оптимизации тактики надзора. К тому же, в зависимости от конкретной ситуации требуется и коррекция стационарных точек отбора воды и кратности ее исследования.

Следует отметить, что существует еще одна проблема, связанная с выделением в ряде регионов в эпидемически благополучный период из воды поверхностных водоемов нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, содержащих гены токсинорегулируемых пилей адгезии (ctxAB⁻tcrA⁺), которые не только обеспечивают колонизацию вибрионами тонкого кишечника человека, но и служат в качестве рецептора для фага СТХф [57]. Поскольку такие штаммы, имеющие указанные пилы, могут быть инфицированы фагом СТХф, несущим гены холерного токсина, их оценивают как штаммы, имеющие потенциальную эпидемическую опасность [45]. О существовании таких штаммов впервые стало известно в 1998 г. после обнаружения их S.M. Faruque et al. [40] среди нетоксигенных клинических изолятов на эндемичной по холере территории. Ранее нами было также показано, что среди исследованных штаммов, изолированных на территории Туркменистана, 42,9% вибрионосителей были инфицированы нетоксигенными штаммами, имеющими ген tcrA. Такие штаммы были обнаружены и в воде поверхностных водоемов, составляя 16,6% от числа изученных [29]. В последние годы штаммы, имеющие потенциальную опасность, были выделены в Ростовской области (2001 — 2002 гг., 2005 г.), в Хабаровском крае (2013 г.), в Республике Калмыкия (2007, 2011 — 2014 гг.) [7, 23]. Обнаружение в воде поверхностных водоемов Российской Федерации штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор с потенциальной эпидемической опасностью ставит ряд вопросов, на которые до сих пор не получены точные ответы. Каково их происхождение? Какова степень риска реверсии их в токсигенные и, следовательно, в эпидемически опасные штаммы на территории Российской Федерации? Есть ли необходимость проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий при выделении штаммов (ctxAB⁻tcrA⁺) из объектов внешней среды?

В этой связи, нами было проведено секвенирование геномов 3 изолированных в 2011 — 2013 гг. в Республике Калмыкия штаммов ctxAB⁻tcrA⁺ с последующим анализом полученных результатов. Сопоставление нуклеотидных последовательностей геномов референсного эпидемически опасного штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор N16961 и изучаемых штаммов показывает, что в геноме последних отсутствует протяженный участок ДНК, содержащий профаг СТХф с генами холерного токсина, а также профаг RS1φ с генами, усиливающими продукцию этого ключевого фактора патогенности. Вместе с тем в геноме штаммов с потенциальной эпидемической опасностью сохраняется специфический участок (attB-сайт) для внедрения СТХф в хромосому в случае инфицирования их этим фагом. Более того, исследуемые штаммы имеют все гены, необходимые для продукции токсинорегулируемых пилей, а также других дополнительных факторов патогенности. В то же время, в отличие от эпидемически опасных штаммов, вызвавших текущую 7 пандемию холеры, изученные штаммы ctxAB⁻tcrA⁺ лишены не только генов холерного токсина, но и полноценных островов пандемичности VSP-I и VSP-II, что обычно характерно для предпандемических штаммов, способных вызывать локальные вспышки, но не имеющих пандемического потенциала.

Далее, для установления филогенетических связей таких штаммов с другими нетоксигенными и токсигенными штаммами, выделенными в различные годы на разных территориях, было проведено их SNP-типирование (рис.). В результате

установлено, что штаммы $ctxAB^- tcpA^+$, изолированные на территории Республики Калмыкия, входят в состав клонального комплекса, содержащего потенциально эпидемически опасные штаммы, выделенные в других регионах России (Ростовская область, 2005 г. и Туркмения, 1965 г.), которые также не имеют полноценных островов пандемичности VSP-I и VSP-II. В то же время, штаммы $ctxAB^- tcpA^+$ генетически были удалены от всех исследованных токсигенных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, изолированных с 1966 по 2012 гг. как на территории РФ, так и за ее пределами (Юго-Восточная Азия, Африка, Америка).



Филогенетические связи потенциально эпидемически опасных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор $ctxAB^- tcpA^+$ с токсигенными эпидемически опасными штаммами *V. cholerae* биовара Эль Тор $ctxAB^+ tcpA^+$ (на основе SNP-типирования).

Пунктиром указан кластер штаммов $ctxAB^- tcpA^+$, имеющих потенциальную эпидемическую опасность.

Таким образом, показано, что потенциальная эпидемическая опасность выделенных штаммов $ctxAB^- tcpA^+$ обусловлена присутствием генов, кодирующих токсинрегулируемые пили, которые обеспечивают колонизацию тонкого кишечника и являются рецептором для фага СТХф, а также наличием в геноме нуклеотидной последовательности для встраивания профага СТХф. Однако точное происхождение потенциально эпидемически опасных штаммов остается неизвестным. Требуется исследование и вопрос о реальной способности штаммов $ctxAB^- tcpA^+$ приобретать профаг СТХф в окружающей среде на территории РФ. Для решения возникших проблем необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение экологии холерного вибриона с использованием современных методов. Так, одним из перспективных направлений, на наш взгляд, может быть выяснение сроков выживания возбудителя холеры в воде поверхностных водоемов в естественных условиях и изучение фенотипических и генетических изменений, которые претерпевает этот патоген под воздействием различных экологических факторов. Исследования в этом направлении проводились и раньше [5, 18], однако разработанные в настоящее время новые молекулярно-генетические и биохимические методы позволят расширить наши знания по экологии холерных вибрионов. На основании полученных результатов затем следует определить необходимость разработки комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий при выделении штаммов, имеющих потенциальную эпидемическую опасность.

Лабораторная диагностика холеры. Одним из ключевых этапов в системе эпидемиологического надзора является лабораторная диагностика холеры, которая осуществляется на основе традиционных микробиологических исследований с использованием основных идентификационных тестов, а также современных технологий. В отличие от зарубежных учреждений, в России разработан и внедрен

в практику трехуровневый порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры: территориальный, региональный и федеральный [17]. В лабораториях территориального и регионального уровня используют методические приемы, позволяющие выделять холерные вибрионы на селективных средах, определять их серогруппу, биовар, эпидемическую значимость и чувствительность к антибиотикам. Несомненным достижением является разработка и внедрение в практику новых отечественных генодиагностических тест-систем, основанных на использовании мультилокусной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Эти ПЦР тест-системы позволяют одновременно определять серогруппу, биовар и эпидемическую значимость холерных вибрионов [1]. Эффективность разработанных и зарегистрированных в России ПЦР тест-систем подтверждена при проведении анализа культур, выделенных во время эпидемических вспышек в Республике Дагестан (1994), Казани (2001) и при единичных завозах холеры.

В лабораториях федерального уровня используется разработанная и зарегистрированная в России мультилокусная ПЦР тест-система, позволяющая одновременно идентифицировать токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* классического и Эль Тор биоваров, а также дифференцировать Эль Тор вибрионы на типичные и высокопатогенные генетически измененные штаммы [31]. Кроме того, проводится секвенирование полных геномов штаммов возбудителя холеры Эль Тор, выделенных от больных и из объектов окружающей среды, для выяснения их происхождения. Так, совсем недавно была определена нуклеотидная последовательность полного генома токсигенного штамма *V. cholerae* 81 биовара Эль Тор серовара Инаба, выделенного из речной воды на территории Ростова-на-Дону в июле 2014 г. На основе биоинформационного анализа установлено, что штамм относится к геновариантам возбудителя холеры Эль Тор, имеющим повышенный эпидемический потенциал. Выявлено также, что этот штамм имеет близкое генетическое родство со штаммом *V. cholerae* 301 биовара Эль Тор серовара Инаба, изолированным из воды Таганрогского залива в 2011 г. [26]. Отсутствие существенных отличий между этим изолятом и эпидемически значимыми штаммами, выделенными в Бангладеш и США (завоз из Индии), указывает на возможный занос указанного штамма из стран Юго-Восточной Азии.

Таким образом, к настоящему времени в России создана эффективная система лабораторной диагностики холеры, которая полностью обеспечена отечественными диагностическими препаратами. Успешное использование методов геномной диагностики, позволяющих в максимально короткие сроки проводить индикацию и идентификацию возбудителя холеры, указывает на их ведущее значение при проведении исследований в лабораториях территориального и регионального уровня. Более того, внедрение в практику лабораторий федерального уровня полногеномного секвенирования штаммов холерного вибриона, выделенных на территории России, с последующим биоинформационным анализом полученных данных позволяет определить их филогенетические связи и установить возможный источник заноса инфекции.

Вместе с тем, очевидна необходимость оптимизации схемы лабораторной диагностики холеры, направленная на сокращение используемых методических приемов. В настоящее время в соответствии с МУК «Лабораторная диагностика холеры» [12] схема идентификации холерных вибрионов включает более 40 тестов, которые зачастую дублируют определяемый признак. Так, определение биовара выделенных штаммов холерных вибрионов осуществляется с помощью пяти различных методов, а установление их эпидемической значимости — четырех. На основании всестороннего анализа используемой до сих пор схемы, а также информативности каждого методического приема показана целесообразность сокращения применяемых методов до 12. В итоге предлагается включение в схему лабораторной диагностики холеры следующих тестов: выделение культуры холер-

ного вибриона на селективных средах; морфология клеток в мазке по Граму; определение индофенолоксидазы; определение антигенной структуры в реакциях слайд- и развернутой агглютинации, МФА (метод флуоресцирующих антител), ИХ (иммунохроматография); определение систематического положения (рода, вида) классическим методом или с использованием микрообъемных тест-систем; определение биовара методом ПЦР; определение эпидемической значимости методом ПЦР и гемолиза по Грейгу; определение чувствительности к антибактериальным препаратам.

Кроме того, в качестве дополнительных тестов предлагается секвенирование отдельных генов или полных геномов, проведение MALDI-TOF масс-спектрометрии [3, 32] и определение продукции холерного токсина с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) или дот-ИФА. В этой связи, необходимо разработать и зарегистрировать новые диагностические препараты, необходимые для осуществления исследований в соответствии с предлагаемой схемой: иммунохроматографические системы для выявления O1 и O139 антигенов холерных вибрионов в клиническом материале; набор реагентов для определения биовара холерных вибрионов вне зависимости от их токсигенности методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени; тест-систему для определения продукции холерного токсина штаммами холерных вибрионов методом ИФА или дот-ИФА. Более того, для проведения ретроспективной диагностики требуется создание тест-системы для определения антител к антигенам холерного вибриона, в том числе и к холерному токсину, методом ИФА.

Эффективность диагностики может быть повышена и за счет широкого внедрения в практику лабораторий федерального уровня современных высокоинформативных диагностических технологий, в частности MALDI-TOF масс-спектрометрии. Масс-спектрометрический анализ основан на предварительной ионизации атомов и молекул, входящих в состав пробы, разделении ионов исследуемого вещества в вакууме под действием 46 электрических и магнитных полей и регистрации результатов в виде масс-спектров [3, 32]. В настоящее время этот метод успешно используется в ряде учреждений Роспотребнадзора для быстрой идентификации холерных вибрионов и других микроорганизмов рода *Vibrio* [32]. Важным направлением в дальнейшей работе является также разработка и внедрение в практику диагностических препаратов нового поколения на основе ДНК-чипов, иммуночипов и нанотехнологий. Еще одно направление совершенствования молекулярной диагностики холеры — это создание национальной базы данных о генетических последовательностях различных штаммов возбудителя холеры на базе Государственных коллекций высокопатогенных микроорганизмов. Такая база данных об особенностях геномов штаммов, выделенных при разных эпидемических ситуациях, позволит повысить эффективность геномного анализа при решении ряда задач эпидемиологического надзора.

Не менее значимыми остаются вопросы комплементарности действующей нормативно-методической документации по эпидемиологическому надзору за холерой, однозначности трактовки полученных результатов исследований и принятия решений о проведении противоэпидемических мероприятий.

Вакцинопрофилактика. Неустойчивая эпидемиологическая обстановка по холере в мире и в России определяет необходимость разработки и производства современных и надежных национальных средств и методов специфической иммунопрофилактики холеры. Согласно официальной стратегии ВОЗ для предотвращения возникновения эпидемий холеры вне эндемичных территорий рекомендуется использование оральных холерных вакцин (ОХВ) для вакцинации контингентов с высоким риском инфицирования (население лагерей беженцев, лиц без определенного места жительства и т.д.), а также путешественников и туристов.

В настоящее время существуют две, получившие одобрение ВОЗ, оральные холерные вакцины.

Оральная холерная вакцина Ducoral® (WC/rBS) (SBL, Швеция), которая состоит из убитых клеток четырех штаммов *V. cholerae* O1 классического и Эль Тор биоваров, относящихся к сероварам Инаба или Огава, с рекомбинантной В-субъединицей холерного токсина [48, 49]. Эта вакцина обеспечивает некоторый уровень перекрестной защиты от энтеротоксигенных штаммов *Escherichia coli* (ETEC), что представляет дополнительное преимущество для путешественников. Согласно данным ВОЗ, полевые испытания в Бангладеш и Перу показали, что эта вакцина безопасна и обеспечивает 85% защиту в течение 4 — 6 месяцев во всех возрастных группах [46, 48]. Вакцина лицензирована более чем в 60 странах мира [48].

Оральная холерная вакцина Shanchol (Shantha Biotechnics, Индия), состоящая из убитых клеток четырех штаммов *V. cholerae* O1 классического и Эль Тор биоваров сероваров Инаба или Огава, также убитых клеток *V. cholerae* O139 серогруппы. Вакцина Shanchol обеспечивала защиту 67% привитых от холеры, вызванной клинически значимыми штаммами *V. cholerae* в эндемичных районах не менее чем в течение двух лет после вакцинации. Полевые испытания в Калькутте (Индия) показали протективную эффективность вакцины (65%) во всех возрастных группах [35]. Вакцина лицензирована в Индии, Филиппинах, Непале, Малайзии и Кот-д'Ивуаре. Доказано, что ОХВ безопасны, иммуногенны и эффективны. Обе вакцины использовались в кампаниях по массовой вакцинации, проводимых при поддержке ВОЗ (Южный Судан, Гаити, 2014 г.), что позволило получить новые свидетельства в пользу применения оральных противохолерных вакцин в качестве дополнительного средства защиты населения, подвергающегося высокому риску инфицирования возбудителем холеры [48, 38].

В Российской Федерации на базе РосНИПЧИ «Микроб» имеется лицензированное на национальном уровне производство таблетированной формы вакцины холерной бивалентной химической. Эта вакцина является основным препаратом для специфической профилактики холеры в стране и представляет собой таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой и содержащие основные протективные антигены *V. cholerae* O1 серогруппы классического биовара холерогенанатоксин, O1-антиген сероваров Инаба и Огава, различные ферменты [8, 9, 10]. Вакцинацию проводят перорально однократно. Одна прививочная доза для взрослых составляет три таблетки, для детей в возрасте от 2 до 10 лет — одна таблетка, от 11 до 17 лет — две таблетки. Вакцина обеспечивает у привитых выработку гуморального противохолерного антибактериального и антитоксического иммунитета длительностью до 6 месяцев. Эта отечественная вакцина включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям, предусматривающим проведение вакцинации у лиц, выезжающих в неблагополучные по холере страны, и населению приграничных районов России в случае неблагоприятной по холере обстановки (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации №51н от 31.01.2011 г.).

Вместе с тем, до сих пор отсутствуют отечественные комплексные вакцины, обеспечивающие одновременную защиту от эпидемически опасных штаммов *V. cholerae* двух серогрупп — O1 и O139. Более того, для производства химических холерных вакцин используют высоковирулентные штаммы, применение которых требует больших материальных затрат для обеспечения биологической безопасности. В этой связи, разработка вакцинных препаратов нового поколения, а также создание универсальной технологии их производства является важным и перспективным направлением научных исследований.

