

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

# ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

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

*Двухмесячный научно-практический журнал*

*Основан в 1924 г.*

2

март—апрель

МОСКВА 2019

ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

## **СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:**

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

Адрес редакции:

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

Статьи посылать: mech.inst@mail.ru

**Зав. редакцией Л.В.Иваничева**

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

**Уважаемые читатели и авторы ЖМЭИ!**

**Подписка на II полугодие 2019 г. будет проходить по каталогам:**

- 1. Каталог «Агентство Роспечать» — индекс 71 420 (текущая подписка);**
- 2. Объединённый каталог «Пресса России» — индексы  
71 436 (текущая подписка),  
10 277 (за номер, доставка заказной бандеролью),  
16 729 (льготная подписка только на 6 месяцев).**

**Редакция.**

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

Формат 70x108 1/16. Печать офсетная.

---

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

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*А.А.Вакарина, Л.В.Катаева, Т.Ф.Степанова*

### **ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии

*Цель.* Изучение влияния бактериофагов на формирование резистентности условно патогенных бактерий к антибактериальным препаратам. *Материалы и методы.* В работе изучена чувствительность 108 штаммов *Staphylococcus aureus* к стафилококковому бактериофагу, 97 штаммов бактерий рода *Klebsiella* к бактериофагу клебсиелл поливалентному, а также к антибактериальным препаратам до и после взаимодействия со специфическим бактериофагом. *Результаты.* Чувствительность бактерий *S.aureus* к стафилококковому бактериофагу составила 66,7%, литическая активность бактериофага клебсиелл поливалентного в отношении штаммов бактерий рода *Klebsiella* — 83,5%. После взаимодействия со специфическим бактериофагом зарегистрировано снижение числа чувствительных и умеренно устойчивых штаммов *S.aureus* к антибактериальным препаратам. Количество чувствительных к антибиотикам бактерии рода *Klebsiella* увеличилось под влиянием клебсиеллезного бактериофага. *Заключение.* Результаты исследования свидетельствуют о разнонаправленном влиянии бактериофагов на антибиотикочувствительность условно патогенных культур и необходимости дополнительного изучения механизмов данного воздействия с помощью современных молекулярно-генетических методов исследования.

Журн. микробиол. 2019, № 2, С. 3—7

Ключевые слова: условно патогенная микрофлора, бактериофаги, чувствительность к антибиотикам

*A.A.Vakarina, L.V.Kataeva, T.F.Stepanova*

### **INFLUENCE OF BACTERIOPHAGES ON SENSITIVITY OF CONDITIONALLY PATHOGENIC BACTERIA TO ANTIBACTERIAL PREPARATIONS**

Tyumen Research Institute of Region Infection Pathology, Russia

*Aim.* Study of the influence of bacteriophages on the formation of resistance of opportunistic bacteria to antibacterial drugs. *Materials and methods.* The sensitivity of 108 strains of *Staphylococcus aureus* to the staphylococcus bacteriophage, 97 strains of bacteria of the genus *Klebsiella* to the bacteriophage *Klebsiella* polyvalent, and also to antibacterial preparations before and after interaction with a specific bacteriophage has been studied. *Results.* The sensitivity of *S. aureus* bacteria to the staphylococcus bacteriophage was 66.7%, the lytic activity of the *Klebsiella* bacteriophage was polyvalent for strains of the *Klebsiella* genus, 83.5%. A decrease in the number of sensitive and moderately resistant strains of *S. aureus* to antibacterial drugs after interaction with a specific bacteriophage has been reported. The number of bacteria sensitive to antibiotics of the genus *Klebsiella* increased under the influence of the *Klebsiella* bacteriophage. *Conclusion.* The results of the study testify to the multidirectional influence of bacteriophages on the antibiotic susceptibility of opportunistic cultures and the need for additional study of this issue with the help of modern molecular genetic methods of research.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 3—7

Key words: conditionally pathogenic microflora, bacteriophages, antibiotic resistance

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что бактериофаги играют важную роль в эволюции бактерий и приобретении ими новых свойств благодаря феномену фаговой или лизогенной конверсии. Доказано, что фаги могут изменять морфологические признаки бактерий [1]. Присутствие большого числа фаговых частиц в популяции может привести к значительной интенсификации процессов передачи плазмид и в результате к формированию множественно устойчивых популяций [2]. Бактериофаги являются векторами для горизонтального переноса генов резистентности между бактериальными патогенами [6, 7, 10].

Бактериофаги представляют собой вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Антибактериальный эффект препаратов бактериофагов обусловлен внедрением генома фага в бактериальную клетку с последующим его размножением и лизисом инфицированной клетки [4]. Препараты бактериофагов могут использоваться в сочетании с любыми другими лечебными препаратами [3].

В настоящее время нельзя однозначно утверждать, что комбинированное использование фагов и антибиотиков будет полезным. Возможность передачи генетических детерминант резистентности к антибактериальным препаратам посредством бактериофагов показана во многих исследованиях [8 — 10]. В случаях, когда антибиотики мешают бактериальной клетке поддерживать репликацию фагов, комбинированное использование предположительно снижает эффективность лечения фагами и терапии в целом. Однако в других исследованиях, в которых фаги и антибиотики применялись одновременно (например, для лечения хронических легочных нагноений), показано, что данное сочетание улучшало результат терапии [Мозговая Ю.А., 2015]. Полагают, что использование фагов как в монотерапии, так и совместно с антибиотиками может препятствовать появлению антибиотикоустойчивых и фагоустойчивых бактериальных мутантов, так как механизмы возникновения антибиотикоустойчивости и фагоустойчивости различны [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния специфических бактериофагов на формирование резистентности условно патогенных бактерий к антибактериальным препаратам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование чувствительности к антибиотикам и влияние бактериофагов на антибиотикорезистентность проведено на 108 штаммах *Staphylococcus aureus* и на 97 культурах бактерий рода *Klebsiella* (*K.pneumoniae* — 56 штаммов и 41 — *K.oxytoca*), выделенных из различных локусов новорожденных (слизистые зева, носа, глаза, анального отверстия, пупочного остатка, кожи). Выделенные штаммы первоначально исследовались на чувствительность к специфическим бактериофагам и антибиотикам. Определялась чувствительность каждого исследуемого штамма к специфическому бактериофагу: стафилококковый бактериофаг и бактериофаг клебсиелл поливалентный (ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, г. Уфа). Чувствительность культуры к бактериофагу определяли по интенсивности мутности питательной среды. Литическую активность бактериофага оценивали как высокую, если мясо-пептонный бульон был прозрачен, как умеренную — если питательный бульон опалесцировал, как низкую, если культуральная среда после инкубации с бактериофагом оставалась мутной. В ходе проведения исследований ставился контроль стерильности питательной среды, бактериофага.