Еще один важный вопрос — это роль фундаментальных исследований в дей-

ствующей системе эпидемиологического надзора, которая включает в себя организацию постоянного мониторинга за холерой, что необходимо для коррекции стратегии профилактических мероприятий и разработки прогнозов эпидемиологической ситуации. В этой связи, мониторинг может осуществляться путем слежения за динамикой изменения важнейших биологических свойств возбудителя, значимых для его диагностики и эпидемической опасности, а также влияющих на развитие эпидемического процесса. Современные технологии (секвенирование полных геномов и отдельных генов возбудителя, молекулярное типирование, ПЦР-тестирование генома, масс-спектрометрия, иммуноферментный анализ и т. д.) открывают новые возможности более тонких исследований молекулярно-генетической структуры клинических и выделяемых из водной среды штаммов, на основе которых дается более объективная оценка их роли в эпидемическом процессе. При сравнении полных геномов штаммов возбудителя холеры, выделенных в разные временные периоды, получена также принципиально новая возможность определять направление и время изменения участков генома возбудителя, связанных с его патогенным и эпидемическим потенциалом, что используется для прогнозирования возникновения новых вариантов с ранее не известными свойствами. Более того, полученная информация о молекулярно-генетических особенностях изолированных на территории России штаммов является основой для разработки адекватных современной ситуации диагностических и профилактических препаратов. Успешное использование результатов изучения молекулярно-генетических особенностей изолятов при оценке эпидемиологической значимости свежевыделенных штаммов из воды поверхностных водоемов, разработка новых диагностических ПЦР тест-систем, конструирование авирулентных штаммов-продуцентов протективных антигенов, выявление филогенетических связей исследуемых штаммов для установления источника заноса — все это свидетельствует о несомненно важной роли фундаментальных исследований в различных звеньях системы эпидемиологического надзора.

Таким образом, существующий риск завоза холеры и возникновения эпидемиологических осложнений по этой инфекции в России в современный период требует решения ряда основных проблем, направленных на совершенствование действующей системы эпидемиологического надзора за холерой, лабораторной диагностики и вакцинопрофилактики. Как уже отмечалось выше, несомненным достижением системы эпидемиологического надзора является разработанный в 1990 г. принцип районирования территорий страны по эпидемическим проявлениям холеры с последующим совершенствованием, который позволил повысить эффективность проводимых противоэпидемических мероприятий. Вместе с тем, изменение социально-экономической, экологической и эпидемиологической ситуации в различных регионах России, а также появление новых инструментов для исследования геномов выделяемых штаммов, в частности, полногеномного секвенирования для установления их происхождения, свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования системы эпиднадзора за холерой. Основные направления оптимизации системы эпидемиологического надзора за холерой состоят в совершенствовании определения эпидемического потенциала административных территорий с учетом их географического положения, эпидемических проявлений холеры, природных и социальных условий, демографических показателей; совершенствовании действующего алгоритма дифференциации административных территорий РФ по эпидемическому потенциалу; пересмотре районирования субъектов страны по типам эпидемических проявлений с соответствующей тактикой надзора, в том числе при мониторинге объектов окружающей среды с изучением особенностей геномов выделяемых холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, что должно быть учтено при переработке санитарно-

эпидемиологических правил. Для повышения эффективности проводимой оперативной и ретроспективной диагностики в современный период необходимо внедрение в практику современных высокоинформативных технологий, а также разработка диагностических препаратов нового поколения на основе ДНК-чипов и иммуночипов. Требуется также проведение работы по совершенствованию состава используемой холерной вакцины и созданию новых вакцинных препаратов, обеспечивающих одновременную защиту от эпидемически опасных штаммов холерного вибриона двух серогрупп — O1 и O139. Успешная реализация поставленных разноплановых задач будет способствовать решению проблемы эпидемиологического благополучия и биологической безопасности на территории Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдрашитова А.С., Яцышина С.Б., Осина Н.А., Астахова Т.С., Портенко С.А., Саяпина Л.В., Шипулин Г.А., Щербакова С.А. Разработка мультилокусных амплификационных тест-систем для выявления и ускоренной идентификации эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов. *Биозащита и биобезопасность*. 2014, 2 (19): 34-41.
2. Актуальные проблемы холеры. Под ред. В.И. Покровского, Г.Г. Онищенко. М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2000.
3. Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Балахонов С.В. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ для идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии. *Молекул. генетика*. 2015, 33: 3-8.
4. Бароян О.В. Холера Эль-Тор. М.: Медицина, 1971.
5. Бароян О.В., Бургасов П.Н., Гайлонская И.Н., Мединский Г. М. Экология холерных вибрионов. *Вестн. РАМН СССР*. 1975, 2: 45-53.
6. Беляков В.Д. Эпидемиологический надзор — основа современной организации противоэпидемической работы. *Журн. микробиол.* 1985, 5: 53-58.
7. Гриднева Л.Г., Мусатов Ю.С., Громова Т.В., Пуховская Н.М., Белозерова Н.Б., Уткина О.М., Иванов Л.И., Ковальский А.Г., Миронова Л.В., Куликалова Е.С., Хунхеева Ж.Ю., Балахонов С.В. Результаты мониторинга и биологические свойства холерных вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды на территории Хабаровского края. *Пробл. особо опасных инф.* 2014, 1: 121-124.
8. Джапаридзе М.Н., Никитина Г.П., Иванов Н.Р., Рысцова Е.А., Удалова И.Б., Караева Л.П. Биохимическая и иммунохимическая характеристика новой оральной холерной химической бивалентной вакцины и результаты испытания препарата на добровольцах. *Журн. микробиол.* 1982, 1: 29-33.
9. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Мелешенко М.В., Никитина Г.П. Способ получения пероральной химической вакцины. Патент №93034443/14 от 01.07.93 г.
10. Комисаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К. Новые подходы в технологии получения таблетки вакцины холерной бивалентной химической. *Биофармацевтический журн.* 2015, 1: 30-39.
11. Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Сарро С.Г., Миронова Л.В., Марков Е.Ю., Мальник В.В., Корзун В.М., Миткеева С.К., Балахонов С.В. Биопленка холерного вибриона: получение, характеристика и роль в резервации возбудителя в водной окружающей среде. *Журн. микробиол.* 2015, 1: 3-11.
12. Лабораторная диагностика холеры: методические указания МУК 4.2.2218-07. М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007.
13. Марамович А.С., Ганин В.С., Урбанович Л.Я., Погорелов В.И. Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за холерой. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 1999, 5: 54-56.
14. Марамович А.С., Погорелов В.И., Урбанович Л.Я., Шкаруба Т.Т. Холера эльтор в Латинской Америке. *Журн. микробиол.* 2001, 5: 82-90.
15. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В., Куликалова Е.С. Эволюция эпидемиологии холеры. *Журн. микробиол.* 2006, 6: 63-71.
16. Международные медико-санитарные правила (2005). Всемирная организация здравоохранения, Женева. 2006.
17. Методические указания «Порядок организации и проведения лабораторной диагно-

- стики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней». МУК 4.2.2870-11. М., 2011.
18. Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Квасов Е.М., Брудный Р.А., Монахова Е.В., Левкович А.А., Сердюкова В.Д., Косолева Л.А., Невенчанная Л.В., Капустина М.Д. Изучение эпидемической значимости холерных вибрионов, выделенных из различных экологических систем. Журн. микробиол. 1990, 8: 62-66.
 19. Москвитина Э.А., Анисимова Г.Б., Беспалов И.А. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2003620048. Холера Эль Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в СНГ, России. М., 2003.
 20. Москвитина Э.А., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванова С.М., Анисимова Г.Б. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005-2014 гг., прогноз на 2015 г. Пробл. особо опасных инф. 2015, 1: 18-25.
 21. Наркевич М.И., Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Н.А., Подосинникова Л.С., Мединский Г.М., Голубев Б.П. Типы эпидемических проявлений холеры в СССР. Журн. микробиол. 1991, 8: 33-35.
 22. Онищенко Г.Г., Беляев Е.Н., Москвитина Э.А., Резайкин В.И., Ломов Ю.М., Мединский К.М. Холера в Дагестане: прошлое и настоящее. Ростов-на-Дону, 1995.
 23. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Воляницкая С.Ю., Прометной В.И., Монахова Е.В., Водопьянов С.Ю., Дудина Н.А. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 ctxAB⁻ tcpA⁺. Журн. микробиол. 2007, 1: 23-29.
 24. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Жилина Н.Я., Подосинникова Л.С. Эпидемиологический надзор за холерой: обоснования к оценке его эффективности. Пробл. особо опасных инф. 2005, 1 (89): 5-9.
 25. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Титова С.В., Адаменко О.Л., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии. Вестник РАМН. 2015, 70 (2): 249-256.
 26. Писанов Р.В., Ежова М.И., Монахова Е.В., Черкасов А.В., Краснов Я.М., Водопьянов А.С., Кульшань Т.А., Ливанова Л.Ф., Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Кругликов В.Д., Титова С.В. Особенности структуры генома токсигенного штамма *Vibrio cholerae* El Tor Инаба, выделенного в 2014 г. из открытого водоема в Ростове-на-Дону. Пробл. особо опасных инф. 2015, 2: 63-67.
 27. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации. СП 3.1.1.2521-09. М., 2009.
 28. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой. СП 3.1.1086-02. М., 2002.
 29. Смирнова Н.И., Костромитина Е.А., Челдышова Н.Б., Кутырев В.В. Отличия в составе генов вирулентности в штаммах *Vibrio cholerae* Eltor, выделенных из разных источников на территории Туркменистана. Молекул. генетика. 2002, 4: 12-18.
 30. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Генетическая характеристика штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в разные периоды 7 пандемии холеры. Журн. микробиол. 2011, 3: 3-10.
 31. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Шубина А.В., Заднова С.П., Кутырев В.В. Способ идентификации токсигенных штаммов *V. cholerae* O1, определения их биовара и дифференциации штаммов биовара эльтор на типичные и измененные методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления. Патент №2458141 от 05.03.2012 г.
 32. Спицын А.Н., Уткин Д.В., Куклев В.Е., Портенко С.А., Германчук В.Г., Осина Н.А. Применение MALDI масс-спектрометрии в диагностике особо опасных инфекционных болезней: современное состояние и перспективы. Пробл. особо опасных инф. 2014, 3: 77-82.
 33. Холера в СССР в период седьмой пандемии. Под ред. В.И. Покровского. М.: Медицина, 2000.
 34. Anzaruzzaman M., Bhuiyan N., Safa A. et al. Genetic diversity of El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 with hybrid traits isolated from Bangladesh and Mozambique. Int. J. Med. Microbiol. 2007, 297: 443-449.
 35. Bhattacharya S., Sur D., Ali M. et al. 5 Year efficacy of a bivalent killed whole-cell oral cholera

- vaccine in Kolkata, India: a cluster-randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 2013, 13: 1050-1056.
36. Ceccarelli D., Spagnoletti M., Bacclu D. et al. New *V. cholerae* atypical El Tor variant emerged during the 2006 epidemic outbreak in Angola. *BMC Microbiol.* 2011, 11: 130.
 37. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B. et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N. Engl. J. Med.* 2011, 364 (1): 33-42.
 38. Ciglenecki I., Sakoba K., Luquero F. et al. Feasibility of mass vaccination campaign with oral cholera vaccines in response to an outbreak in Guinea. *PLoS Med.* 2013, 10: e1001512.
 39. Davis B.M., Waldor M.K. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Current Opinion in Microbiology.* 2003, 6: 35-42.
 40. Faruque S.M., Asadulghani, Saha M.N. et al. Analysis of clinical and environmental strains of nontoxicogenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTX ϕ : molecular basis for origination of new strains with epidemic potential. *Infect. Immun.* 1998, 66: 5819-5825.
 41. Goel A.K., Jain M., Kumar P. et al. Molecular characterization reveals involvement of altered El Tor biotype *Vibrio cholerae* O1 strains in cholera outbreak at Hyderabad, India. *J. Microbiol.* 2011, 49 (2): 280-284.
 42. Herrington D.A., Hall R.H., Losonsky G. et al. Toxin, toxin-coregulated pili, and the toxR-regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J. Exp. Med.* 1988, 168: 1487-1492.
 43. Huq A., Small E.B., West P.A. et al. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environm. Microbiol.* 1983, 45 (1): 275-283.
 44. Islam M.S., Jahid M.I., Rahman M.M. et al. Biofilm acts as a microenvironment for plankton-associated *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Bangladesh. *Microbiol. Immunol.* 2007, 51: 369-379.
 45. Karaolis D.K., Somara S., Maneval D.R., Jr. et al. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature.* 1999, 399: 375-379.
 46. Khan I., Saha A., Chowdhury F. et al. Coverage and cost of a large oral cholera vaccination program in a high-risk cholera endemic urban population in Dhaka, Bangladesh. *Vaccine.* 2013, 31: 6058-6064.
 47. Kim E.J., Lee D., Moon S.H. et al. Molecular insights into the evolutionary pathway of *Vibrio cholerae* O1 atypical El Tor variants. *PLoS.* 2014, 10: e1004384.
 48. Lopez A.L., Gonzales M.L.A., Aldaba J.G., Nair G.B. Killed oral cholera vaccines: history, development and implementation challenges. *Ther. Adv. Vaccines.* 2014, 2 (5): 123-136.
 49. Lucas M., Deen J., Von Seidlein L. et al. Effectiveness of mass oral cholera vaccination in Beira, Mozambique. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352: 757-767.
 50. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R. The seventh cholera pandemic. *Nature.* 2011, 477: 462-465.
 51. Nair G.B., Qardi F., Holmgren J. et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44 (11): 4211-4213.
 52. Rebaudet S., Piarroux R. Monitoring water sources for environmental reservoirs of toxigenic *Vibrio cholerae* O1, Haiti. *Emerg. Infect. Dis.* 2015, 21 (1): 169-170.
 53. Tamplin M.L., Gauzens A.L., Huq A. et al. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56: 1977-1980.
 54. Teschler J.K., Zamorano-Sanchez D., Utada A.S. et al. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nature Reviews Microbiology.* 2015, 13: 255-268.
 55. Thom S., Warhurst D., Drasar B.S. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J. Med. Microbiol.* 1992, 36 (5): 303-306.
 56. Utada A.S., Bennet R.R., Fong J.C. *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment. *Nature Commun.* 2014, 5: 4913.
 57. Waldor M.K., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 1996, 272: 1910-1914.

Поступила 15.08.15

Контактная информация: Смирнова Нина Ивановна, д.б.н., проф.,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)26-47-23

© А.Б.ЖЕБРУН, О.В.КАЛИНИНА, 2016

А.Б.Жебрун, *О.В.Калинина*

ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ С: ЭВОЛЮЦИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА, ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСА

Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

На основании результатов филодинамических, филогеографических, исторических и демографических исследований приводится периодизация эволюции эпидемического процесса гепатита С: вторжение вируса в европейскую и северо-американскую популяцию в 1700 — 1850 годы; первичная активизация эпидемического процесса в годы I Мировой войны; экспансивный рост распространенности в 40 — 60-е годы XX в. вследствие массовых парентеральных вмешательств; новый подъем, связанный с героиновой наркоманией в 60 — 80-е годы XX в.; многократное снижение инцидентности острого гепатита С в индустриальных странах за последние 10 — 15 лет в результате общемедицинских мер предупреждения гемоконтактных инфекций. Обсуждается вопрос о возможности управления гепатитом С и необходимости оценки эффективности существующих мер профилактики с привлечением количественных аналитических методов эпидемиологии. Приводятся данные филогенетических исследований об этапах эволюции вируса гепатита С (ВГС): разделение его корневой генетической линии с гомологичными гепасивирусами животных 985 — 2013 лет назад; разделение ВГС на генотипы 500 — 2000 лет назад; разделение генотипов на субтипы 70 — 300 лет назад. Обсуждается вклад мутаций и генетических рекомбинаций в эволюцию ВГС. Констатируется, что генотипирование оказалось малопродуктивным подходом для определения детерминант патогенности, иммунного ускользания, неотвечаемости на терапию, а также для поиска предикторов исхода инфекции. Обосновывается необходимость геномного подхода для этих целей, а также для мониторинга риска, вытекающего из продолжающейся эволюции и биоразнообразия ВГС и других гепасивирусов.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 102—112

Ключевые слова: вирус гепатита С, таксономия, эпидемический процесс, эволюция

A.B.Zhebrun, *O.V.Kalinina*

VIRAL HEPATITIS C: EVOLUTION OF THE EPIDEMIOLOGIC PROCESS, EVOLUTION OF THE VIRUS

Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St.-Petersburg, Russia

Periodization of the evolution of epidemic process of hepatitis C is given based on the results of phylodynamic, phylogeographic, historic and demographic studies: invasion of the virus into European and North American population in 1700 — 1850; primary activation of the epidemic process in the years of the World War I; expansive growth of prevalence in 40 — 60s of the 20th century due to mass parenteral interventions; new rise due to heroine drug abuse in 60 — 80s of the 20th century; manifold reduction of incidence of acute hepatitis C in industrial countries for the last 10 — 15 years as a result of general medical measures of prevention of hemocontact infections. A problem of possibility of hepatitis C management and necessity of evaluation of effectiveness of existing prophylaxis measures involving quantitative analytical methods of epidemiology is discussed. Data from phylogenetic studies on stages of hepatitis C virus evolution (HCV) are provided: division of its root genetic lineage with homologous hepaciviruses of animals 985 — 2013 years ago; division of HCV into genotypes 500 — 2000 years ago; division of genotypes into subtypes 70 — 300 years ago. Contribution of mutations and genetic recombinations into HCV evolution

is discussed. Genotyping is stated as an inefficient approach for determination of pathogenicity determinants, immune evasion, non-responsiveness to therapy, as well as search for predictors of infection outcome. A necessity of genomic approach for these aims is justified, as well as for risk monitoring, ensuing from continuing evolution and biodiversity of HCV and other hepaciviruses.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 102—112

Key words: hepatitis C virus, taxonomy, epidemic process, evolution

В 2014 году исполнилось 25 лет со времени открытия вируса гепатита С [11]. Исследование, приведшее к открытию, было завершено в 1988 году, но его результаты опубликованы в журнале «Science» в 1989 году. Группа исследователей под руководством Houghton M. с помощью метода обратной транскрипции клонировала кДНК-копию генома некультивируемого в то время этиологического агента гепатита ни-А, ни-В — вируса гепатита С. Дальнейшее исследование этого патогена оставило свой глубокий и неповторимый след в вирусологии, инфектологии, онкологии и во всех без исключения областях современной эпидемиологии (от теоретической до поведенческой и молекулярной).

Проблема вирусного гепатита С (ГС) стала одной из глобальных проблем современной медицины, поскольку этим вирусом инфицировано около трех процентов населения планеты. По данным ВОЗ от 130 до 210 млн человек страдают хроническим гепатитом С, до 30% хронических больных подвержены риску развития цирроза печени, до 10% — гепатокарциномы. Смертность от этой инфекции в мире достигает 350 000 — 500 000 случаев в год.

Ввиду стремительного роста регистрации случаев ГС в 90-х годах XX века его долго относили к числу эмергентных инфекций, что оказалось ошибкой, как следует из представленных ниже данных филодинамических исследований. Гепатит С официально включен в перечень социально значимых заболеваний (Постановление Правительства РФ от 1 декабря 2004 г. № 715 «Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих»), хотя и в этом отношении нужна одна существенная оговорка — основные признаки социальной значимости: массовость и зависимость от социальных условий заявили о себе лишь в последние 100 лет и, по всей вероятности, не были свойственны естественному эпидемическому процессу этой инфекции.

Огромный фактический материал, накопленный за сравнительно короткий 25-летний период исследований, дал наглядные свидетельства современной и исторической эволюции эпидемического процесса вирусного гепатита С, эволюции самого вируса и наших знаний о нем.

Таксономия и классификация вируса гепатита С. ВГС является РНК-содержащим вирусом и по своей организации генома, который представлен однонитевой РНК позитивной полярности, отнесен к самостоятельному роду *Hepacivirus* в составе семейства *Flaviviridae* [11].

Новая, расширенная классификация ВГС, принятая в 2013 году Международным комитетом по таксономии вирусов, включает 7 генотипов, обозначаемых арабскими цифрами от 1 до 7. Генотипы состоят из субтипов, далее идут изоляты, нижнюю ступень иерархии занимают квазивиды. Согласно критериям, принятым еще в классификации 2005 года, генетическая дивергенция между генотипами зафиксирована на уровне >30%, между субтипами — >15% и между квазивидами — >2%. Название субтипов ограничено латинскими буквами от а до w, далее ха, хb...xz, уа...yz, за...zz (в совокупности генотип может содержать 101 субтип). В классификации зарегистрировано 67 подтвержденных субтипов ВГС, 20 — номи-

нированных преварительно и 21 ненонинированный субтип, которым пока не присвоены буквенные обозначения, поскольку они представлены только одним изолятом (согласно принятым критериям, для включения в классификацию необходимо идентифицировать как минимум три изолята нового субтипа, выделенных от эпидемиологически несвязанных пациентов, и охарактеризовать полно-размерный геном одного из изолятов). С 2005 г. в классификацию введена еще одна номенклатурная единица — рекомбинантные формы ВГС.

Одновременно с введением новой классификации Комитетом принято решение о необходимости согласовывать название каждого нового генетического варианта с Flaviviridae Study Group (listed on http://ictvonline.org/subcomm_itee.aspcommittee525&se55).

Эволюция эпидемического процесса гепатита С. В настоящее время ГС относится к числу инфекций с отчетливым убиквитарным распространением. По данным сероэпидемиологических исследований его превалентность в общей популяции населения колеблется от 1,2% в странах Тропической Латинской Америки до 3,7 — 3,8% в странах Восточной и Центральной Азии и Северной Африки [24].

В распределении генотипов и субтипов ВГС по Земному шару можно отметить определенные закономерности.

1. Во-первых, доминирующими в мире являются генотипы 1, 2 и 3. При этом, из 41 субтипа генотипов 1, 2 и 3 всего шесть: 1a, 1b, 2a, 2b, 2c и 3a признаны эпидемическими вариантами, обусловившими глобальное распространение ВГС-инфекции [48, 50]. Структура мировой популяции, по последним данным, выглядит следующим образом: ВГС-1 — 46,2%; ВГС-2 — 9,1 %; ВГС-3 — 30,1%; ВГС-4 — 8,3%; ВГС-5 — 0,8%; ВГС-6 — 5,4% [41].

2. Во-вторых, имеются региональные особенности распространения генетических вариантов. Субтип 1b занимает лидирующее положение в большинстве регионов мира, в том числе, в России [3, 5, 14]. Субтип 1a распространен в странах Северной Америки, Европы, в Австралии [8, 14, 50]. Субтипы 2a и 2b широко встречаются на территории Северной, Южной и Латинской Америки, в Швеции, Индонезии, Японии, Тайване только среди потребителей внутривенных наркотиков (ПИН) [8, 14]. В Италии, Франции наравне с субтипом 2a распространен субтип 2c [13, 36]. Субтип 3a доминирует в Австралии, Англии, Индии, Пакистане, Бразилии среди ПИН, также как и во многих странах Западной Европы, России и странах бывшего Советского Союза [3, 5, 14].

3. В-третьих, картина по субтипам и изолятам гетерогенна повсеместно, но в наибольшей степени — в трех регионах Земного шара: Субсахарной Африке, где циркулирует рекордное число генетических вариантов 1, 2 и 4 генотипов; в Южной Азии, где имеет место разнообразие 3 генотипа и в Юго-Восточной Азии — разнообразие 6 генотипа. По мнению большинства специалистов, эти регионы считаются эндемичными зонами вируса гепатита С и родиной пандемичных штаммов.

Однако время и причины эпидемического распространения вируса долгое время оставались неизвестными. Определенная ясность в этом отношении стала появляться лишь в последние годы с развитием методологии геномной эры — филодинамического и филогеографического методов анализа. Эти подходы принесли, хотя и не прямые, но убедительные свидетельства о времени и обстоятельствах первичного внедрения вируса в европейскую популяцию населения, а также о движущих силах современной глобальной эпидемии гепатита С.

Markov P.V. et al. в [39] пишут: «Объединив демографическую информацию с филогеографическим анализом и данными молекулярных часов, мы демонстрируем впервые, что трансатлантическая работоторговля и колониальная история были движущей силой глобального распространения ВГС-2. Мы обнаружили

многократные передвижения ВГС-2 от современной Ганы/Бенина в Карибский бассейн в течение пиковых лет работорговли с 1700 по 1850 и обширную передачу ВГС-2 по Нидерландам и ее бывшим колониям Индонезии и Суринаму в течение последних 150 лет». Эволюционный анализ ВГС-3 позволил предположить, что, несмотря на то, что Азия давно является эндемичным регионом распространения этого генотипа, изначально его диссеминация началась с территории Африки еще до путешествий Васко да Гама, во времена арабской торговли рабами между Юго-Восточной Африкой, Ближним Востоком и Южной Азией [33]. В дальнейшем, уже в колониальный период, Индия послужила экспортером ВГС-3а на территорию Англии [12].

Сходным образом, по всей вероятности, шло распространение всех пандемичных вариантов ВГС, и в XVIII — XIX веках скрытый эпидемический процесс уже существовал во многих странах за пределами эндемичных зон. Его темпы при отсутствии «искусственных» гемоконтактных факторов передачи инфекции оставались медленными, о чем говорят филодинамические данные о стабильно низкой численности популяции вируса в тот исторический период [48 — 50]. Однако в XX веке темпы глобализации эпидемического процесса резко возросли, пройдя несколько стадий. Первая из них связана с 1 Мировой войной и солдатской наркоманией; ВГС-3а, как предполагают, первично был занесен в среду наркопотребителей рекрутами из Южной Азии, воевавшими на европейских фронтах [49]. Вторая стадия глобализации эпидемического процесса гепатита С началась в 40-х годах XX века и была связана с массовыми гемотрансфузиями и медицинскими вмешательствами времен 2 Мировой войны, а после нее — с широким распространением парентеральных процедур, исследований и программ вакцинации, которые выполнялись без должной асептики и стерилизации многообразного медицинского инструментария. Экспоненциальный рост популяции ВГС в то время выявлен в целом ряде филодинамических и филогеографических исследований последних лет [13, 36]. Ретроспективное тестирование образцов крови военных рекрутов подтвердило высокую частоту маркеров ВГС в США в 1948 — 1954 годах: 0,2% у призывников в среднем, 0,1% у белых, 1,8% у афроамериканцев. Третья стадия глобализации эпидемического процесса гепатита С началась в 60-х годах XX века, ее основной движущей силой стала героиновая наркомания в индустриальных странах [49]. Филодинамический анализ четко указывает на взрывной характер роста популяции ВГС 1а среди американских потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) в 60 — 80-х годах [36]. Начиная с 90-х годов экспансия ВГС среди ПИН документирована уже прямыми надзорными исследованиями во многих странах мира [43].

Коренные изменения эпидемического процесса гепатита С в XX веке коснулись и основной географической направленности распространения инфекции, ее вектор развернулся в прямо противоположном направлении: из развитых стран в страны развивающегося мира. Magiorkinis G. et al. [36] построили филогеографическую модель этого процесса и образно сравнили популяцию доминантных в США субтипов ВГС-1а и 1b с «родником», или «ключом», бьющим в центре и распространяющим свои генетические линии на территорию других стран. Авторы пишут, что «первая волна передачи (вероятно, через переливания крови и плазмы) способствовала распространению ВГС сначала в развитых странах, а затем в развивающиеся страны, где локальные эпидемии были дополнительно усилены местными специфическими ятрогенными медицинскими процедурами и ПИН». Наглядные примеры таких локальных эпидемий — экспоненциальный рост популяции ВГС субтипа 1b в Турции в 1940 — 1999 гг., обусловленный ятрогенными медицинскими причинами [13]; массовое распространение субтипа 4а в Египте в 1940 — 1980 гг. в период широкого использования внутривенных инъекций препаратов сурьмы для лечения шистосомозов. В странах Юго-Восточной Азии, в

частности, в Таиланде, распространение субтипа 3a связывают с событиями Вьетнамской войны, последующим экспоненциальным ростом, также как и в других странах — с употреблением внутривенных стимуляторов, которые были привнесены в регион американскими солдатами [6].

Следует отметить, что в последнее десятилетие картина перемещения генетических вариантов ВГС еще более усложняется разнообразными встречными потоками, которые обусловлены активной миграцией населения. Документированы заносы субтипа 1a из США в Россию [3], субтипов 2d, 2e, 2j, 2m, 2g из африканских стран в Канаду [32], субтипа 2j в Венесуэлу. Обнаружен значительный рост популяции генотипа 4, эндемичного для Северной Африки в Южной Африке [19], в Дании [16].

И, наконец, самый современный этап эволюции эпидемического процесса — резкое, никем не предсказанное снижение заболеваемости острым гепатитом С (ОГС) в индустриальных странах без вакцинопрофилактики или иного направленного воздействия. В США, например, пик инцидентности ОГС, имевший место в начале 90-х годов XX века, сменился 10-кратным снижением к 2006 году. В Российской Федерации заболеваемость ОГС с пиковых значений 2000 года совершила 10-кратное падение к 2009 году, а в 2013 году достигла практически спорадического уровня [2]. Вслед за снижением заболеваемости ОГС с отставанием на 10 — 12 лет происходит и более фундаментальное изменение — снижение серопревалентности населения к ВГС. В США этот показатель в 2001 — 2002 гг. был равен 1,9%, а в 2005 — 2006 гг. — 1,3% [15]. В РФ, судя по данным обследования беременных женщин, серопозитивность населения снизилась с 1,6% в 2007 году до 1,3% в 2011 — 2012 гг. [1, 2].

Эта благоприятная динамика вызывает три главных вопроса: каковы ее причины, насколько стабилен тренд на снижение и каковы перспективы управления этой инфекцией? Все три вопроса находятся на самой начальной стадии обсуждения и исследования, к ответам на них еще не привлекаются количественные и аналитические методы эпидемиологии. Общеизвестна лишь одна группа причин снижения инцидентности острого гепатита С — профилактические меры в медицинской практике: контроль и деконтаминация крови и продуктов из нее (в том числе и контроль маркеров ВГС), переход на разовый инструментарий для парентеральных вмешательств и другие меры в медицинских учреждениях [2]. По материалам исследований в США, например, с гемотрансфузиями, трансплантациями органов и медицинскими манипуляциями на пике заболеваемости в 70 — 80-х годах было связано до 50% случаев заражения ВГС, а в 1994 — 2006 годах уже только 3,3% [26]. В РФ роль этих факторов снизилась с 12,8% в 1997 году до 3% в 2009 году [1, 2].

Эффективностью общепрофилактических мер легко объяснить снижением частоты ОГС в общей популяции населения, но оказалось, что 10-кратное снижение заболеваемости произошло и в главной группе риска — среди ПИН. Его причины не вполне ясны, хотя и высказано несколько предположений. Willams I.T. et al. (2011) считают, что, возможно, сыграло свою роль, в том числе, насыщение сообщества ПИН ВГС-инфекцией (общая распространенность >80%), а также программы снижения вреда и образовательные программы. В порядке дискуссии можно возразить, что подобные программы не могут быть ответственны за всю полноту эффекта, поскольку не обеспечивают массового охвата ПИН даже в США и, тем более, в РФ. Nagan H. et al. [23] провели мета-анализ 26 исследований, посвященных программам первичной профилактики среди ПИН. Ни одна из программ в отдельности (консультирование с целью коррекции поведения, неспецифическое лечение зависимости от психотропных веществ, расширение доступа к стерильным шприцам, опиат-замещающая терапия, ОРТ, программа дезинфекции шприцев) не приводили к достоверному снижению ВГС-

сероконверсии среди участников. Успех отмечен лишь в двух комплексных программах: сочетания ОРТ с акцентированным консультированием и сочетания метадоновой терапии с полным обменом шприцев [23]. Тем не менее, независимое изучение поведенческих факторов в сообществах ПИН действительно зафиксировало такие изменения в середине нулевых годов XXI века как снижение случаев использования общих шприцев и уменьшение числа лиц при каждом эпизоде их совместного использования [25].

Таким образом, есть основания считать, что снижение заболеваемости ОГС и в общей популяции населения и в среде ПИН связано со снижением искусственного гемоконтактного пути передачи инфекции. Однако обращает на себя внимание необычайно высокий эффект общепрофилактических мер (10-кратное падение заболеваемости ОГС за 10 лет), что сопоставимо с эффектом массовой специфической вакцинопрофилактики вирусного гепатита В. При анализе этого факта может быть принята во внимание одна отчетливая особенность ВГС, отличающая его от возбудителей других гемоконтактных инфекций — ВИЧ-инфекции и гепатита В. Она состоит в исключительно малой эффективности естественных путей передачи ВГС: полового, бытового и вертикального. Прежние представления о том, что этим путям передачи принадлежит 15 — 30% в эпидемическом процессе ГС не подтверждаются данными молекулярной эпидемиологии. В большинстве случаев изоляты вируса от разных членов одной семьи принадлежат к разным субтипам или к их разным генетическим вариантам. В недавнем исследовании, которое включало анти-ВГС положительных пациентов и их долгосрочных моногамных гетеросексуальных партнеров, было установлено с помощью филогенетического анализа изолятов, что передача вируса происходит не более чем у 0,07% семейных пар в год, или в 1 случае на 190 000 сексуальных контактов [Terrault N.A. et al., 2013].