Изучение влияния бактериофага на чувствительность бактерий к антибактериальным препаратам проводилось по следующей схеме. Суточные культуры бактерий исследовали на чувствительность к антибиотикам, затем в течение 18-24 часов при 37 °С культивировали этот же штамм со специфическим бактериофагом в пробирке с мясо-пептонным бульоном (5 мл бульона + 5 капель бактериофага + петля суточной агаровой испытуемой культуры). После взаимодействия с бактериофагом из всех пробирок производился высеv на плотную питательную среду (мясо-пептон-

ный агар) с целью выделения оставшихся жизнеспособных бактериальных клеток. Выросшие колонии отщипывали на скошенный МПА. Через сутки культивирования при 37 °С готовили бактериальную суспензию ( $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл) и повторно исследовали на чувствительность к антибиотикам.

Чувствительность бактерий к антибиотикам определялась диско-диффузионным методом на среде Мюллер-Хинтон (HiMedia, Индия) в соответствии с действующими методическими указаниями [8, 9]. Изоляты бактерий рода *Klebsiella* исследовались на чувствительность к ампициллину (АМП), гентамицину (ГЕН), тетрациклину (ТЕТ), офлоксацину (ОФ), цефотаксиму (ЦТК), цефтазидиму (ЦАЗ). Штаммы бактерий *Staphylococcus aureus* исследовались на чувствительность к оксациллину (ОКС), цефалексину (ЦФЛ), цефуроксиму (ЦОС), гентамицину, офлоксацину, эритромицину (ЭРИ). В данном исследовании использовались диски антибиотиков производства Biorad (США).

Статистическая обработка результатов осуществлялась в программе «Excel» с вычислением показателей: средней арифметической, ошибки и достоверности полученных различий с использованием критерия Стьюдента. В исследовании использовались дискретные данные (типа Да/Нет — устойчивые/чувствительные). С применением лицензионной программы SPSS версия 14,0, предназначенной для научных исследований, проведен анализ таблиц сопряженности для расчета отношения шансов встречаемости исследуемых явлений в группах. Гипотеза о равенстве шансов встречаемости отвергалась, когда величина соответствующего критерия не равна 1, а его 95% доверительные интервалы не включали в себя 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделенные штаммы бактерий *S. aureus* первоначально были исследованы на чувствительность к стафилококковому бактериофагу, показатель составил 66,7 % (чувствительных штаммов 25; штаммов с промежуточной чувствительностью 47 и устойчивых — 36). Параллельно определяли чувствительность к антибактериальным препаратам. После взаимодействия с бактериофагом 38 культур не дали роста, поэтому повторно чувствительность к антибиотикам определялась у остальных 70 штаммов. Частота встречаемости резистентных (R) штаммов, штаммов с промежуточной чувствительностью (I) и чувствительных (S) в исследуемой популяции *S. aureus* представлена на рис. 1.

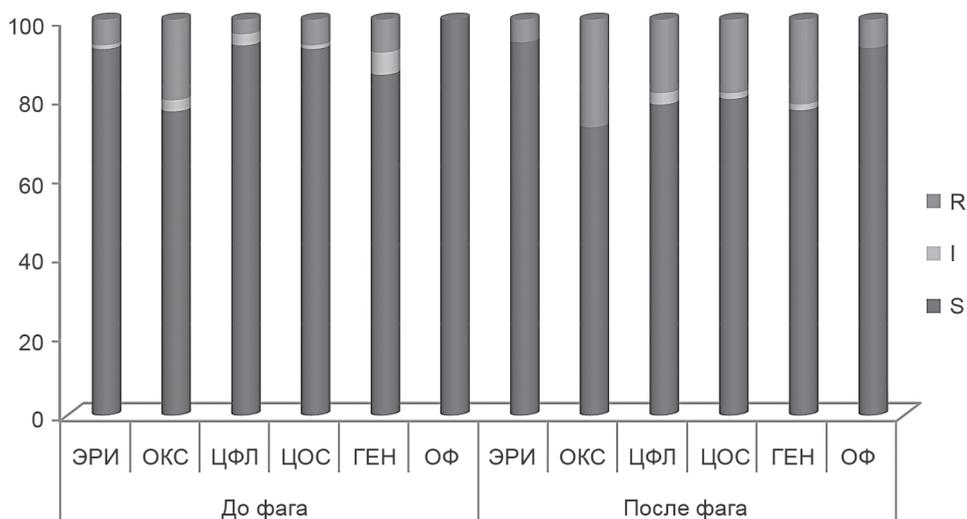


Рис. 1. Чувствительность к антимикробным препаратам бактерий *S. aureus* до и после взаимодействия со стафилококковым бактериофагом (%).

Сравнительная характеристика штаммов стафилококков по чувствительности к антибиотикам до и после взаимодействия с бактериофагом стафилококковым показала, что после взаимодействия с фагом увеличилось количество штаммов, резистентных к оксациллину и цефалоспорином (цефалексину, цефуроксиму), а также к гентамицину и офлоксацину. При этом статистически значимые различия выявлены только по гентамицину (критерий Мак-Немара).

Изучение литической активности бактериофага клебсиелл поливалентного в отношении штаммов бактерий рода *Klebsiella* показало следующие результаты: 59,8 % штаммов были чувствительными, 23,7% изолятов обладали промежуточной чувствительностью и 16,5% проявляли резистентность. Все штаммы исследованы на чувствительность к антибиотикам. Часть культур бактерий рода *Klebsiella* (50) после взаимодействия со специфическим бактериофагом лизировалась полностью, поэтому чувствительность к антибактериальным препаратам исследована у 47 штаммов. Результаты определения чувствительности клебсиелл к антибиотикам представлены на рис. 2. Статистически значимые отличия по отношению шансов регистрируются по тетрациклину — после взаимодействия бактерий с бактериофагом их чувствительность к этому антибиотику возрастает в 2 раза.

Известно, что бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, и в частности рода *Klebsiella*, обладают природной устойчивостью к ампициллину. В исследованной нами популяции клебсиелл до взаимодействия с бактериофагом выявлено 77% штаммов, обладающих природной резистентностью. После взаимодействия с бактериофагом количество резистентных штаммов в этой популяции составило 68%.

При суммировании количества чувствительных штаммов и штаммов с промежуточной чувствительностью к антибиотикам показано, что в популяции бактерий *S. aureus* после взаимодействия со специфическим бактериофагом количество штаммов S+I уменьшается, в то время как в популяции бактерий рода *Klebsiella* — увеличивается. Минимальные отличия в антибиотикограмме, скорее всего, являются проявлениями фенотипической вариабельности экспрессии определенного механизма резистентности.

Таким образом, проведенные исследования влияния бактериофагов на чувствительность бактериальных культур к антибиотикам свидетельствуют о разнонаправленных взаимодействиях в различных популяциях бактерий *in vitro*. Зарегистрирована тенденция снижения числа чувствительных и умеренно устойчивых штаммов *S.aureus* к антибактериальным препаратам после взаимодействия со

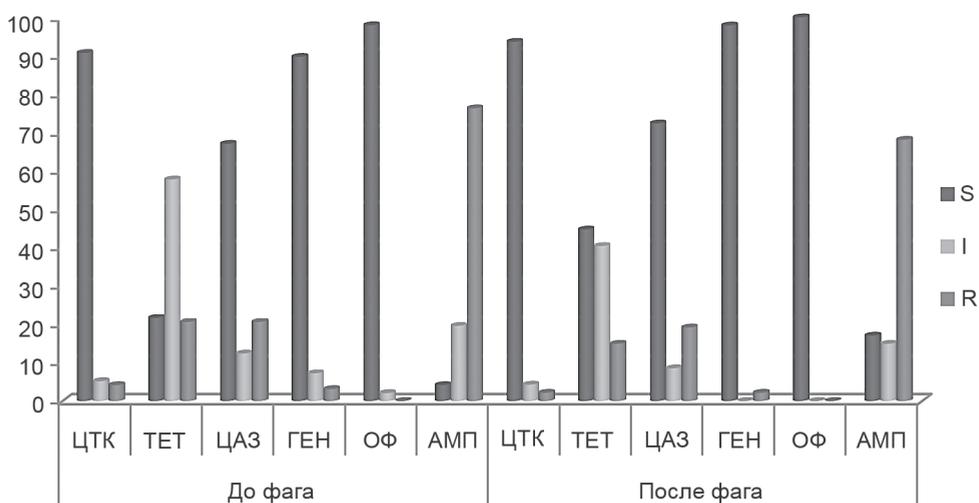


Рис. 2. Чувствительность к антимикробным препаратам бактерий рода *Klebsiella* до и после взаимодействия с бактериофагом клебсиелл поливалентным (%).

специфическим бактериофагом, достоверное снижение отмечено по гентамицину. Количество чувствительных к антибиотикам бактерий рода *Klebsiella* имеет тенденцию к увеличению под влиянием клебсиеллезного бактериофага. Выявлено достоверное увеличение штаммов чувствительных к тетрациклину. Скорее всего, это связано с морфофункциональными особенностями исследованных культур микроорганизмов.

Изучение процессов влияния бактериофагов на чувствительность к антибиотикам различных популяций бактерий будет способствовать решению важных практических проблем, связанных с успешной терапией бактериальных инфекций. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости дополнительного изучения данного вопроса с помощью современных молекулярно-генетических методов исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Асланов Б.И., Долгий А.А., Гончаров А.Е., Архангельский А.И. Роль бактериофагов в горизонтальном генетическом обмене среди возбудителей инфекций в стационарах. Эпидемиология, микробиология, инфекционные и паразитарные болезни. 2012, 4(45):38-41.
2. Зуева В.С., Дмитриенко О.А., Клицунова Н.В. Роль профагов в формировании антибиотикоустойчивых популяций стафилококков в процессе трансформации, трансдукции и конъюгации. Антибиотики и химиотерапия. 1996, 41(10):35-42.
3. Карабелеш Е.Е., Ткаченко С.А., Панкратов С.М., Демедюк О.И. Применение бактериофагов, как концепция лечебного и профилактического направления в медицине. Актуальные проблемы транспортной медицины. 2008, 1(11):135-139.
4. Красильников И.В., Лыско К.А., Лобастова А.К. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов: современное состояние применения и производства. Медицинский алфавит. Эпидемиология и санитария. 2010, 4:9-11.
5. Падруль М.М., Кобаидзе Е.Г., Олина А.А., Садыкова Г.К. «Ренессанс» фаготерапии воспалительных процессов. Современные проблемы науки и образования. 2015, 1:1358-1370.
6. Blahova J., Kralikova K., Kreméry V. et al. Low-Frequency transduction of imipenem resistance and high-frequency transduction of ceftazidime and aztreonam resistance by the bacteriophage AP-151 isolated from a *P.aeruginosa* strain. J. Chemother. 2000, 12.(6):482-486.
7. Colomer-Lluch M., Imamovic L., Jofre J. et al. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. Antimicrob. Agents. Chemother. 2011: 55(10):4908-4911.
8. Fancello L., Desnues C., Raoult D. et al. Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. J. Antimicrob. Chemother. 2011, 66(11):2448-2454.
9. Mazaheri Nezhad Fard R., Barton M.D., Heuzenroeder M.W. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. Lett. Appl. Microbiol. 2011, 52(6):559-564.
10. Varga M., Kuntová I., Pantucek R. et al. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. FEMS Microbiol Lett. 2012, 332 (2):146-152.

*Поступила 07.09.18*

Контактная информация: Катаева Любовь Владимировна, к.м.н., 625026, Тюмень, ул. Республики, 147, р.т. (3452) 28-99-98, доб. 1123

## ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ МОРФОТИПОВ КОЛОНИЙ BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI ПРИ ПЕРЕХОДЕ КУЛЬТУР В СТАЦИОНАРНОЕ СОСТОЯНИЕ И В ОРГАНИЗМЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Характеристика морфотипов колоний *Burkholderia pseudomallei* 110, полученных в различных условиях культивирования, изучение их фенотипических свойств и переключения морфологии колоний после снятия стрессового воздействия и в организме экспериментальных животных. *Материалы и методы.* Морфотипы индуцировали при пассаже *B. pseudomallei* 110 в LB, стерильной речной воде и клетках *Tetrahymena pyriformis*, идентифицировали на среде Эшдауна, классифицировали по схеме Chantratita et al. и определяли некоторые фенотипические свойства. Культуры хранили 6-10 месяцев в 0,4% Nutrient agar под вазелиновым маслом и анализировали морфологию колоний. *Результаты.* Идентифицировали 7 морфотипов колоний, обозначенных I Chl, II, III Chl, IV Chl, V, VI, VII Chl. Вариабельность морфотипов и их соотношение зависели от условий культивирования. Морфотипы отличались активностью внеклеточных ферментов, подвижностью, увеличением продукции поринов, варьированием белковых масс-спектров и снижением вирулентности. От животных при заражении всеми морфотипами выделялись культуры I Chl; при хранении отдельные морфотипы приобретали структуру исходного варианта VI (VII Chl), сходную с ним ферментативную активность и частично восстанавливали вирулентность. *Заключение.* Морфотип VI (VII Chl) *B. pseudomallei* 110 в стрессовых условиях дает начало 5 другим морфотипам, которые в организме животных переключаются в морфотип I Chl, а после снятия стрессового воздействия ревертируют в исходный морфологический вариант и восстанавливают его фенотипические свойства.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 8—13

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, *Tetrahymena pyriformis*, морфотипы, фенотипические свойства