С учетом приведенных выше данных, наиболее общее объяснение резкого снижения заболеваемости ОГС может состоять в том, что по мере сокращения роли искусственного пути передачи вируса эпидемический процесс возвращается к своему естественному, сравнительно низкому уровню интенсивности. Филодинамические реконструкции исторического эпидемического процесса однозначно указывают на его низкую активность повсеместно — в Африке, Азии, Европе и Северной Америке вплоть до начала XX века. Такая ситуация существовала веками без каких бы то ни было профилактических мер, пока не началась экспансия искусственной гемоконтактной передачи вируса [33, 44, 47]. Этот исторический прецедент дает основание для оптимистичного прогноза: дальнейшая стабилизация эпидемической ситуации по вирусному гепатиту С теоретически возможна в той мере, в какой удастся устранить искусственные факторы передачи инфекции. Однако практическая достижимость этой цели остается неопределенной. Об этом свидетельствует факт нового постепенного, но устойчивого повышения заболеваемости ОГС в США начиная с 2006 года [10]. Тем не менее, несколько исследовательских групп уже заявили, что управление этой инфекцией возможно при условии успешной «интервенции» в эпидемический процесс среди ПИН с помощью расширенных профилактических или лечебных программ [23, 40].

Предыдущий опыт исследования ВГС позволяет нам обратить внимание еще на одно необходимое условие — позитивный эффект от уже принятых и предлагаемых мер будет стабилен, если не произойдет существенного изменения биологических свойств этого быстро эволюционирующего патогена.

Эволюция вируса гепатита С. Принципиально важные вопросы о происхождении и природном резервуаре ВГС остаются еще невыясненными. Под влиянием фактов о происхождении ВИЧ, который был открыт на 6 лет раньше, мысль исследователей была направлена вначале на поиски природного аналога ВГС среди

высших приматов. Это казалось тем более вероятным, что шимпанзе восприимчивы к этому патогену. Тем не менее, многократные попытки различных лабораторий мира найти ВГС у высших приматов в дикой природе не дали никаких результатов. Расширение поисков на другие виды животных привело в самые последние годы к открытию новых филогенетических групп вирусов: гепасивирусов неприматов (NPHV), обнаруженных у лошадей и собак [34]; гепасивирусов грызунов (RHV) [30]; гепасивирусов летучих мышей (BHV); гепасивирусов гверец (GHV), выделенных у низших обезьян колобусов [31]. Новые вирусы филогенетически связаны, но не тождественны ВГС. По данным филогенетических реконструкций, корневая линия ВГС/ NPHV разделилась с другими перечисленными линиями 985 — 2613 лет тому назад, вероятно, на территории Восточной Африки [31].

Развернутый филогенетический анализ самого ВГС определил, что его современные генотипы, предположительно, возникли в результате дивергенции общего предка в период от 500 до 2000 лет назад. Недавнее исследование, учитывавшее характеристику полного генома изолятов ВГС, дает уточненную датировку: 780,86 (592,15 — 1031,34) лет назад [33]. Расчетное время и регионы формирования отдельных генотипов и субтипов ВГС определялись с помощью комплексного подхода, объединявшего филогенетическую, географическую и эпидемиологическую информацию. ВГС-1 возник, предположительно, 675 лет назад на территории Нигерии [18]; ВГС-2 — примерно в 1470 году в Гвинее-Бисау [38]; ВГС-3 — 457,81 лет назад в Африке [33]; ВГС-4 — в 1539 году в Центрально-Африканской Республике [44]; ВГС-6 — 1100 — 1350 лет назад (место возникновения не ясно) [47]. Расчетное время формирования субтипов вируса гепатита С — последние 300 лет. К примеру, субтипы 1a и 1b дивергировали от общих предков 135 и 112 лет назад соответственно [35]. По другим данным субтип 1b сформировался 70 — 80 лет назад.

Следующий элемент популяционной структуры ВГС (и важный этап мутационной изменчивости вируса) — квазивиды. Изоляты от любого пациента с ВГС-инфекцией содержат целый спектр — сотни генетических вариантов вируса, которые, как правило, четко сгруппированы в квазивиды (до 5 квазивидов в одном организме-хозяине). Состав, численность и профиль квазивидов эволюционируют в ходе инфекции под влиянием иммунного давления и антивирусной терапии. Либо в полном, либо в усеченном наборе они способны передаваться от хозяина к хозяину [9, 17, 28]. Квазивиды, как компонент популяции, отражены в таксономии ВГС, однако их номинирование и регистрация в настоящее время не ведутся. Очевидным препятствием к этому является сложность их профиля, непрерывная и непредсказуемая пока изменчивость [7, 17].

Генотипы, субтипы, квазивиды и генетические варианты ВГС являются продуктами мутационного процесса, который долгое время считался единственным молекулярным механизмом эволюции этого вируса. Однако в 2002 году совместными работами российских и шведских исследователей у ВГС было открыто явление генетической рекомбинации [4, 29]. Полногеномный сиквенс изолятов из С.-петербургской коллекции ВГС позволил обнаружить варианты вируса, которые содержали гены от разных генотипов: *core*-ген от субтипа 2k, а ген NS5B — от субтипа 1b. Филодинамическая реконструкция показала, что вероятное время возникновения рекомбинанта — 1923 — 1956 годы, территория возникновения — СССР [Raghwani J. et al., 2012]. По мнению авторов филодинамической реконструкции, это явление могло быть связано с созданием в стране первой в мире централизованной службы переливания крови. Необходимым условием генетической рекомбинации у вирусов является микст-инфекция клетки обоими родительскими линиями рекомбинанта. Это явление с высокой вероятностью и происходило в период военной и послевоенной экспансии ВГС, вследствие многократных переливаний крови от разных инфицированных доноров. Несмотря

на относительную молодость этой генетической линии, она демонстрирует активный рост эффективного размера популяции. Изоляты 2к/1b уже выявлены в 13 странах мира, включая 8 стран дальнего зарубежья [4, 5, 27]. В самые последние годы в разных регионах мира обнаружены другие рекомбинантные формы ВГС: 2b/1a; 2/5; 2b/6w; 2b/1b_1; 2i/6p; 2b/6w; 2b/1b_2; 2b/1b_3; 2b/1b_4 [27].

Подключение рекомбинационного механизма изменчивости ВГС — принципиально важное событие в его истории. Оно означает, что в дополнение к мутационному процессу, главному орудью «нейтральной» эволюции, начинает работать горизонтальный перенос генов (рекомбинация) как механизм дарвиновской адаптивной эволюции. Спустя 11 лет после открытия рекомбинации у ВГС были получены данные, что это явление свойственно также гепасирусам животных и сыграло важную роль в их эволюции и межвидовой передаче патогена [31]. Из этого следует, что рекомбинация является общим свойством *Нерасивирuses* и создает потенциальный риск передачи гепасирусов животным людям [46], подобно тому, как это происходило в новейшей истории коронавирусов [21] и вирусов гриппа [22].

Представленные выше данные свидетельствуют о быстрой и непрерывной эволюции ВГС, в результате которой сформировались его уникальные биологические свойства: высокая приспособленность к циркуляции в человеческой популяции, способность к ускользанию от иммунного давления, резистентность к α -интерферону, способность к длительной (чаще пожизненной) персистенции в организме, склонность к компартментации (образованию генетических вариантов с печеночной и экстра-печеночной тканевой тропностью) [7, 17]. Общим результатом этих свойств патогена является частое хроническое течение и тяжелые последствия инфекции — цирроз печени и гепатокарцинома.

С первых лет изучения ВГС масса работ была посвящена поиску детерминант и маркеров персистенции, хронизации, манифестации инфекции, неотвечаемости на противовирусную терапию, а также поиску предикторов развития цирроза печени и гепатокарциномы. Наибольшее число исследований было посвящено ассоциации клинических проявлений с генотипическими (таксономическими) признаками патогена (генотипами, субтипами, квазивидами) [7, 17]. Так, большинство наблюдений свидетельствуют, что вирусы генотипов 1 и 4 более резистентны к α -интерферону, чем вирусы генотипов 3 и 4, а вирусы генотипа 3 и субтипа 1b чаще других вызывают тяжелые клинические исходы болезни [20]. Надо подчеркнуть, что эти немногие установленные зависимости носят лишь статистический характер, им подчиняется большинство, но далеко не все изоляты указанных таксономических групп [17].

С позиций современного геномного и постгеномного периода науки эти результаты не вызывают удивления. Таксономическое деление основано на формальном признаке — проценте различий в последовательности генома, тогда как необходим переход к функциональному принципу и поиску детерминант патогенности, клинического исхода инфекции и неотвечаемости на терапию в структуре и функции соответствующих участков генома. Такие задачи уже поставлены в исследованиях самых последних лет, посвященных клиническим аспектам вирусного гепатита С [28].

Полногеномный подход необходим и в изучении эпидемического процесса гепатита С. К числу его первостепенных задач следует отнести: изучение реальной структуры циркулирующей популяции ВГС по данным полногеномного анализа; выяснение действительной структуры путей и факторов передачи вируса; выявление генетических детерминант трансмиссивности и мониторинг целого ряда рисков, вытекающих из быстрой молекулярной эволюции патогена. В числе таких рисков — ожидаемый выход в общую циркуляцию генетических линий, резистентных к средствам терапии [20], и упомянутый выше риск появ-

ления рекомбинантов с гепасирусами животных [46]. Считаем возможным назвать еще один потенциальный риск, связанный с непрерывной эволюцией ВГС — возможность появления генетических вариантов с повышенной тропностью к слизистым мочеполового тракта или другим слизистым оболочкам человека. Появление в ходе инфекции квазивидов ВГС с внепеченочным тропизмом является хорошо доказанным фактом, в том числе было показано стойкое существование вариантов, адаптированных к слизистой желудочно-кишечного тракта [42] и эндометрию (при инфекции у шимпанзе) [45]. Очевидно, что появление подобных генетических вариантов вируса в общей циркуляции придало бы новый импульс активизации эпидемического процесса гепатита С.

Полученные за 25 лет исследований вирусного гепатита С научные данные внесли принципиальную ясность в вопросы о времени и обстоятельствах вторжения вируса в европейскую популяцию населения, а также о движущих силах современного эпидемического процесса этой инфекции. Яснее и аргументированнее стали отличия гепатита С от других гемоконтактных инфекций, которые заключаются в его исключительно низкой контагиозности при половом, бытовом и вертикальном путях передачи. Именно благодаря этому обстоятельству, по всей вероятности, столь эффективными оказались общие меры предупреждения парентерального инфицирования в медицинских учреждениях, которые привели к многократному снижению заболеваемости острым гепатитом С в промышленных странах за последние 10 — 15 лет. Однако вопрос о возможности управления вирусным гепатитом С остается открытым, как и вопрос о действительной эффективности мер профилактики, которые повсеместно вводились из априорных предположений. Задачей дальнейших исследований следует считать оценку реального профилактического эффекта от текущих мероприятий и предлагаемых программ с привлечением количественных аналитических методов эпидемиологии.

Накопленная информация свидетельствует о несомненной эволюционной успешности ВГС, как патогена. Ее признаки — экспансивный рост эффективной популяции, расширение ареала до глобальных масштабов, нарастающее разнообразие генетических вариантов. Генофонд циркулирующих популяций вируса продолжает меняться под влиянием внутренней эволюции и заносов из других регионов мира. Дальнейшее слежение за динамикой циркулирующих популяций ВГС и структурой путей и факторов передачи вируса требует адекватной методологии, основанной на геномном подходе и технологиях высокопроизводительного секвенирования РНК. Предыдущий опыт показал, что генотипирование — малопродуктивный метод для этих целей. Расширенные геномные исследования, как ожидается, приведут к расшифровке генетических детерминант патогенности, иммунного ускользания и неответственности на противовирусную терапию. В конечном итоге они будут содействовать улучшению клинической и эпидемиологической диагностики и разработке более эффективных мер профилактики и терапии этой массовой социально значимой инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Под ред. А.Б.Жебруна. СПб, НИИЭМ им. Пастера. 2008.
2. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Под ред. В.И.Покровского, А.Б.Жебруна. СПб, НИИЭМ им. Пастера, 2013.
3. Жебрун А.Б., Мукомолов С.Л., Нарвская О.В. Генотипирование и молекулярное маркирование бактерий и вирусов в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями. Журн. микробиол. 2011, 4: 28-36.
4. Калинина О.В. Организация генома и география природного межгенотипного рекомбинанта вируса гепатита С RF1_2k/1b. Инфекция и иммун. 2012, 2 (4): 677-686.
5. Кузин С.Н., Самохвалов Е.И., Заботина Е.Е. и др. Структура генотипов вируса гепатита у пациентов с хроническим гепатитом С. Журн. микробиол. 2011, 3: 33-38.

6. Akkarathamrongsin S., Hacharoen P., Tangkijvanich P. et al. Molecular epidemiology and genetic history of hepatitis C virus subtype 3a infection in Thailand. *Intervirology*. 2013, 56 (5): 284-294.
7. Argentini C., Genovese D., Dettori S., Rapicetta M. HCV genetic variability: from quasispecies evolution to genotype classification. *Future Microbiol.* 2009, 4: 359-373.
8. Blatt L.M., Mutchnick M.G., Tong M.J. et al. Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States. *J. Viral. Hepat.* 2000, 7 (3): 196-202.
9. Campo D.S., Dimitrova Z., Yamasaki L. et al. Next-generation sequencing reveals large connected networks of intra-host HCV variants. *BMC Genomics*. 2014, 15 (Suppl 5): S4. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/S5/S4>.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for viral hepatitis —United States, 2011: <http://www.cdc.gov/hepatitis/Statistics/2011Surveillance/>.
11. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989, 244: 359-362.
12. Choudhary M.C., Natarajan V., Pandey P. et al. Identification of Indian sub-continent as hotspot for HCV genotype 3a origin by Bayesian evolutionary reconstruction. *Infect. Genet. Evol.* 2014, 28: 87-94.
13. Ciccozzi M., Ciccaglione A.R., Presti A.Lo. et al. Reconstruction of the evolutionary dynamics of the hepatitis C virus 1b epidemic in Turkey. *Infect. Genet. Evol.* 2011, 11 (5): 863-868.
14. Cornberg M., Razavi H., Alberti A. et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int.* 2011, 31 (2): 30-60.
15. Ditah I., Ditah F., Devaki P. et al. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in the United States: National health and nutrition examination survey 2001 through 2010. *J. Hepatol.* 2014, 60 (4): 691-698.
16. Eriksen M.B., Jørgensen L.B., Krarup H. et al. Molecular and epidemiological profiles of hepatitis C virus genotype 4 in Denmark. *J. Med. Virol.* 2010, 82 (11): 1869-1877.
17. Fishman S.L., Branch A.D. The quasispecies nature and biological implications of the hepatitis C virus. *Infect. Genet. Evol.* 2009, 9 (6): 1158-1116.
18. Forbi J.C., Purdy M.A., Campo D.S. et al. Epidemic history of hepatitis C virus infection in two remote communities in Nigeria, West Africa. *J. Gen. Virol.* 2012, 93: 1410-1421.
19. Gededzha M.P., Selabe S.G., Kyaw T. et al. Introduction of new subtypes and variants of hepatitis C virus genotype 4 in South Africa. *J. Med. Virol.* 2012, 84 (4): 601-607.
20. González-Candelas F., López-Labrador F.X. Clinical relevance of genetic heterogeneity in HCV. *Future Virology*. 2010, 5 (1): 33-49.
21. Graham R.L., Baric R.S. Recombination, reservoirs and the modular spike: mechanisms of Coronavirus cross-species transmission. *J. Virol.* 2010, 84 (7): 3134-3146.
22. Guan Y., Smith G.J., Webby R., Webster G. Molecular epidemiology of H5N1 avian influenza. *Rev. Sci. Tech.* 2009, 28 (1): 39-47.
23. Hagan H., Pouget E.R., Des Jarlais D.C. A systematic review and meta-analysis of interventions to prevent hepatitis C virus infection in people who inject drugs. *J. Infect. Dis.* 2011, 204: 74-83.
24. Hanafiah K.M., Groeger J., Flaxman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis C Virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013, 57 (4): 1333-1342.
25. Hall H.I., Song R., Rhodes P. et al. HIV Incidence Surveillance Group. Estimation of HIV Incidence in the United States. *JAMA*. 2008, 300 (5): 520-529.
26. HCV Epidemiology in the United States. Hepatitis C online PDF created December 27, 2014.
27. Hedskog C., Doehle B., Chodavarapu K. et al. Characterization of hepatitis C virus intergenotypic recombinant strains and associated virological response to sofosbuvir/ribavirin. *Hepatology*. 2015, 61 (2): 471-480.
28. Jardim A.C., Bittar C., Matos R.P. et al. Analysis of HCV quasispecies dynamic under selective pressure of combined therapy. *BMC Infect. Dis.* 2013, 13: 61 doi:10.1186/1471-2334-13-61.
29. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnius LO. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J. Virol.* 2002, 76 (8): 4034-4043.
30. Kapoor A., Simmonds P., Scheel T.K. et al. Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. *mBio*. 2013, 4 (2): e00216-13.