Л.К.Меринова, Е.В.Король, Т.В.Сенина, О.А.Меринова, Т.Н.Шаров, Н.Г.Плеханова

## SWITCHING OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* COLONY MORPHOTYPES IN STATIONARY CONDITION AND IN THE ORGANISM OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Characterization of *Burkholderia pseudomallei* 110 morphotypes, obtained under various cultivation conditions, studying phenotypic characteristics and switching of colony morphology after removal of stress and in the organism of experimental animals. *Materials and methods.* Morphotypes were induced by passage of *B. pseudomallei* 110 in LB, sterile river water and in *Tetrahymena pyriformis* cells, identified on Ashdown medium, classified according to Chantratita et al., some phenotypic characteristics have been determined. Cultures of morphotypes were stored for 6-10 months in 0,4% Nutrient agar under liquid petrolatum and colony morphology was analyzed. *Results.* Seven morphotypes of colonies were identified and designated I Chl, II, III Chl, IV Chl, V, VI, and VII Chl. The variability of morphotypes and their ratio depended on cultivation conditions. Morphotypes were distinguished by the activity of extracellular enzymes, mobility, characterized by increase of porin proteins production, variation in protein mass-spectrums, and decrease of virulence. From animals infected with all morphotypes was obtained I Chl morphotype; during storage, all cultures acquired the structure of morphotype VI (VII Chl) of the original strain, similar enzymatic activity and partially restored virulence. *Conclusion.* The morphotype VI (VII Chl) *B. pseudomallei* 110 under stress conditions gives rise to 5 other morphotypes that in the animals are switched to the morphotype I Chl; after removal of the stressful effect they are reverted to the initial morphological variant and its phenotypic properties are restored.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 8—13

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, *Tetrahymena pyriformis*, morphotypes, phenotypic characteristics

## ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei*, является сапрофитным микроорганизмом, обитающим в воде и почве эндемичных территорий Юго-Восточной Азии, Северной Австралии и других тропических и субтропических регионов мира [5, 7]. Культуры *B. pseudomallei*, выделенные из объектов внешней среды, также как клинические изоляты, образуют на плотных питательных средах различные морфологические варианты колоний [9, 10], которые в работе Chantratita N. et al. на среде Эшдауна впервые были дифференцированы на отдельные морфотипы [3].

Морфотипы могут быть получены *in vitro* в условиях физиологического для бактерий стресса (лимитирования факторов питания, неоптимальной температуры выращивания, присутствия в среде антибиотиков) или *in vivo* при экспериментальной инфекции в организме животных [3, 4, 8]. Образование морфотипов связывают с феноменом переключения морфологии колоний в ответ на воздействие неблагоприятных факторов среды, наряду с изменением других фенотипических свойств (вариабельной экспрессией липополисахарида, экзополисахаридов, биопленкообразованием, подвижностью, внеклеточной секрецией ферментов) [3, 6, 12].

Исследование морфологической вариабельности представляет значительный интерес не только с точки зрения оценки адаптационных возможностей *B. pseudomallei*, но является важным для идентификации мелиоидозных культур, так как шероховатые (R) варианты колоний микроорганизма, часто выделяемые при бактериологическом анализе, отличаются широким спектром морфотипов [3, 4, 9].

В настоящей работе мы индуцировали образование морфотипов штамма *B. pseudomallei* 110 путем многократного пассажа в LB бульоне и стерильной речной воде. Дополнительно для этого использовали цилиарные инфузории *Tetrahymena pyriformis*, в которых выживание и размножение *B. pseudomallei in vitro* было установлено ранее [1].

Цель исследования заключалась в характеристике морфотипов колоний *B. pseudomallei* 110, полученных в различных условиях культивирования, изучении у них фенотипических свойств и переключения морфологии колоний после снятия стрессового воздействия и в организме экспериментальных животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали вирулентный штамм *B. pseudomallei* 110 из коллекции ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ. Аксеническая культура *T. pyriformis* получена из Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Тетрахимены выращивали в Luria-Bertani (LB) бульоне (HiMedia) при температуре 28°C.

Буркхольдерии культивировали на агаре LB при 32°C 24 ч, суспендировали в стерилизованной автоклавированием речной воде, соединяли с тетрахименами в соотношении 100:1 ( $1 \times 10^6$  м. к./мл бактерий и  $1 \times 10^4$  кл/мл тетрахимен) в LB бульоне и воде, сокультуры инкубировали при температуре 28°C. Спустя 3-4 суток, когда внутриклеточное размножение микроорганизма достигало максимума, сокультуры осаждали центрифугированием при 8000 об/мин 10 мин, отмывали в свежей среде LB или воде и вновь соединяли с проверенной на аксеничность культурой тетрахимен. С такой же периодичностью проводили пересевы в этих средах культур микроорганизма без тетрахимен. После 15 пассажей колонии из образцов культур на среде Эшдауна [2] фотографировали и анализировали полученные изображения. При идентификации морфотипов основывались на схеме Chantratita N. et al. [3].

Культуры каждого отдельного морфотипа, выделенные в условиях стресса среды, оставляли при комнатной температуре в течение 6-10 месяцев в 0,4 % Nutrient agar (HiMedia) под вазелиновым маслом, после чего исследовали морфологию колоний. У всех морфотипов до и после хранения определяли на средах с необходимыми субстратами протеазную, лецитиназную, гемолитическую активность и подвижность. Вирулентность культур оценивали по динамике гибели животных при внутрибрюшинном заражении золотистых хомячков в дозе  $1 \times 10^2$  м. к., мышей линии BALB/c и белых мышей в дозе  $1 \times 10^3$  м. к.

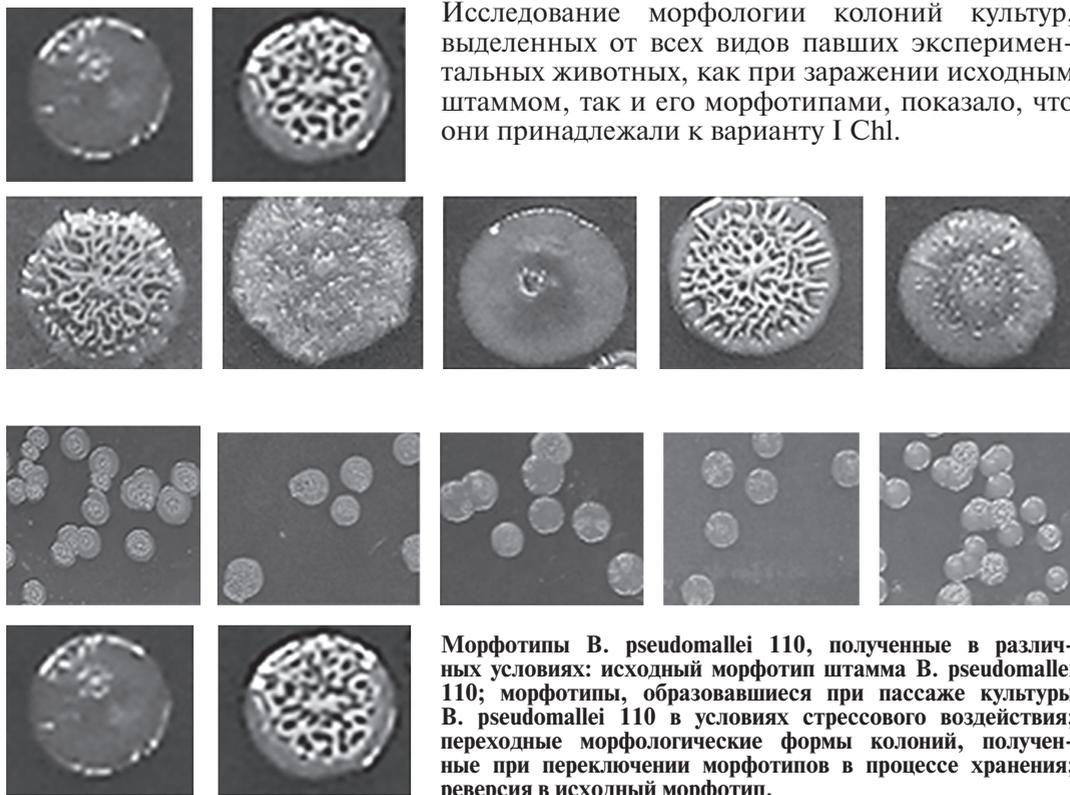
Анализ белковых спектров наружных мембран микроорганизма проводили в SDS-PAAG [11]. Регистрацию масс-спектров обшклеточных белков *B. pseudomallei* осуществляли на приборе Axima Performance (Shimadzu, Япония). При характеристике масс-спектров учитывали количество пиков, их интенсивность и места расположения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование на среде Эшдауна колоний *B. pseudomallei* 110 из культур, полученных в различных условиях, показало, что они могут быть отнесены к 7 отдельным морфотипам. Четыре морфотипа по идентификационным морфологическим признакам имели сходство с вариантами I, III, IV и VII Chantratita N. et al. и получили обозначение ChI (Chantratita like variant), в отличие от трех других (II, V, VI), пронумерованных в произвольном порядке. Исходная культура *B. pseudomallei* 110 состояла более чем на 90% из морфотипа VI в ассоциации с небольшим количеством VII ChI.

Как показано на рис., морфотип VI имел структуру гладких, глянцевых, слегка выпуклых колоний, тогда как практически все, вновь образовавшиеся при его переключении морфотипы, кроме III ChI, представляли собой шероховатые колонии, отличавшиеся текстурой поверхности, центра или края, а также цветовым оттенком. Вариабельность морфотипов в различных образцах, также как образование доминирующих вариантов, зависели от условий культивирования *B. pseudomallei* 110: наибольшее разнообразие морфотипов наблюдалось при пассаже в LB бульоне, тогда как в воде формировался в основном морфотип I ChI (95-97 % колоний), в клетках тетрахимен в LB бульоне и воде доминировали V и I ChI морфотипы.

Культуры идентифицированных морфологических вариантов обладали сниженной вирулентностью и вызывали гибель золотистых хомячков в более отдаленные сроки (26-34 сут) по сравнению с исходным штаммом (5 сут). При заражении отдельными морфотипами мышей линии BALB/c и мышей летальность единичных животных наблюдали в течение 30 суток. Исследование морфологии колоний культуры, выделенных от всех видов павших экспериментальных животных, как при заражении исходным штаммом, так и его морфотипами, показало, что они принадлежали к варианту I ChI.



Морфотипы *B. pseudomallei* 110, полученные в различных условиях: исходный морфотип штамма *B. pseudomallei* 110; морфотипы, образовавшиеся при пассаже культуры *B. pseudomallei* 110 в условиях стрессового воздействия; переходные морфологические формы колоний, полученные при переключении морфотипов в процессе хранения; реверсия в исходный морфотип.

У идентифицированных морфотипов была выявлена вариабельность фенотипических свойств. Повышенную, в сравнении с исходным штаммом, способность к продукции протеаз,  $\beta$ -гемолитическую активность и подвижность в наибольшей степени проявлял морфотип I Chl. Сравнение фенотипических свойств I Chl морфотипа, полученного из разных источников, показало, что культуры, выделенные от экспериментальных животных, как и культуры этого морфотипа, изолированные из воды, обладают сходным уровнем продукции внеклеточных ферментов и подвижностью (табл.).

Определение спектров белков наружных мембран в SDS-PAAG показало, что все морфологические варианты, включая выделенные от экспериментальных животных, характеризовались увеличением продукции порообразующих белков с Mr 27, 30 и 39 кДа. При определении масс-спектров общеклеточных белков наиболее вариабельным по сравнению с исходным штаммом и другими морфотипами оказался вариант I Chl, который отличался появлением нескольких пиков слабой интенсивности в диапазоне 1000-3000 m/z, а также появлением высокого пика в диапазоне 5500-6000 m/z.

Исследование культур отдельных морфотипов после 6 месяцев хранения в 0,4% Nutrient агар под вазелиновым маслом обнаружило появление переходных форм между разными морфотипами, которое предположительно можно было расценить как переключение одного морфотипа в другой. В частности, культура морфотипа I Chl приобретала структуру, соответствующую III Chl: периферическая гладкая зона колоний расширялась, центральная шероховатая часть уменьшалась в диаметре, колонии становились более плоскими и сохраняли выраженную малиновую окраску, характерную для обоих (I Chl и III Chl) морфотипов. Морфотип II в целом показал тенденцию к переключению в морфотип V, однако у части колоний выявлялись сектора малинового цвета со структурой морфотипа I Chl. Культура III Chl после 6 месяцев хранения приобретала признаки морфотипа VI. Одновременно у некоторых образовавшихся колоний VI типа были видны фрагменты с шероховатой структурой, возможно I Chl или VII Chl морфотипов, отдельно выявлялись колонии I Chl. Что касается морфотипов IV Chl и V, то основная часть их колоний отчетливо трансформировалась в морфологический вариант VI.

По истечении срока хранения, равного 10 месяцам, переходные варианты практически полностью приобрели структуру морфотипа VI (VII Chl), типичную для исходного штамма *V. pseudomallei* 110 (рис.). Определение вирулентности этих трансформированных морфотипов для золотистых хомячков показало ее частичное восстановление и сокращение жизни экспериментальных животных до 17-18 суток по сравнению с 26-34 сутками, установленными изначально для отдельных морфотипов. После продолжительного пребывания в стационарном состоянии в питательной среде ревертировавшие морфотипы приобретали ферментативную активность и подвижность, соответствующую исходному морфотипу штамма *V. pseudomallei* 110.