31. Lauck M., Sibley S.D., Lara J. et al. A novel hepacivirus with an unusually long and intrinsically disordered NS5A protein in a wild Old World primate. *J. Virol.* 2013, 87 (16): 8971-8981.
32. Li C., Cao H., Lu L., Murphy D. Full-length sequences of 11 hepatitis C virus genotype 2 isolates representing five subtypes and six unclassified lineages with unique geographical distributions and genetic variation patterns. *J. Gen. Virol.* 2012, 93 (6): 1173-1184.
33. Li C., Lu L., Murphy D.G. et al. Origin of hepatitis C virus genotype 3 in Africa as estimated through an evolutionary analysis of the full-length genomes of nine subtypes, including the newly sequenced 3d and 3e. *J. Gen. Virol.* 2014, 95 (Pt. 8): 1677-1688.
34. Lu L., Li C., Xu Y., Murphy D.G. Full-length genomes of 16 hepatitis C virus genotype 1 isolates representing subtypes 1c, 1d, 1e, 1g, 1h, 1i, 1j and 1k, and two new subtypes 1m and 1n, and four unclassified variants reveal ancestral relationships among subtypes. *J. Gen. Virol.* 2014, 95 (7): 1479-1487.
35. Lyons S., Kapoor A., Sharp C. et al. Nonprimate hepaciviruses in domestic horses, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18 (12): 1976-1982.
36. Magiorkinis G., Magiorkinis E., Paraskevis D. et al. The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Med.* 2009, 6 (12): e1000198.
37. Marascio N., Matera G., Quirino A. et al. Eleven-year distribution pattern of hepatitis C virus in southern Italy. *J. Pathog.* 2012, e631095: 1-7.
38. Markov P.V., Pepin J., Frost E. et al. Phylogeography and molecular epidemiology of hepatitis C virus genotype 2 in Africa. *J. Gen. Virol.* 2009, 90 (9): 2086-2096.
39. Markov P.V., van de Laar T.J., Thomas X.V. et al. Colonial history and contemporary transmission shape the genetic diversity of hepatitis C virus genotype 2 in Amsterdam. *J. Virol.* 2012, 86 (14): 7677-7687.
40. Martin N.K., Vickerman, P., Grebely J. et al. Hepatitis C virus treatment for prevention among people who inject drugs: Modeling treatment scale-up in the age of direct-acting antivirals. *Hepatology.* 2013, 58: 1598-1609.
41. Messina J.P., Humphreys I., Flaxman A. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2015, 61 (1): 77-87.
42. Miglioresi L., Riva E., Antonelli G. et al. Localization of hepatitis C virus in gastrointestinal mucosa: a possible reservoir for relapse. *Hepatology.* 2003, 38 (3): 775.
43. Nelson P., Mathers B., Cowie B. et al. The epidemiology of viral hepatitis among people who inject drugs: results of global systematic reviews. *Lancet.* 2011, 378 (9791): 571-583.
44. Njouom R., Frost E., Deslandes S. et al. Predominance of hepatitis C virus genotype 4 infection and rapid transmission between 1935 and 1965 in the Central African Republic. *J. Gen. Virol.* 2009, 90 (10): 2452-2456.
45. Pavlova B.P., Schaff Z., Eder G. Novel hepatitis C-positive cell line derived from a chimpanzee with chronic HCV infection. In: *Frontiers in viral hepatitis.* Ed. R.F. Shinasi et al. Elsevier, 2003, p. 187-196.
46. Pfaender S., Brown R.J.P., Pietschmann T., Steinmann E. Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. *Emerg. Microb. Infect.* 2014, 3 (e21): doi:10.1038/emi.2014.19.
47. Pybus O.G., Barnes E., Taggart R. et al. Genetic history of hepatitis C virus in East Asia. *J. Virol.* 2009, 83 (2): 1071-1082.
48. Pybus O.G., Charleston M.A., Gupta S. et al. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science.* 2001, 292 (5525): 2323-2325.
49. Pybus O.G., Cochrane A., Holmes E.C., Simmonds P. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect. Genet. Evol.* 2005, 5 (2): 131-139.
50. Pybus O.G., Markov P.V., Wu A., Tatem A.J. Investigating the endemic transmission of the hepatitis C virus. *Int. J. Parasitol.* 2007, 37 (8): 839-849.

Поступила 10.05.15

Контактная информация: Калинина О.В.,
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, п.т. (812)233-20-92

РЕЦЕНЗИИ И КРИТИКА

© В.И. ПОКРОВСКИЙ, 2016

Г.Г. О н и щ е н к о, А.Н. Ку л и ч е н к о (ред.). XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры 2014 года в г. Сочи. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Тверь, Триада-Х, 2015, 575 с., 500 экз.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 113—114

Хорошо известно, что массовые скопления людей при организации значимых мероприятий локально увеличивают угрозу эпидемических вспышек, а международный статус таких событий может привести к распространению инфекционных болезней по всему миру. В связи с этим, проблемы биологической безопасности во время крупных массовых мероприятий в настоящее время приобретают все большее значение.

Наиболее важными и массовыми спортивными событиями в мире являются Олимпийские игры. Вследствие необходимости привлечения большого количества людей для обслуживания игр, задействования значительных территорий, продолжительности, международного участия — эти мероприятия требуют исключительно высокого уровня готовности служб здравоохранения. Поэтому первостепенное значение приобретает разработка стратегии предотвращения эпидемиологического риска и реагирования на них. При этом профилактическое направление работы имеет решающее значение. В связи с вышесказанным, представленная монография является актуальной и своевременной.

Авторский коллектив монографии представлен ведущими специалистами Роспотребнадзора, в том числе имеющими богатый практический опыт участия в противоэпидемических мероприятиях при чрезвычайных ситуациях.

В объемном труде изложены основные принципы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия при подготовке и проведении XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в г. Сочи, представлены основные результаты проведенной огромной и важной работы по совершенствованию системы санитарно-эпидемиологического надзора с учетом особенностей мероприятия, включающие: определение приоритетных направлений деятельности, создание необходимой нормативно-методической базы, планирование профилактических программ; реализацию мер, направленных на улучшение и охрану здоровья населения.

Авторами проведен анализ международного опыта в обеспечении мер санитарно-эпидемиологического благополучия при проведении Олимпийских игр. Рассмотрены этапы становления системы биологической безопасности при массовых мероприятиях, включающей меры по профилактике вспышек инфекций, использование компьютерных и информационных технологий.

Логично и последовательно выстроена стратегия создания во многом обновленной и усовершенствованной системы профилактики инфекционных осложнений. На основании санитарно-эпидемиологической характеристики территории г. Сочи подчеркнуто, что в целом, состояние территории в предолимпийский период было неустойчивым, что требовала коррекции и организации контроля по многим санитарно-гигиеническим показателям.

С целью проведения санитарно-гигиенического мониторинга объектов окружающей среды в зоне проведения Олимпийских игр, на основании поведенного анализа риска была сформирована единая надзорная и лабораторная база. Для организации мониторинга объектов окружающей среды на соответствие требо-

ваниям гигиенических нормативов во время Олимпийских игр разработан «Порядок лабораторного обеспечения исследований проб окружающей среды в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в г. Сочи», в котором был представлен перечень контролируемых объектов, точки и кратность отбора проб, анализируемые показатели, лабораторные базы, ответственные за проведение исследований, и алгоритм взаимодействия между ними.

В монографии убедительно доказана важность мониторинга и оценки эпидемиологического риска как основы формирования направлений профилактической работы при подготовке и проведении Олимпийских зимних игр 2014 г. в г. Сочи. Обобщен опыт работы специалистов Роспотребнадзора, органов и учреждений здравоохранения, принимавших участие в организации медицинского и противоэпидемиологического обеспечения, проведении профилактических мероприятий инфекционных болезней, организации информационного обеспечения с использованием современных информационных технологий в практике санитарно-эпидемиологического надзора в период проведения Олимпийских игр. Показана важность создания системы лабораторного мониторинга санитарно-эпидемиологической обстановки. Получил дальнейшее обобщение опыт работы модернизированных специализированных противоэпидемиологических бригад Роспотребнадзора, обеспечивающих усиление санитарно-эпидемиологического надзора и службы здравоохранения при проведении массовых мероприятий.

Одной из главных особенностей деятельности Роспотребнадзора по совершенствованию сферы защиты прав потребителей в период проведения Олимпийских игр было создание многоуровневой системы консультирования, которая позволила повысить социальную защищенность, потребительскую и правовую грамотность населения г. Сочи и гостей Олимпийских игр.

Результаты обеспечения органами Роспотребнадзора исполнения функций, связанных с надзором в области защиты прав потребителей в период подготовки и проведения Игр, позволили сформировать необходимую правоприменительную практику, предметный анализ и использование которой будут востребованы при подготовке и проведении масштабных спортивных и иных мероприятий.

Рассмотрены вопросы медицинского обеспечения участников и гостей Олимпийских игр, подготовки инфекционной госпитальной базы и организации специализированной медицинской помощи больным, а также работа службы медицины катастроф.

Анализ проведенной работы, ориентированной на особенности данного мероприятия, объективно свидетельствует о создании целостной системы биологической безопасности при подготовке к Олимпийским зимним играм 2014 г. Главная роль при этом отводилась системному подходу и осуществлению конструктивного взаимодействия Роспотребнадзора с профильными министерствами и ведомствами. Эффективность и надежность созданной в Российской Федерации системы по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения, участников и гостей XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в г. Сочи была подтверждена на практике.

Несомненный практический интерес имеют представленные в приложении документы, демонстрирующие основные направления работы Правительства Российской Федерации, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лечебно-профилактических учреждений, принимавших участие в обеспечении биологической, химической и радиационной безопасности.

Монография, несомненно, интересна для широкого круга специалистов: организаторов здравоохранения, эпидемиологов, бактериологов, инфекционистов, санитарных врачей, а также работников других ведомств и будет востребована при проведении в нашей стране других международных массовых мероприятий.

В.И.Покровский (Москва)

ХРОНИКА

ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ И ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ ИСТОРИИ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ 2016 ГОДА

Научно-медицинские открытия

125 лет — выделение из мокроты больных палочки — возбудителя инфлюэнцы (М.П.Афанасьев, 1891).

125 лет — открытие возбудителя дизентерии (А.В.Григорьев, 1891).

125 лет — первое успешное применение противодифтерийной антитоксической сыворотки немецким ученым Э.Берингом (E. Behring, 1891).

75 лет — разработан метод получения поливакцины (НИИСИ) для однократной иммунизации против брюшного тифа, паратифов А и В, дизентерии, холеры и столбняка (Н.И.Александров, Н.Е.Гефен, 1941).

75 лет — в СССР изготовлена в производственном масштабе сыпнотифозная вакцина (М.К.Кронтовская и др., 1941).

75 лет — разработка теоретических основ, изготовление и практическое применение живой ослабленной вакцины против туляремии (Б.Я.Эльберт, Н.А.Гайский, 1941 — 1945).

Выход в свет трудов

125 лет — «К учению о сибирской язве» (В.К.Высокович, 1891).

Основание медицинских учреждений

125 лет — Химико-бактериологический кабинет Ф.М.Блюменталя (ныне — ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи) (Москва, 1891).

125 лет — бактериологическая лаборатория при Московском университете, с 1895 г. — Бактериологический институт (Габричевский Г.Н., 1891).

21 февраля — 150 лет со дня рождения Августа ВАССЕРМАНА (A. Wassermann, 1866 — 1925), немецкого иммунолога, директора Института экспериментальной терапии в Берлине (1913). В содружестве с Бригером (L. Brieger), С.Китасато (S. Kitasato), Проскауэром (B. Proskauer) и Такаки (I. Takaki) изучал антибактериальный и антитоксический иммунитет при холере, тифах и дифтерии, а также авидитет центральной нервной системы к столбнячному токсину. Установил наличие относительного иммунитета при инфлюэнце. В 1906 г. соавт. с А. Нейссером (A. Neisser) и Бруком (C. Bruck) разработал серодиагностическую реакцию при сифилисе, получившую признание во всем мире (реакция Вассермана). Вместе с В.Колле (W. Kolle) издавал «Руководство по патогенным микроорганизмам» («Handbuch der pathogenen Mikroorganismen») (1902 — 1909) в 6 томах, переведенное на основные европейские языки.

23 февраля — 125 лет со дня рождения Георгия Степановича КУЛЕШИ (1866 — 1930, род. в г. Белом Смоленской губернии), российского патологоанатома и микробиолога. Был директором Севастопольского бактериологического института (1923 — 1926) и Кубанского научно-исследовательского медицинского института (1926 — 1930), заведовал кафедрами патологической анатомии в Крымском университете в Симферополе и Кубанском медицинском институте (ныне

*Составитель Н.А.Емельянова (под ред. М.В.Поддубного, отдел истории медицины и здравоохранения Национального НИИ общественного здоровья им. Н.А.Семашко).

Кубанский медицинский университет). Исследования посвящены изучению патогенеза чумы, холеры, возвратного тифа, проказы. Автор учебника по патологической анатомии, в котором впервые в отечественной литературе дано описание патологической анатомии инфекционных болезней по нозологическому принципу.

3 мая — 125 лет со дня рождения Германа МООЗЕРА (Музера, H. Mooser, 1891 — 1962), швейцарского микробиолога, эпидемиолога, гигиениста. Исследуя сыпной тиф в Мексике, обнаружил наличие в мезотелии пораженных оболочек яичка риккетсиоподобные образования, идентифицированные в дальнейшем в качестве возбудителя крысиного риккетсиоза — риккетсии Музера (*R. mooseri*), риккетсии тифа (*R. typhi*). Как эпидемиолог работал в Мексике, Китае, Испании.

15 июля — 100 лет со дня смерти Ильи Ильича МЕЧНИКОВА (1845 — 1916, род. в Ивановке, ныне Купянский район Харьковской обл.), выдающегося ученого, внесшего крупный вклад в биологию, патологию, иммунологию и бактериологию, одного из основоположников эволюционной эмбриологии, создателя сравнительной патологии воспаления и фагоцитарной теории иммунитета. Почетный член Петербургской академии наук (1902) и многих иностранных академий, Лауреат Нобелевской премии за работы по иммунологии (совместно с П. Эрлихом, 1908). С 1888 по 1916 гг. работал в Париже в Пастеровском институте, поддерживая тесную связь с отечественными учеными. Разрабатывал вопросы этиологии и эпидемиологии инфекционных болезней. Изучал холеру, чуму, брюшной тиф, туберкулез, сифилис и др. Ряд трудов посвящен методологическим проблемам науки. Инициатор научного изучения проблемы старости и смерти. Создал крупнейшую школу микробиологов и иммунологов. Участвовал в создании в России научно-исследовательских учреждений, разрабатывающих проблемы борьбы с инфекционными заболеваниями. Создал в Одессе первую в России (и вторую в мире) Пастеровскую станцию (1886). Ряд научно-исследовательских институтов, лечебных и учебных учреждений страны носят имя Мечникова.