Современный взгляд на морфологическую изменчивость культур *V. pseudomallei* основывается на представлении о морфотипах колоний и их переключении [3]. Многообразие описанных морфотипов этого микроорганизма свидетельствует о чрезвычайной вариабельности признака морфологии колоний. При этом спектр и разнообразие морфотипов являются особенностью штаммов, выделенных в различных географических регионах [3, 4, 8]. Несмотря на то, что механизм переключения морфотипов не изучен, признано, что образование морфотипов является частью процессов адаптации микроорганизма к неблагоприятным воздействиям среды, включая среду макроорганизма [3, 6, 12].

#### Фенотипические свойства культур морфотипа I Chl из различных источников

Штамм, морфотип	Зона (мм), 48 ч		
	Exp	Hem	Mot
<i>V. pseudomallei</i> 110	10±2	2±1	15±2
I Chl от золотистых хомячков	14±2	2*±1	20±2
I Chl от мышей BALB/c	15±2	2*±1	25±3
I Chl от мышей	15±2	5*±1	22±3
I Chl из воды	16±2	2*±1	30±3

П р и м е ч а н и е. Exp — экзопротеаза, Hem — гемолитическая активность, Mot — подвижность; \*  $\beta$ -гемолитическая активность.

В настоящей работе мы использовали несколько физиологических факторов воздействия на культуры *B. pseudomallei*, способных вызвать нестабильное состояние морфологии колоний: культивирование в питательной среде путем многократных пересевов, пассаж культур в стерильной речной воде и отдельно — в клетках *T. pyriformis* при температуре 28 °С, оптимальной, как для поддержания простейших, так и соответствующей условиям среды обитания и размножения возбудителя мелиоидоза. Это позволило охарактеризовать морфотипическую вариабельность колониального штамма *B. pseudomallei* 110 в различных условиях, выявить структуру исходного морфотипа и показать его переключение в ряд других морфологических вариантов.

Наибольший интерес среди идентифицированных морфотипов представляет I Chl — морфологический вариант, обладающий сходством с морфотипом I, преобладающим в клинических изолятах от больных мелиоидозом, исследованных Chantratita N. et al. [3]. В нашей работе I Chl является доминирующим морфотипом культур *B. pseudomallei* 110, пассированных в стерильной речной воде, а также выделенных от экспериментальных животных при заражении любым другим морфотипом.

Образование какого-либо одного морфотипа в результате переключения различных морфологических вариантов в организме мышей линии BALB/c при острой мелиоидозной инфекции наблюдали и другие исследователи [4, 8]. В частности, Gierock P. et al., выделившие *in vitro* из двух мелиоидозных штаммов в общей сложности 14 морфотипов, показали, что в организме экспериментальных животных или *in vitro* в культурах макрофагов происходит синхронизация их структуры в один из идентифицированных морфотипов одновременно с синхронизацией варьирующих у отдельных морфотипов показателей метаболической активности — поглощения глюкозы, синтеза аминокислот [8].

Возможно, выявленное в нашем исследовании переключение в I Chl представляет собой заключительный этап трансформации исходного или другого отдельного морфотипа *B. pseudomallei* 110 в наиболее стрессовой среде (воде или среде макроорганизма), тогда как наибольшее разнообразие морфотипов наблюдается в LB бульоне, где, в целом, поддерживаются благоприятные условия для размножения культур. В работе Chantratita N. et al. отмечено, что при длительном культивировании возбудителя мелиоидоза по мере истощения питательной среды соотношение из нескольких морфотипов также заменяется каким-либо одним вариантом, который становится доминирующим и, по-видимому, обладает фенотипическими свойствами, в наибольшей степени соответствующими условиям среды [3].

В заключение необходимо отметить, что разнообразие морфотипов возбудителя мелиоидоза, идентифицированных в нашей работе, является характеристикой определенного штамма и получено в определенных условиях стрессового воздействия. При этом доминированию одного морфологического типа колоний (в данном случае I Chl) в равной степени способствовали как условия длительного пассажа в стерильной речной воде, так и среда макроорганизма (организм экспериментальных животных). После снятия стрессового воздействия наблюдалась постепенная динамика реверсии всех морфотипов к исходному варианту VI (VII Chl) штамма *B. pseudomallei* одновременно с восстановлением вирулентности и других фенотипических свойств.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Король Е.В., Меринова Л.К., Шубникова Е.В., Меринова О.А., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г. Выживаемость *Burkholderia pseudomallei* в клетках ресничной инфузории *Tetrahymena pyriformis*: влияние микроорганизма на инцистирующую активность тетрахимен. Проблемы ООИ. 2017, 3:49-52.
2. Ashdown L. R. An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. *Pathology*. 1979, 11(2):293-297.
3. Chantratita N., Wuthiekanun V., Boonbumrung K. et al. Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei*. *J. Bacteriol.* 2007, 189:807-817.

4. Chen Y. S., Lin H. H., Hung C. C. et al. Phenotypic characteristics and pathogenic ability across distinct morphotypes of *Burkholderia pseudomallei* DT. *Microbiol. Immunol.* 2009, 53:184-189.
5. Cheng A. C., Currie B. J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18:383-416.
6. Chin C. Y., Hara Y., Ghazali A. K. et al. Global transcriptional analysis of *Burkholderia pseudomallei* high and low biofilm producers reveals insights into biofilm production and virulence. *J. BMC Genomics.* 2015, 16:471.
7. Currie B. J., Fisher D. A., Howard D. M. et al. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 2000, 31:981-986.
8. Gierok P., Kohler C., Steinmetz I. et al. *Burkholderia pseudomallei* colony morphotypes show a synchronized metabolic pattern after acute infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2016, 10(3): e0004483.
9. Howard K., Inglis T. J. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41:3312-3316.
10. Inglis T. J., Sagripanti J. L. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72:6865-6875.
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227:680-685.
12. Tandhavanant S., Thanwisai A., Limmathurotsakul D. et al. Effect of colony morphology variation of *Burkholderia pseudomallei* on intracellular survival and resistance to antimicrobial environments in human macrophages in vitro. *BMC Microbiol.* 2010, 10:303.

*Поступила 27.07.18*

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Е.Ю.Агафонова, Н.И.Смирнова, Ж.В.Альхова, Я.М.Краснов, Л.Ф.Ливанова, Ю.В.Лозовский, В.В.Кутырев*

## **НЕТОКСИГЕННЫЕ ШТАММЫ *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, ВЫДЕЛЕННЫЕ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА**

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

*Цель.* Сравнительный анализ секвенированных нами полных геномов нетоксигенных штаммов с разным набором генов патогенности и оценка их вирулентности при внутрикишечном заражении новорожденных крольчат. *Материалы и методы.* Полногеномное секвенирование ДНК 26 штаммов проведено с использованием технологии полупроводникового секвенирования. Филогенетические связи штаммов выявлены на основе SNP-анализа. Продукцию гемолизина и гемагглютинин-протеазы оценивали общепринятыми методами. Вирулентность штаммов для крольчат определяли путем их внутрикишечного заражения в дозе  $10^7$  КОЕ/мл. *Результаты.* На основе анализа полных геномов нетоксигенных штаммов *ctxA**tcpA*<sup>+</sup> и *ctxA**tcpA*<sup>-</sup> выявлены различия между ними по составу и стабильности структуры мобильных элементов, связанных с патогенностью. Обнаружены также существенные отличия этих штаммов друг от друга по нуклеотидным последовательностям генов *hlyA*, *hapA* и *gtxA*, кодирующих продукцию дополнительных факторов патогенности. Представлены результаты оценки их филогенетических связей. На модельных животных подтверждена неспособность нетоксигенных штаммов *ctxA**tcpA*<sup>+</sup> и *ctxA**tcpA*<sup>-</sup> вызывать развитие типичной холерной инфекции. *Заключение.* Получены новые данные о структуре геномов различных нетоксигенных штаммов и их филогенетических связях. На основании результатов заражения модельных животных клетками нетоксигенных штаммов с изученным геномом сделан вывод об их неспособности вызывать развитие типичной холерной инфекции.

Журн.микробиол., 2019, № 2, С. 13—24

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, нетоксигенные штаммы, геном, SNP-анализ, патогенность

## **NON-TOXIGENIC STRAINS OF VIBRIO CHOLERAЕ BIOVAR EL TOR, ISOLATED IN THE TERRITORY OF RUSSIA: MOLECULAR-GENETIC PECULIARITIES AND PATHOGENIC PROPERTIES**

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

*Aim.* Comparative analysis of the sequenced on our own effort genomes of non-toxigenic strains with different set of pathogenicity genes and assessment of their virulence on the model of intestinal inoculation of newborn rabbits. *Materials and methods.* Whole-genome DNA sequencing of 26 strains was carried out using semiconductor sequencing technology. Haemolysin and hemagglutinin-protease production was evaluated applying conventional methods. Virulence of the strains for newborn rabbits was determined through intraluminal inoculation at the dose of  $10^7$  CFU/ml. *Results.* On the basis of whole genome analysis of *ctxA tcpA*<sup>+</sup> and *ctxA tcpA*<sup>-</sup> non-toxigenic strains, differences in composition and structure stability of mobile elements associated with pathogenicity have been identified. Significant differences in nucleotide sequences of *hlyA*, *hapA*, and *rtxA* genes, encoding production of additional pathogenicity factors, have also been detected. The paper provides the results of assessment of their phylogenetic relations. Experiments on animal models have confirmed the inability of non-toxigenic *ctxA tcpA*<sup>+</sup> and *ctxA tcpA*<sup>-</sup> strains to cause the development of typical cholera infection. *Conclusion.* New data on the genome structure of different non-toxigenic strains and their phylogenetic relations have been obtained. Based on the results of inoculation of animal models with cells of non-toxigenic strains with the studied genome the inference is drawn on their inability to cause the development of typical cholera infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 13–24

Key words: *Vibrio cholerae*, non-toxigenic strains, genome, SNP-analysis, pathogenicity

### **ВВЕДЕНИЕ**

Эпидемии холеры Эль Тор, особо опасной инфекционной болезни, поражающей тонкий кишечник человека и приводящей к развитию различной степени обезвоживания, до сих пор способны вызывать чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения международного значения. В соответствии с классификацией биологических агентов, вызывающих болезни человека, токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 относят ко II группе патогенности. Эндемичные очаги холеры располагаются в Африке, Латинской Америке и Юго-Восточной Азии. В настоящее время по данным ВОЗ самая сложная ситуация по холере сложилась в Йемене, где зарегистрировано более 1 000 000 больных [18]. Территория Российской Федерации не является эндемичной по холере, поскольку отсутствуют условия для ее укоренения. Относительно редкие эпидемические вспышки или спорадические случаи холеры в России всегда имели заносной характер и были вызваны токсигенными штаммами *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. Такие штаммы образовали две группы: типичные изоляты и их природные генетические варианты, возникшие в 90-х годах прошлого века в Юго-Восточной Азии и имеющие ряд изменений в геноме [7].

Геном *V. cholerae* представлен двумя хромосомами [13]. К ключевым генетическим маркерам возбудителя холеры, абсолютно необходимым для развития инфекционного процесса, относят гены *tcrA-F* и *stxAB*, размещенные в геноме острова патогенности (ОП) VPI-1 и профага СТХφ соответственно. Гены *tcrA-F* кодируют основной фактор колонизации тонкого кишечника — токсин-корегулируемые пили (ТСП), а гены *stxAB* определяют биосинтез прикрепившимися к энтероцитам вибрионами секретируемого холерного энтеротоксина (СТ), вызывающего развитие холерогенного эффекта — основного клинического симптома при холере [8, 10].

Вместе с тем, в различных регионах России в поверхностных водоемах ежегодно, помимо нетоксигенных холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, обнаруживают значительное количество штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль

Тор, не имеющих профага СТХφ с генами холерного токсина, которые относят к иной группе патогенности, а именно к III. Такие нетоксигенные штаммы могут вызывать единичные или групповые случаи острых кишечных инфекций, не способных к эпидемическому распространению [8,16].

Источник нетоксигенных холерных вибрионов в водоемах России пока точно не установлен. Одни исследователи считают, что присутствие нетоксигенных вибрионов в поверхностных водоемах ряда регионов может указывать на загрязнение последних при попадании в них недостаточно очищенных и обеззараженных хозяйственно-бытовых сточных вод [3]. Согласно другой точке зрения нетоксигенные вибрионы являются частью естественной гетерогенной микрофлоры воды поверхностных водоемов («водные» вибрионы Эль Тор) [17], достаточно устойчивой к воздействию стрессовых факторов, и в водоемах с благоприятными условиями могут сохраняться достаточно длительный период времени — до 9 месяцев и более [2, 6]. Однако механизм, обеспечивающий такие процессы, еще недостаточно исследован на уровне функционирования бактериального генома и регуляции метаболизма. Известно лишь о значительном диапазоне генетической изменчивости, выражающейся в присутствии в геноме нетоксигенных штаммов разного набора генов. Так, среди нетоксигенных вибрионов изредка выявляли изоляты, содержащие гены *tcpA-F*, определяющие продукцию одного из ключевых факторов патогенности — токсин-корегулируемых пилей (ТСП), обеспечивающих колонизацию вибрионами тонкого кишечника [1, 8]. Более широко распространены нетоксигенные вибрионы, не имеющие генов *tcpA-F*, но с различными генами, кодирующими дополнительные факторы патогенности: генами термолabileного гемолизина (*hlyA*), растворимой гемагглютинин-протеазы (*hapA*), цитотоксина RTX (*rtxA*) [2, 8, 16]. Вероятно, эти вибрионы при отсутствии холерного токсина в восприимчивом организме могут реализовывать второстепенные факторы патогенности, вызывая патологический процесс (гастроэнтериты), отличающийся от типичной холерогенной реакции, наблюдаемой при действии холерного токсина. Тем не менее, до сих пор появляются отдельные сообщения о том, что нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор могут вызывать единичные и групповые заболевания холерой [4, 5]. Такая ситуация ставит вопрос о более глубоком изучении их генетической организации, выявлении уровня экспрессии генов, кодирующих дополнительные факторы патогенности, и оценки патогенности нетоксигенных штаммов с установленной структурой генома.