3 сентября — 90 лет со дня рождения Виктора Николаевича ПАУТОВА (1926, род. в Минске), российского микробиолога, члена-корреспондента РАН, генерал-майора медицинской службы запаса. В 1973 — 1984 гг. — начальник НИИ эпидемиологии МО (г. Киров). В 1989 — 2003 гг. — ведущий научный сотрудник НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (ныне ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи). Труды посвящены вопросам биологии риккетсий, методам специфической профилактики и диагностики риккетсиозов человека, а также разработке вакцин против риккетсиозов. Им изучены особенности антигенной структуры, иммуногенности, патогенности, морфологии, репродукции и метаболизма риккетсий в зависимости от условий их обитания. Ряд работ посвящен биологии арбовирусов, иммунопрофилактике чумы и биологии псевдотуберкулеза. Внес вклад в изучение биологических свойств вирусов японского и клещевого энцефалитов, вируса омской геморрагической лихорадки, лихорадки Ку. За разработку комплекса мероприятий по борьбе с особо опасными заболеваниями человека удостоен Государственной премии (1978).

19 октября — 85 лет со дня рождения Николая Васильевича МЕДУНИЦЫНА (1931, род. в г. Архангельск), российского иммунолога, аллерголога, академика РАН, заслуженного деятеля науки. В 1969 — 1979 гг. — заместитель директора по научной работе Московского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, в 1979 — 1988 гг. — в той же должности в Институте иммунологи АМН СССР. В 1988 — 2009 гг. — директор НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. Труды посвящены изучению клеточ-

ных механизмов развития поствакцинального иммунитета, оценке иммунологической безопасности вакцин, источников их побочного действия, использованию цитокинов в качестве адъювантов при вакцинации. Обнаружил в вирусных вакцинах и других иммунобиологических препаратах противовоспалительные цитокины, способные влиять на биологическую активность препаратов. Обосновал положение об антигенах гистосовместимости как универсальных клеточных рецепторах нативных антигенов и носителях антигенной информации, определяющих иммунологическую индивидуальность человека.

10 ноября — 50 лет со дня смерти Льва Александровича ЗИЛЬБЕРА (1894 — 1966, род. в г. Медведь Новгородской обл.), российского микробиолога, вирусолога и иммунолога, академика АМН СССР. С 1939 г. — заведующий отделом вирусологии Центрального института эпидемиологии и микробиологии Наркомздрава РСФСР, с 1945 г. — заведующий отделом иммунологии и злокачественных опухолей в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи АМН СССР (ныне ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи). Одновременно с 1946 — 1956 гг. заведовал лабораторией Московского научно-исследовательского института им. П.А.Герцена (ныне МНИОИ им. П.А.Герцена). Лауреат Государственных премий СССР 1946 г. за монографию «Эпидемические энцефалиты» и 1967 г. за открытие патогенности куриной саркомы Рауса для млекопитающих. Первым в нашей стране начал изучение онкогенных вирусов. Положил начало новой области онкологии — иммунологии рака. С 1945 г. занимался обоснованием и разработкой вирусной теории происхождения рака.

9 декабря — 80 лет со дня рождения Вячеслава Васильевича ШКАРИНА (1936, род. в с. Сухая Вейка Горьковской обл.), российского эпидемиолога, члена-корреспондента РАН, заслуженного деятеля науки и заслуженного врача. В 1987 — 2007 гг. — ректор и одновременно (с 1988 г.) заведующий кафедрой эпидемиологии Горьковского медицинского института (ныне Нижегородская государственная медицинская академия). С 2007 г. — президент Нижегородской государственной медицинской академии. Научные исследования посвящены проблемам эпидемиологии и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), токсоплазмоза и ряда других инфекционных заболеваний. Разработал систему выявления больных, профилактических и противоэпидемических мероприятий, принципы проспективного наблюдения за ИСМП. Впервые в мире выделил возбудитель токсоплазмоза из крови больного. Инициатор выпуска журнала «Здравоохранение Приволжского федерального округа», главный редактор «Нижегородского медицинского журнала» (1992 — 2007 гг.), журнала «Медицинский альманах» (с 2007 г.).

16 декабря — 150 лет со дня рождения Даниила Кирилловича ЗАБОЛОТНОГО (1866 — 1929, род. в селе Чеботарка Подольской губернии, ныне село Заболотное Винницкой обл., Украина), отечественного микробиолога и эпидемиолога, академика АН УССР (1922) и АН СССР (1929). В 1898 г. организовал и возглавил первую в России кафедру бактериологии в Петербургском женском медицинском институте (позже I Ленинградский медицинский институт, ныне Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова). В 1920 г. создал первую в стране самостоятельную кафедру эпидемиологии в г. Одесса, в 1923 г. — кафедру микробиологии и эпидемиологии с курсом дезинфекции в Военно-медицинской академии. Труды посвящены изучению чумы, холеры и сифилиса. Сформулировал основные положения о природной очаговости чумы и о роли грызунов в сохранении чумы в природе, заложив основы современного учения об эпидемиологии чумы и системы мероприятий по борьбе с ней. Создал основы целостного учения об эпидемиологии холеры.

НЕКРОЛОГИ

ПАМЯТИ АНДРЕЯ НИКОЛАЕВИЧА МАЯНСКОГО (1940—2015)

9 ноября 2015 г. на 75 году жизни скончался Андрей Николаевич Маянский, д.м.н., профессор, старейший сотрудник Нижегородской государственной медицинской академии.

Маянский Андрей Николаевич окончил Казанский медицинский институт по специальности лечебное дело, работал в Казанском НИИ эпидемиологии и микробиологии, где прошел путь от аспиранта до руководителя отдела иммунологии и аллергологии. В 1967 г. Маянский А.Н. защитил кандидатскую, в 1977 г. — докторскую диссертацию на тему «Внутриклеточные белки аллергеноактивного комплекса энтеробактерий».

С 1981 по 2013 гг. профессор Маянский А.Н. возглавлял кафедру микробиологии и иммунологии Нижегородской государственной медицинской академии, затем работал в должности профессора кафедры. Маянский А.Н. был одним из ярких представителей отечественной научной школы фундаментальной микробиологии и иммунологии. Под его руководством были защищены 5 докторских и 42 кандидатские диссертации, он — автор свыше 260 научных и учебно-методических работ, обладатель 20 авторских свидетельств. Основное направление научных работ Маянского А.Н. — изучение эффекторных механизмов врожденного иммунитета при взаимодействии с микробными патогенами. Значительная часть трудов Маянского А.Н. была посвящена изучению физиологических и патологических аспектов реактивности фагоцитов, в частности, нейтрофильных гранулоцитов, а также проблемам микробной резистентности слизистых оболочек. Итогом стали монографии «Очерки о нейтрофиле и макрофаге» (совм. с Д.Н.Маянским), «Реактивность нейтрофила» и «Клинические аспекты фагоцитоза». Под редакцией Маянского А.Н. был издан сборник научных трудов «Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций».

Маянский А.Н. являлся членом-корреспондентом РАЕН (с 1994 г.), членом редакционного совета журнала «Иммунология» (Москва), членом редколлегии журнала «Цитокины и воспаление» (С.-Петербург), редакционного совета «Нижегородского медицинского журнала». Им разработано более десятка учебно-методических пособий и сборников тест-заданий для студентов, выпущены книги «Микробиология для врачей», «Патогенетические аспекты микробиологии» и «Лекции по иммунологии».

Светлая память об Андрее Николаевиче Маянском сохранится в сердцах его коллег, врачей и студентов.

ПАМЯТИ ОЛЕГА ИВАНОВИЧА КИСЕЛЁВА (1945—2015)

24 ноября 2015 г. на 71 году жизни скончался Олег Иванович Киселёв, д.б.н., профессор, академик РАН, директор ВНИИ гриппа (С.-Петербург).

Олег Иванович Киселёв родился в Магнитогорске 5 сентября 1945 года. Закончил Ленинградский государственный медицинский институт им. И.П.Павлова. По окончании в 1968 г. поступил в аспирантуру НИИ экспериментальной медицины АМН СССР в лабораторию биохимической генетики. В 1971 году защитил кандидатскую диссертацию, в 1982 году получил степень доктора биологических наук. С 1983 по 1988 гг. работал в различных учреждениях Министерства медицинской и микробиологической промышленности СССР. В 1988 году возглавил Всесоюзный научно-исследовательский институт гриппа (С.-Петербург).

Олег Иванович Киселёв был одним из ведущих специалистов в области биохимии, молекулярной биологии вирусов и биологической безопасности. Под его руководством выполнялись работы по конструированию противовирусных препаратов, созданию генно-инженерных вакцин. О.И.Киселёвым создана школа молекулярных биологов и генных

инженеров. Он являлся инициатором и участником международных научных проектов. В качестве советника ВОЗ и руководителя Национального Центра по гриппу ВОЗ О.И.Киселёв внес значительный вклад в развитие международного сотрудничества по вопросам надзора и контроля за гриппом и ОРВИ на территории России и в мире.

О.И.Киселёв возглавлял Совет Санкт-Петербургского отделения Российского общества биохимиков и молекулярных биологов РАН, входил в состав редколлегии ЖМЭИ и других редколлегий научных и медицинских журналов, был Лауреатом премий Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

Светлая память об Олеге Ивановиче Киселёве навсегда сохранится в наших сердцах.

ПАМЯТИ АРИАДНЫ СЕМЁНОВНЫ ЛАБИНСКОЙ (1922 — 2015)

6 декабря 2015 года на 94 году жизни скончалась Ариадна Семёновна Лабинская, известный микробиолог, к.м.н., автор многочисленных книг, руководств и статей по медицинской микробиологии.

А.С.Лабинская родилась 10 июня 1922 г. в Новороссийске. После окончания Североосетинского мединститута была направлена в Москву в Центральный институт усовершенствования врачей для дальнейшей специализации по микробиологии. После окончания обучения она поступила в аспирантуру на кафедру микробиологии. Кандидатскую диссертацию Лабинская А.С. защитила по теме «Пиогенные инфекции». Затем она перешла в Институт нормальной и патологической физиологии и занималась разработкой схем вакцинации (в частности, против столбняка и дизентерии). Через 5 лет поступила в Институт санитарии и гигиены им. Ф.Ф.Эрисмана, где занималась вопросами промышленной микробиологии (проблема фенол-расщепляющих бактерий).

В 1960 г. А.С.Лабинская стала зав. лабораторией по изучению стрептококковой инфекции в Институте ревматизма. Научно-практические разработки этих лет стали важнейшим вкладом А.С. Лабинской в проблему изучения роли стрептококков в возникновении и рецидиве ревматического процесса. Лаборатория изготавливала диагностические групповые и типовые стрептококковые сыворотки, обеспечивая серотипирование стрептококков, циркулировавших в СССР.

Лабинская А.С. одновременно вела работу как педагог, обучала ординаторов и аспирантов. В этот период было подготовлено 11 кандидатов наук, написано более 200 статей и рефератов, запатентована среда для стрептококков. В 1988 г. А.С.Лабинская ушла на пенсию. Первая монография А.С.Лабинской «Практикум по микробиологическим методам исследования» вышла в 1963 г., эта книга была началом целого цикла книг, в том числе с привлечением других авторов, наиболее авторитетных специалистов в медицинской микробиологии, иммунологии, санитарии. Почти до последних дней А.С.Лабинская продолжала работать.

Прекрасный образ А.С.Лабинской как эталон учёного и учителя останется в сердцах тех, кто общался с ней, учился у неё и будет пользоваться созданными ею трудами.

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ ЗА 2015 ГОД

- Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Капранов Н.И., Сиянова Е.А., Медведева О.С., Кондратьева Е.И., Алексеева Г.В., Красовский С.А., Усачева М.В., Амелина Е.Л.* Антибиотикочувствительность *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и бактерий *Burkholderia ceracia* complex, персистирующих в легких больных муковисцидозом (МВ) . VI, 3—10.
- Агейченко А.В., Калуцкий П.В., Медведева О.А., Королев В.А.* Влияние поликомпонентных пробиотиков на состав микробиоценоза толстого кишечника при экспериментальном дисбиозе. IV, 80—84.
- Агейченко А.В., Калуцкий П.В., Медведева О.А., Королев В.А.* Изменение состава микробиоценоза толстого кишечника и антиоксидантных свойств колоноцитов в условиях экспериментального дисбиоза и профилактики эмоксипином. IV, 84—88.
- Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф.* Метагеномные исследования и диагностика инфекционных заболеваний. II, 81—89.
- Андрющенко С.В., Перунова Н.Б.* Кислотно-основная модуляция активности лизоцима в среде культивирования энтеробактерий. IV, 45—48.
- Баркова И.А., Новоженина А.В., Барков А.М., Порохня С.В., Ткаченко Г.А., Липницкий А.В.* Характеристика изогенных вариантов *Bacillus anthracis* с различным содержанием плазмид вирулентности. I, 17—22.
- Бархатова О.И., Левина Г.А., Раковская И.В., Мулабаев Н.С., Гамова Н.А., Толордава Э.Р., Романова Ю.М.* Персистенция микоплазм при мочекаменной болезни. IV, 101—106.
- Батуро А.П., Романенко Э.Е., Леонова А.Ю., Ярцева А.С., Савлевич Е.Л., Мокроносова М.А.* Доминирование *Staphylococcus aureus* в микробиоценозе полости носа у детей и взрослых с инфекционным и аллергическим ринитом. I, 72—74.
- Белая Ю.А., Белая О.Ф., Петрухин В.Г., Вахрамеева М.С., Быстрова С.М., Пронин А.В.* Иммунологический мониторинг персистенции *Helicobacter pylori* в организме. IV, 106—112.
- Бондаренко В.М., Лиходед В.Г., Фиалкина С.В.* Комменсальная микрофлора и эндогенные индукторы патофизиологических реакций врожденного иммунитета. I, 81—85.
- Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В.* Анализ профилактического и лечебного действия пробиотических препаратов с позиций новых научных технологий. II, 90—104.
- Борисенко А.С., Свитич О.А., Кривцов Г.Г., Лавров В.Ф., Попова В.С., Парфенова Т.М.* Эффективность поликатионных наночастиц полиэтиленимин-полигидрозид-хитозана (ПЭИ-ПГ-ОХГ) в качестве вектора для коротких интерферирующих РНК, направленных на подавление репликации вируса простого герпеса 2 типа. III, 31—37.
- Борисова О.Ю., Алешкин А.В., Гадуа Н.Т., Бочкарева С.С., Ефимов Б.А., Чернова В.А., Алешкин В.А., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Воропаева Е.А., Рубальский Е.О., Афанасьев М.С., Караулов А.В.* Количественный и качественный состав микробиоты подмышечных впадин у практически здоровых лиц. II, 17—24.
- Брагина И.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Таран Т.В., Беляева А.И., Пакскина Н.Д., Скударева О.Н., Агапитов Д.С., Мезенцев В.М., Семенко О.В., Грижебовский Г.М., Клиндухов В.П., Оробей В.Г.* Эпидемиологическая обстановка в Республике Абхазия в 2013 — 2014 гг. и участие Роспотребнадзора в мероприятиях по ее стабилизации. II, 109—113.
- Брико Н.И., Миндлина А.Я., Полибин Р.В.* Универсальность изменений в проявлениях эпидемического процесса антропонозных инфекций за последние десятилетия. V, 12—20.
- Бурмистрова А.Л., Евдокимов А.В., Сташкевич Д.С., Филиппова Ю.Ю., Сулова Т.А.*

- Распределение двухлокусных гаплотипов генов сенсоров микробных компонентов TLR 1 и TLR 6 в основных популяциях Южного Урала. IV, 96—101.
- Бухарин О.В., Степанова Т.Ф., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Андриющенко С.В., Катаева Л.В.* Штаммоспецифичность белкового профиля представителей рода *Bifidobacterium*. II, 3—9.
- Бухарин О.В.* Инфекционная симбиология. IV, 4—9.
- Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Никифоров И.А., Бондаренко Т.А.* Иммунорегуляторные свойства метаболитов бифидобактерий при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека. IV, 89—96.
- Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н.* Роль бифидобактерий в формировании иммунного гомеостаза человека. VI, 98—104.
- Вакарина А.А., Катаева Л.В., Карпухина Н.Ф.* Рациональные аспекты использования бактериофагов. V, 76—79.
- Ванеева Н.П., Ястребова Н.Е.* Специфический иммунный ответ к отдельным капсульным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae* у здоровых доноров крови и лиц, иммунизированных пневмококковыми вакцинами. V, 20—26.
- Васильченко А.С., Рогожин Е.А., Вальшев А.В.* Биологическая активность антимикробных пептидов *Enterococcus faecium*. IV, 22—26.
- Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Волох Ю.В., Романенко Э.Е., Батура А.П., Михайлова Н.А.* Изучение протективной активности белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae* в гетерологичной системе. VI, 51—55.
- Ганковская Л.В., Хелминская Н.М., Свитич О.А., Молчанова Е.А., Греченко В.В., Соколова Е.В., Русанова К.В.* Изучение роли факторов врожденного иммунитета (TLR2, NBD-2, TNF- α , TGF- β) в патогенезе пародонтита. VI, 93—97.
- Гапон М.Н., Телесманич Н.Р., Терновская Л.Н., Чайка С.О., Чайка И.А., Микашинович З.И., Чернухина Т.Б., Твердохлебова Т.И.* Протеомный масс-спектрометрический анализ свежeweделенных штаммов эшерихий. III, 83—88.
- Гладышева И.В., Черкасов С.В.* Роль биологических свойств коринебактерий в ассоциативном симбиозе. IV, 9—17.
- Горельникова Е.А., Карпунина Л.В.* Действие экзополисахаридов лактобацилл на фагоцитарную и цитокиновую активность *in vitro* и в организме животных при моделировании инфекционного процесса. V, 44—50.
- Данилова Т.А., Данилина Г.А., Аджиева А.А., Минко А.Г., Алексеева Н.В.* Формирование биопленок стрептококками группы А разных типов и изучение влияния антибиотиков на этот процесс. II, 50—54.
- Демидова Т.Н., Попов В.П., Полухина А.Н., Орлов Д.С., Мещерякова И.С., Михайлова Т.В.* Эпизоотическое и эпидемическое проявление природных очагов туляремии на территории Московской области (1965 — 2013 гг.). II, 24—31.
- Диденко Л.В., Автандилов Г.А., Смирнова Т.А., Шевлягина Н.В., Царев В.Н., Лебеденко И.Ю., Елинсон В.М., Тиганова И.Г., Романова Ю.М., Ипполитов О.В.* Исследование процессов колонизации и персистенции микроорганизмов на искусственных материалах медицинского назначения. V, 64—69.
- Долгушин И.И. О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова.* Микросимбиоз. IV, 126.
- Дубоделов Д.В., Рыбин В.В., Рихтер В.В., Ярославцев В.В., Грицик А.А., Казанова А.С., Лавров В.Ф., Семенов Г.А., Кузин С.Н.* Эффективность превентивной вакцинопрофилактики ветряной оспы в воинских коллективах. III, 78—83.
- Дудина К.Р., Кутателадзе М.М., Бокова Н.О., Знойко О.О., Абрамов Д.Д., Келли Е.И., Ющук Н.Д.* Ассоциация полиморфизма генов белков сурфактанта у больных гриппом. VI, 71—77.
- Ефременко В.И.* Влияние интактных бионаноструктур — липосом на биохимический и иммунологический статус организма. V, 80—88.
- Жебрун А.Б., Чайка Н.А.* Институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера в годы Великой Отечественной войны и блокады Ленинграда. V, 121—126.
- Заднова С.П., Смирнова Н.И.* Выявление генов антибиотикоустойчивости в штаммах *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. III, 3—10.

- Заднова С.П., Плеханов Н.А., Крепостнова И.М., Ерохин П.С., Смирнова Н.И.* Влияние осмотического и оксидативного стресса на штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. VI, 55—62.
- Зуева Е.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Тотолян Арег А.* MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов *Leptospira* spp., используемых в серодиагностике лептоспироза. VI, 28—36.
- Игнатъев Г.М., Кулак М.В., Отрашевская Е.В., Букин Е.К., Нестеров А.Е., Горбунов М.А., Михеев В.Н.* Изучение безопасности паротитной вакцины. VI, 43—50.
- Кабанов А.С., Шишкина Л.Н., Мазурков О.Ю., Скарнович М.О., Бормотов Н.И., Серова О.А., Сергеев Ал.А., Сергеев Ар.А., Селиванов Б.А., Тихонов А.Я., Агафонов А.П., Сергеев А.Н.* Оценка лечебно-профилактической эффективности химического соединения НИОХ-14 в отношении вируса экстремелии *in vivo*. I, 58—65.
- Казанова А.С., Лавров В.Ф., Зверев В.В.* Вирус *Varicella Zoster* и заболевания сосудов центральной нервной системы. III, 106—116.
- Карань Л.С., Федорова М.В., Гриднева К.А., Чайка А.Н., Ромасова Е.И.* Выявление РНК вируса Западного Нила и специфичных антител в крови доноров в Волгоградской области. II, 65—69.
- Каратаев Г.И., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю., Сёмин Е.Г.* Персистенция бактерий *Bordetella pertussis* и возможный механизм ее формирования. VI, 114—121.
- Карпунина Н.С., Бахметьев Б.А., Заикина М.В.* Признаки микробной сенсibilизации у больных с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями. I, 75—81.
- Касатов А.В., Горовиц Э.С., Кузнецова М.В., Тимашева О.А., Суханов С.Г.* Оценка биологических свойств штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, изолированных от больных остеомиелитом грудины и ребер. II, 69—74.
- Каширина О.С., Черникова М.И., Васильев Ю.М.* Сравнение иммуногенности и защитного эффекта живых холодоадаптированных и инактивированных вакцин против гриппа типа А. III, 38—46.
- Ключева С.Н., Кравцов А.Л., Шуковская Т.Н.* Влияние серотонина на иммунокомпетентные клетки биомоделей в условиях вакцинации против чумы и туляремии. I, 32—38.
- Колесников А.В., Козырь А.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А.* Современные представления о механизме активации иммунного ответа конъюгированными полисахаридными вакцинами. III, 97—106.
- Королюк А.М., Зазимко Л.А., Петровский С.В.* Когда появится новая туберкулезная вакцина? I, 86—94.
- Кормилицына М.И., Мещерякова И.С., Михайлова Т.В., Добровольский А.А.* Полимеразная цепная реакция в реальном времени в лабораторной диагностике туляремии. III, 59—63.
- Костюкова Н.Н., Бехало В.А.* Пневмококковые биопленки как форма персистенции: образование, структура, роль в патогенезе, иммунный ответ. IV, 55—62.
- Кравцов А.Л.* Проточно-цитофлуориметрическое исследование бактерицидных гранул в фагоцитах крови животных с различной видовой чувствительностью к экспериментальному заражению чумой. I, 23—31.
- Кремлева Е.А., Сгибнев А.В., Черкасов С.В.* Влияние микросимбионтов на способность вагинальных эпителиоцитов модифицировать биологические свойства бактерий. IV, 75—79.
- Круглов И.В.* Исследование особенностей гуморального иммунного ответа на основе моделирования антигенных детерминант вируса гепатита с синтетическими пептидами и генноинженерными полипептидами. V, 58—63.
- Кузькин Б.П., Ежлова Е.Б., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Демина Ю.В., Таран Т.В., Пакскина Н.Д., Харченко Т.В., Грижебовский Г.М., Савельев В.Н., Оробей В.Г., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Тешева С.Ч., Брюханова Г.Д.* Эпидемиологический риск заноса опасных и экзотических инфекционных болезней на территорию проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в Сочи. I, 115—121.
- Кузькин Б.П., Куличенко А.Н., Волынкина А.С., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Котенев*

- Е.С., Лямкин Г.И., Карцев Н.Н., Клиндухов В.П.* Применение современных методов генотипирования возбудителей инфекционных болезней в условиях оперативной работы специализированной противозидемической бригады в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр. II, 119—122.
- Кукушкин В.И., Сатушева Е.В., Александров М.Т., Морозова О.А., Пашков Е.П., Амбарцумян О.А., Амосова В.А.* Применение лазерных раман-люминесцентных технологий для оценки качества мясных продуктов и определения степени их бактериальной обсемененности. V, 70—75.
- Кулаков Ю.К., Новикова М.Д., Толмачева Т.А., Желудков М.М.* Роль лабораторных методов в эпиднадзоре за вспышками бруцеллеза на территории зоопитомника Московского зоопарка. II, 31—38.
- Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Саппо С.Г., Миронова Л.В., Марков Е.Ю., Мальник В.В., Корзун В.М., Миткеева С.К., Балахонов С.В.* Биопленка холерного вибриона: получение, характеристика и роль в резервации возбудителя в водной окружающей среде. I, 3—11.
- Кульшань Т.А., Заднова С.П., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И.* Оценка функциональных особенностей и стрессоустойчивости изогенных токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. III, 11—17.
- Курбатова Е.А., Ахматова Н.К., Егорова Н.Б., Семенова И.Б., Ястребова Н.Е., Цветков Ю.Е., Сухова Е.В., Яшунский Д.В., Нифантьев Н.Э.* Эпитопная специфичность синтетического дисахарида, повторяющегося звена капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3. III, 46—53.
- Лебедева А.М., Старикова Э.А., Бутова Л.А., Фрейдлин И.С., Самойлова К.А.* Моноциты крови человека как мишень действия компонентов *Streptococcus pyogenes*. I, 39—45.
- Макарова М.В., Сафонова С.Г., Исаева Ю.Д., Крылова Л.Ю., Носова Е.Ю., Литвинов В.И.* Определение критической концентрации химиопрепаратов для оценки лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с помощью тест-системы Sensititre MусоТВ. III, 63—67.
- Максимова О.В., Зайцева Е.В., Мазурина С.А., Ревакина В.А., Гервазиева В.Б.* Микробиота кишечника у детей с ожирением и аллергическими заболеваниями. III, 53—58.
- Маркушин С.Г., Цфасман Т.М., Терехов А.В., Лисовская К.В., Аكوпова И.И.* Холодоадаптированный (ХА) штамм А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) — перспективный штамм-донор аттенуации для получения живых гриппозных вакцин. V, 27—32.
- Мещерякова И.С., Транквилевский Д.В., Квасов Д.А., Михайлова Т.В., Кормилицына М.И., Демидова Т.Н., Степкин Ю.И., Жуков В.И.* Оценка современной эпизоотической активности природных очагов туляремии в Воронежской области с помощью иммуно-серологического и молекулярно-генетического исследования основных носителей возбудителя. I, 11—17.
- Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Кутырев В.В.* Современные тенденции в конструировании рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы. III, 116—126.
- Миллер Г.Г., Мухачев А.А., Быковский А.Ф.* Взаимосвязь клеточного микровезикулярного транспорта с персистенцией патогенов *in vitro* и *in vivo*. IV, 63—70.
- Набока Ю.Л., Коган М.И., Гудима И.А., Ибишев Х.С., Пасечник Д.Г., Логвинов А.К., Илмдаров Ш.Б.* Микробиота нижних мочевых путей и половых органов здоровых мужчин и при инфертильности. I, 65—71.
- Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Федотов А.Ю., Гайдерова Л.А., Лисаков А.Н., Ночевный В.Т.* Перспективная культуральная модель для контроля биологической активности интерферонов человека. V, 39—44.
- Наровлянский А.Н., Седов А.М., Пронин А.В., Шульженко А.Е., Санин А.В., Зуйкова И.Н., Шубелко Р.В., Савченко А.Ю., Парфенова Т.М., Измestьева А.В., Измestьева Ан.В., Григорьева Е.А., Супрун О.В., Зубашев И.К., Козлов В.С.* Лечение больных с хронической рецидивирующей герпесвирусной инфекцией генитальной локализации: клиническое исследование препарата Фортепреп®. IV, 112—118.

- Немцева Н.В.* Гидробиоценозы – модельная система ассоциативного симбиоза. IV, 49–54.
- Нечаева О.В., Тихомирова Е.И., Заярский Д.А., Вакараева М.М.* Антимикробная активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода. III, 88–92.
- Николенко В.В., Фельдблюм И.В., Воробьева Н.Н., Голоднова С.О., Семериков В.В., Полушкина А.В., Павроз К.А.* Опыт использования иммунохроматографического теста для диагностики пневмококковой пневмонии. III, 18–24.
- Николенко М.В., Тимохина Т.Х., Паромова Я.И.* Влияние флуконазола на временную организацию биологических свойств *Candida albicans*. IV, 30–35.
- Онищенко Г.Г., Брагина И.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Горский А.А., Гуськов А.С., Аксенова О.И., Иванов Г.Е., Клиндухов В.П., Николаевич П.Н., Гречаная Т.В., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Манин Е.А., Пархоменко В.В., Куличенко О.А.* Основные направления деятельности по формированию и организации работы системы санитарно-эпидемиологического обеспечения в период подготовки к проведению XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в Сочи. I, 94–100.
- Онищенко Г.Г., Брагина И.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Мельникова А.А., Пакскина Н.Д., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Балаева М.И., Тешева С.Ч., Бирюков В.А., Куличенко А.Н., Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Оробей В.Г.* Совершенствование мероприятий по профилактике инфекционных болезней при подготовке и проведении XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в Сочи. I, 101–108.
- Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Брагина И.В., Кузькин Б.П., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Гуськов А.С., Иванов Г.Е., Чикина Л.В., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Тешева С.Ч., Куличенко А.Н., Ефременко Д.В., Манин Е.А., Кузнецова И.В., Пархоменко В.В., Куличенко О.А., Рафеенко Г.К., Щербина Л.И., Завора Д.Л., Брюханов А.Ф., Елдинова В.Е., Юничева Ю.В., Дерлятко С.К., Комарова Н.С.* Особенности функционирования и взаимодействия диагностических лабораторий, задействованных в обеспечении защиты от инфекционных болезней, при проведении XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 в Сочи. I, 109–114.
- Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Малецкая О.В., Таран Т.В., Дубянский В.М., Семенко О.В., Агапитов Д.С., Грижебовский Г.М., Манин Е.А., Клиндухов В.П., Оробей В.Г., Антоненко А.Д.* Анализ зарубежного опыта обеспечения биологической безопасности при проведении Олимпийских игр. II, 105–109.
- Онищенко Г.Г., Демина Ю.В., Ежлова Е.Б., Пакскина Н.Д., Вяльцина Н.Е., Плотникова О.А., Яковлев А.Г., Плотникова Е.Г., Калугина С.Е., Панкратова О.А.* Вспышки орнитоза среди жителей Оренбургской и Курганской областей в 2008 – 2009 годах. III, 92–96.
- Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Москвитина Э.А., Пеньковская Н.А., Листопад С.А., Титова С.В., Кругликов В.Д.* Определение типов эпидемических проявлений холеры в субъектах Крымского федерального округа (Республика Крым). VI, 37–43.
- Островская О.В., Холодок Г.Н., Ивахнишина Н.М., Морозова Н.В., Каравянская Т.Н., Голубева Е.М., Резник В.И., Савосина Л.В., Лебедева Л.А., Присяжнюк Е.Н., Козлов В.К.* Мониторинг возбудителей гриппа и острых респираторных заболеваний у детей, госпитализированных с внебольничными пневмониями в эпидемический сезон 2012 – 2013 гг. II, 59–65.
- Панасовец О.П., Усаткин А.В., Шмайленко О.А.* Биологические свойства сальмонелл, выделенных из клинического материала и водной среды в Ростовской области. VI, 90–93.
- Патяшина М.А., Юзлибаева Л.Р.* Использование современных информационных технологий в практике эпидемиологического надзора в период проведения XXVII Всемирной летней универсиады 2013 г. в г. Казань. V, 117–121.
- Петров А.А., Лебедев В.Н., Кулиш В.С., Пышная Н.С., Стомба Л.Ф., Борисевич С.В.* Эпидемиологический анализ вспышек заболеваний, вызываемых возбудителями американских энцефалитов лошадей в эндемичных регионах. V, 103–110.

- Петров А.А., Пышная Н.С., Лебедев В.Н., Кулиш В.С., Стовба Л.Ф., Казанцев А.В., Борисевич С.В.* Выявление РНК вируса венесуэльского энцефаломиелиита лошадей в биологических пробах методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции. VI, 82—86.
- Петрова О.А., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Тотолян Арег А.* Продукция некоторых про- и противовоспалительных цитокинов при стимуляции живыми и инактивированными патогенными лептоспирами на модели цельной крови человека. VI, 23—28.
- Попова А.Ю., Кузькин Б.П., Демина Ю.В., Дубянский В.М., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Шаяхметов О.Х., Семенко О.В., Назаренко Ю.В., Агапитов Д.С., Мезенцев В.М., Харченко Т.В., Ефременко Д.В., Оробей В.Г., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Тешева С.Ч., Рафеенко Г.К.* Использование современных информационных технологий в практике санитарно-эпидемиологического надзора в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр в г. Сочи. II, 113—118.
- Потемкин И.А., Лопатухина М.А., Гаджиева О.А., Прохорова Е.Л., Дьяррассуба А., Исаева О.В., Кожанова Т.В., Иванова О.Е., Силенова О.В., Сетдикова Н.Х., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.* Распространенность маркеров гепатита Е у детей. II, 38—46.
- Рыбальченко О.В., Степанова О.М., Орлова О.Г., Астафьев А.М., Кудрявцев А.А., Капустина В.В.* Влияние импульсно-периодического коронного разряда на жизнеспособность клеток *Escherichia coli* M17 в биопленках. VI, 17—23.
- Савельева И.В., Хацуков К.Х., Савельева Е.И., Москвитина С.И., Ковалев Д.А., Савельев В.Н., Куличенко А.Н., Антоненко А.Д., Бабенышев Б.В.* Совершенствование лабораторной диагностики холеры, обусловленной генетически измененными (гибридными) вариантами холерного вибриона биовара Эль Тор. I, 46—51.
- Семененко Т.А., Суслов А.П.* Иммунопатогенез скрытой инфекции, вызванной вирусом гепатита В. VI, 105—113.
- Сергеев В.И., Тряслобова М.А., Кудреватых Е.В., Кузовникова Е.Ж.* Проявления эпидемического процесса и пути передачи возбудителя энтеровирусного серозного менингита. VI, 87—90.
- Сиволодский Е.П.* Селективно-дифференциальная питательная среда «Shewanella IRHLS Agar» для выделения бактерий рода *Shewanella*. II, 46—49.
- Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Пантюхов В.Б., Борисевич С.В., Меркулов В.А.* Опыт изучения и возможные пути устранения ложноположительных и ложноотрицательных результатов при проведении полимеразной цепной реакции на примере выявления РНК вируса Хунин. VI, 78—82.
- Сычева М.В., Карташова О.Л.* Биологические свойства энтерококков различного происхождения. IV, 17—21.
- Тарасевич И.В., Шпынов С.Н., Пантюхина А.Н.* Болезнь Брилля-Цинссера как следствие персистенции *Rickettsia prowazekii* у переболевших эпидемическим сыпным тифом (эпидемиологические аспекты). IV, 118—124.
- Тарасов М.А., Гаранина С.Б., Кресова У.А., Поршаков А.М., Ляпин М.Н., Рябова А.В., Толоконникова С.И., Шилов М.М., Удовиков А.И., Григорьева Г.В., Яковлев С.А.* Критерии оценки отличий разных типов очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Очаги ГЛПС в различных биотопах северной степи. II, 74—80.
- Тарасов М.А., Гаранина С.Б., Кресова У.А., Поршаков А.М., Ляпин М.Н., Рябова А.В., Толоконникова С.И., Шилов М.М., Удовиков А.И., Григорьева Г.В., Яковлев С.А.* Критерии оценки отличий разных типов очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Очаги ГЛПС в различных биотопах типичной степи. III, 67—72.
- Тартаковский И.С., Карпова Т.И., Груздева О.А., Мариненко О.В., Дронина Ю.Е.* Влияние температуры на жизнеспособность планктонных клеток и модельных биопленок *Legionella pneumophila* в воде. V, 7—12.
- Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Балабанова Л.А., Рассказов В.А.* Характеристика об-

- разования, ингибирования и разрушения биопленок *Yersinia pseudotuberculosis*, формирующихся на абиотических поверхностях. III, 72—78.
- Тимохина Т.Х., Бухарин О.В., Николенко М.В., Паромова Я.И., Перунова Н.Б. Регулирующее воздействие ассоциативной микробиоты на ритмы биологических свойств грибов и бактерий. IV, 26—30.
- Тимохина Т.Х., О.В.Бухарин, Н.Б.Перунова, Е.В.Иванова. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека. IV, 124—125.
- Трошина Н.А., Долгушин И.И., Долгушина В.Ф., Бахарева Л.И., Курносенко И.В., Надвикова Т.В. Влияние лонгидазы на микробный пейзаж цервикального канала и полости матки при лечении женщин с хроническим неспецифическим эндометритом и миомой матки. IV, 71—74.
- Туйгунов М.М., Гашимова Д.Т., Ахтареева А.А., Габидуллин Ю.З., Булгаков А.К., Давлетшина Г.К., Идиатуллина Г.А. Морфо-функциональная характеристика адгезивной активности энтеробактерий. V, 3—6.
- Уткина Т.М., Попова Л.П., Карташова О.Л., Хазеева Г.Д., Халиуллина А.А. Фенотипическая характеристика и генетические детерминанты патогенности *Staphylococcus aureus*, выделенных у бактерионосителей, проживающих на территориях с разным уровнем антропогенного загрязнения воздушной среды. IV, 35—40.
- Фальникова И.Н., Леонова Е.И., Федякина И.Т., Махмудова Н.Р., Лепеха Л.Н., Михайлова Н.А., Раснецов Л.Д., Зверев В.В., Ленёва И.А. Эффективность фуллерен-(трис-аминокапроновой кислоты) гидрата на модели экспериментальной вирусно-бактериальной пневмонии мышей. V, 32—39.
- Фам Х.Ф., Боровикова Е.А., Сидоров А.В., Каратаева А.В., Антонова Т.П., Зверев В.В. Возможность использования двухступенчатой полимеразной цепной реакции в диагностике заболеваний, вызываемых вирусом *Varicella Zoster*. III, 25—30.
- Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Иванова И.А., Беспалова И.А., Дорошенко Е.П., Галичева А.Л. Некоторые аспекты неспецифической профилактики и лечения особо опасных инфекций. V, 111—116.
- Флуер Ф.С., Николаева И.В., Павлова Т.Ю., Бондаренко В.М., Фиалкина С.В., Титарев С.И. Энтеротоксигенность штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из грудного молока у женщин, вскармливающих детей с инфекционной патологией. VI, 10—17.
- Фролова Я.Н., Харсеева Г.Г., Герасимов В.Н., Котов С.А., Дятлов И.А. Особенности морфологии биопленок, формируемых штаммами *Corynebacterium diphtheriae* gravis tox+. II, 55—59.
- Чекнев С.Б., Вострова Е.И., Апрецова М.А., Писковская Л.С., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии катионов меди и цинка. II, 9—17.
- Черникова М.И., Васильев Ю.М. Вакцины против гриппа с иммуноадьювантами: данные прямых сравнительных исследований. V, 88—102.
- Черникова М.И., Каширина О.С., Васильев Ю.М. Сравнительное изучение иммуногенности адьювантов различной природы и механизма действия на модели инактивированной вакцины против гриппа. VI, 63—71.
- Шкарин В.В., Ковалишена О.В. О существенных проблемах в эффективности эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями в Российской Федерации. VI, 121—126.
- Шмитько А.Д., Костинов М.П., Бочарова И.И., Сависько А.А., Магаршак О.О., Полищук В.Б. Трансплацентарные IgG к вирусу кори в пуповинной крови у новорожденных разных регионов Российской Федерации. I, 52—57.
- Шуплова Е.А., Фадеев С.Б., Бухарин О.В. Внутриэритроцитарная инвазия штаммов *Escherichia coli* с различным уровнем антигемоглобиновой активности в эксперименте. IV, 40—44.
- Яцышина С.Б., Агеева М.Р., Воробьева Н.С., Валдохина А.В., Елькина М.А., Горелов А.В., Малеев В.В., Покровский В.И. Аденовирусы в этиологической структуре острых респираторных вирусных инфекций в Москве в 2004 — 2014 гг. V, 50—57.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Селянская Н.А., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д., Водяницкая С.Ю., Веркина Л.М., Непомнящая Н.Б. Типирование штаммов *Vibrio cholerae* не O1/не O139, изолированных в Ростовской области в 2014 году 3
- Савилов Е.Д., Малов С.И., Малов И.В., Gantulga D., Мирошниченко И.А., Erdenebayar N., Орлова Л.С., Nyamadawa P., Dulguun B. Эпидемиологические проявления вирусного гепатита С у представителей европеоидной и монголоидной рас 9
- Филатов Н.Н., Линок А.В., Файзулов Е.Б. Некоторые особенности проявлений эпидемического процесса при острых кишечных инфекциях в Москве 17
- Онопrienko Н.Н., Аронова Н.В., Павлович Н.В. Роль различных антигенных препаратов *Francisella tularensis* в формировании реакции аллергии у человека и животных 22
- Улышина Д.В., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Жаринова Н.В., Худолеев А.А., Коготкова О.И., Ефременко В.И., Евченко Н.И., Куличенко А.Н. Особенности масс-спектрометрических белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза при подготовке культуры на разных питательных средах 29
- Останкова Ю.В., Семенов А.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Любимова Н.Е., Петрова О.А., Ананьина Ю.В., Петров Е.М. Типирование штаммов *Leptospira* spp. на основе 16S рРНК 35
- Крыжановская О.А., Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Боcharова Ю.А., Маянский Н.А. Спектр антибиотикорезистентности и распространенность ОХА-карбапенемаз среди штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных у пациентов хирургических и реанимационных отделений в Москве 40
- Фельдблум И.В., Николаева А.М., Павроз К.А., Данилина Т.В., Соснина О.Ю., Вязникова Т.В., Еришов А.Е., Трофимов Д.М., Полушкина А.В. Безопасность и иммуногенность отечественной комбинированной вакцины против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и Нib-инфекции, содержащей бесклеточный коклюшный компонент, при иммунизации взрослых 46
- Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Любасовская Л.А., Муравьева В.В., Ильина Е.Н., Сухих Г.Т. Масс-спектрометрия в микробиологической практике Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии 52

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Трифонова Т.А., Марцев А.А. Оценка и прогнозирование эпидемиологической обстановки по иксодовому клещевому боррелиозу во Владимирской области 58
- Маркина О.В., Максименко Е.В., Маркин Н.В., Селянская Н.А., Шелохович А.И., Мазрухо А.Б., Борисенко Н.И. Изучение состава экстрактов

ORIGINAL ARTICLES

- Selyanskaya, N.A., Arkhangelskaya, I.V., Vodopianov, A.S., Vodopianov, S.O., Kruglikov, V.D., Vodyanitskaya, S.Yu., Verkina, L.M., Nepomnyaschaya, N.B. Typing of *Vibrio cholerae* non O1/non O139 strains, isolated in Rostov region in 2014
- Savilov, E.D., Malov, S.I., Malov, I.V., Gantulga, D., Miroshnichenko, I.A., Erdenebayar, N., Orlova, L.S., Nyamadawa, P., Dulguun, B. Epidemiologic manifestations of viral hepatitis C in representatives of Caucasian and Mongoloid races
- Filatov, N.N., Linok, A.V., Faizuloev, E.B. Some features of manifestations of epidemic process during acute intestinal infections in Moscow
- Onoprienko, N.N., Aronova, N.V., Pavlovich, N.V. Role of various antigenic preparations of *Francisella tularensis* in formation of allergy reaction in humans and animals
- Ulshina, D.V., Kovalev, D.A., Zhironov, A.M., Zharinova, N.V., Khudoleev, A.A., Kogotkova, O.I., Efremenko, V.I., Evchenko, N.I., Kulichenko, A.N. Features of mass-spectrometric protein profiles of strains of brucellosis causative agent during preparation of culture on various nutrient media
- Ostankova, Yu.V., Semenov, A.V., Stoyanova, N.A., Tokarevich, N.K., Lyubimova, N.E., Petrova, O.A., Ananina, Yu.V., Petrov, E.M. Typing of *Leptospira* spp. strains based on 16S rRNA
- Kryzhanovskaya, O.A., Lazareva, A.V., Chebotar, I.V., Bocharova, Yu.A., Mayansky, N.A. Spectrum of antibiotic resistance and prevalence of OXA-carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* strains, isolated from patients of surgical and reanimation departments in Moscow
- Feldblyum, I.V., Nikolaeva, A.M., Pavroz, K.A., Danilina, T.V., Sosnina, O.Yu., Vyaznikova, T.V., Ershov, A.E., Trofimov, D.M., Polushkina, A.V. Safety and immunogenicity of a national combined vaccine against pertussis, diphtheria, tetanus, hepatitis B and Hib-infection, containing acellular pertussis component, during immunization of adults
- Prilutnevich, T.V., Melkumyan, A.R., Lyubasovskaya, L.A., Muravieva, V.V., Ilina, E.N., Sukhikh, G.T. Mass-spectrometry in microbiological practice of Scientific centre of obstetrics, gynecology and perinatology

SHORT COMMUNICATIONS

- Trifonova, T.A., Martsev, A.A. Evaluation and prognosis of epidemiologic situation for Lyme borreliosis in Vladimir region
- Markina, O.V., Maksimenko, E.V., Markin, N.V., Selyanskaya, N.A., Shelokhovich, A.I., Mazrukho, A.B., Borisenko, N.I. Study of composition of plant

растений, обладающих антимикробным эффектом в отношении <i>Vibrio cholerae</i> El Tor, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	63	extracts, possessing antimicrobial effect against <i>Vibrio cholerae</i> El Tor, using high-performance liquid chromatography	
<i>Саркисян Н.Г., Ганковская Л.В., Тузанкина И.А., Свитич О.А., Ронь Г.И., Шершнев В.Н., Колядина О.Н., Долгих М.А.</i> Ассоциация полиморфных маркеров в генах врожденного иммунитета у больных пародонтитом и воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей.....	67	<i>Sarkisyan, N.G., Gankovskaya, L.V., Tuzankina, I.A., Svitich, O.A., Ron, G.I., Shershnev, V.N., Kolyadina, O.N., Dolgikh, M.A.</i> Association of polymorphic markers in genes of innate immunity in patients with periodontitis and inflammatory diseases of upper respiratory tract	
ОБОЗРЫ		REVIEWS	
<i>Лопухов П.Д., Брико Н.И., Халдин А.А., Цапкова Н.Н., Лупашко О.В.</i> Папилломавирусная инфекция: основные характеристики, клинические проявления, вакцинопрофилактика	71	<i>Lopukhov, P.D., Briko, N.I., Khaldin, A.A., Tsapkova, N.N., Lupashko, O.V.</i> Papillomavirus infection: principle characteristics, clinical manifestations, vaccine prophylaxis	
<i>Попова П.Ю., Микшис Н.И.</i> Перспективы разработки живых рекомбинантных сибиреязвенных вакцин на основе условно патогенных и непатогенных микроорганизмов.....	79	<i>Popova, P.Yu., Mikshis, N.I.</i> Perspectives of development of live recombinant anthrax vaccines based on opportunistic and apathogenic microorganisms	
<i>Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербакowa С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В.</i> Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры В Российской Федерации.....	89	<i>Onischenko, G.G., Popova, A.Yu., Kutyrev, V.V., Smirnova, N.I., Scherbakova, S.A., Moskvitina, E.A., Titova, S.V.</i> Actual problems of epidemiologic control, laboratory diagnostics and prophylaxis of cholera in Russian Federation	
<i>Жебрун А.Б., Калинина О.В.</i> Вирусный гепатит С: эволюция эпидемического процесса, эволюция вируса.....	102	<i>Zhebrun, A.B., Kalinina, O.V.</i> Viral hepatitis C: evolution of the epidemiologic process, evolution of the virus	
РЕЦЕНЗИИ И КРИТИКА		BOOK REVIEWS AND CRITIQUE	
ХРОНИКА		CURRENT EVENTS	
НЕКРОЛОГИ		OBITUARIES	
УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ ЗА 2015 ГОД		AUTHOR'S INDEX FOR 2015	

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

Уважаемые читатели и авторы ЖМЭИ!

**Поддержите журнал, который издается с 1924 г.
и входит в базу данных PubMed, Scopus,
Web of Science, Chemical Abstract.**

Подпишитесь на II полугодие 2016 г.

Индексы подписки см. на стр. 2.