Цель работы — сравнительный анализ полных геномов нетоксигенных штаммов с разным набором генов патогенности и оценка их вирулентности при внутрикишечном заражении новорожденных крольчат.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 26 токсигенных (7 изолятов) и нетоксигенных (19 изолятов) штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных в различных регионах Российской Федерации (1970 — 2017 гг.) и сопредельных стран: в Украине (1995, 2011 гг.) и Туркменистане (1965, 1972 гг.). Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», где их хранили при 4°C в лиофилизированном состоянии. Бактерии культивировали в бульоне и агаре LB (Luria-Bertani) при 37°C.

Производство растворимой гемагглютинин/протеазы (НА/Р) или термолabileного гемолизина определяли путем нанесения изолированных колоний штаммов *V. cholerae* методом реплик на пластинку агара (рН 7,2), содержащего соответственно либо 10% обезжиренного молока, либо 3% взвесь эритроцитов барана. Оценку результатов проводили согласно общепринятым методам [9, 11].

Вирулентность штаммов определяли по методу Dutta N.K. and Habbu M.K [9]. Крольчат возрастом 8-10 дней и массой 130-160 г заражали внутрикишечно 4-часовой агаровой культурой, выращенной при температуре 37°C, в концентрации 10<sup>7</sup> КОЕ в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl, строго соблюдая условия, предъявляемые к проведе-

нию экспериментальных исследований на животных. Наблюдения за ними вели в течение 48 ч. Всех погибших или усыпленных хлороформом животных вскрывали для оценки развития специфического инфекционного процесса. Работу с животными проводили в соответствии с руководством и правилами по обращению, уходу и защите лабораторных животных ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/home\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm)). Протоколы экспериментов на животных были одобрены Комиссией по биоэтике РосНИПЧИ «Микроб» (разрешение №1 от 13.01.2017 г.).

Выделение и очистку геномной ДНК проводили из бактериальной суспензии с использованием коммерческого набора «ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit» (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Предварительно клетки были обработаны мертиолятом натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01%) и прогреты при 56°C в течение 30 мин.

Полногеномное секвенирование ДНК штаммов проводили с использованием технологии полупроводникового секвенирования на системе Ion PGM (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific, США). Подготовку библиотек для секвенирования осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя. Единичные чтения (риды) были отфильтрованы по качеству программным пакетом Ion Torrent Suite v. 5.4. Затем перед сборкой все риды длиной менее 100 нуклеотидов удалял из полученных данных. Сборку геномов *de novo* в контиги проводили с помощью программы Newbler GS Assembler v. 2.6. Поиск SNP в геномах осуществляли с помощью программы Realphy 1.10, используя в качестве референсной последовательности геном штамма *V. cholerae* N16961 (NC\_002505). Для изучения филогенетического распределения штаммов на основе анализа SNP 26 геномов штаммов *V. cholerae* использовали программный пакет Beast 2.4.0. Байесовский анализ проводили с использованием модели General Time Reversible (TR). Оценку параметров филогенетического дерева проводили в программе Tracer v. 1.6. Полученное филогенетическое дерево визуализировали в программе Figtree v. 1.4.3. Эксперименты ставили в 3-кратной повторности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ секвенированных нами полных геномов 19 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных как из воды поверхностных водоемов, так и от человека, и семи токсигенных изолятов, взятых для сравнения, позволил выявить три основные группы, различающиеся по составу мобильных элементов, связанных с вирулентностью, а также по нуклеотидной последовательности их генов (табл.). В первую в качестве исходного контроля входили токсигенные типичные штаммы, вызвавшие начало 7 пандемии и содержащие в геноме гены СТ вибрионов Эль-Тор (ctxAB<sup>Eltor</sup>), а также геноварианты возбудителя, возникшие в 1991 г. в Юго-Восточной Азии, получившие через горизонтальный перенос гены СТ холерных вибрионов классического вибриона (ctxAB<sup>Class</sup>) — возбудителя предыдущих пандемий азиатской холеры. Эти штаммы были выделены в разные годы (1970-2014 гг.) и на различных территориях от больных (M888, M1275, P18899, L3226, 76, 3265/80) либо из внешней среды (301). Более того, они были занесены в Россию из разных эндемичных по холере регионов (Иран, Индия, Пакистан, Непал). Сравнение их генома с последовательностью генома типичного штамма N16961, взятого в качестве референсного, подтвердило наличие в их первой хромосоме профага СТХф и ОП VPI-1 с ключевыми генами вирулентности — генами СТ (ctxAB) и TCR (tcpA-F), которые являются генетической основой эпидемической опасности штаммов. В состав СТХф входили также гены двух дополнительных токсинов Zot (от zonula occludens toxin) и Ace (от accessory cholera enterotoxin), а VPI-1 содержал весь набор основных регуляторных генов (toxT, tcpP и tcpH), контролирующей экспрессию генов СТ и TCR, а также структурный ген tcpA, кодирующий основную субъединицу TCR. Его нуклеотидная последовательность у типичного штамма (M888) была идентична таковой штамма N16961, содержащего ген tcpA<sup>Eltor</sup>, тогда как геноварианты (M1275, P18899, L3226, 76, 3265/80, 301) несли аллель tcpA<sup>CIRS</sup>, для

**Присутствие структурных и регуляторных генов патогенности в геноме токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор**

Штамм	Место выделения и год	Мобильные элементы							Коровая часть хромосомы			
		CTXφ			VPI-1				VPI-2	hlyA	hapA	rtxA
		ctxAB	zot	ace	tcpA	tcpP	tcpH	toxT	nanH			
M888	Астрахань, 1970	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1275	Дагестан, 1993	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L3226	Москва, 2010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
76	Мариуполь, 2011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
301	Таганрог, 2011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M139	Туркмения, 1965	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M1399	Астрахань, 1982	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
56	Мариуполь, 1995	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
P18778	Ростов. обл., 2005	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M1501	Калмыкия, 2011	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2613	Калмыкия, 2015	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2687	Калмыкия, 2015	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2688	Калмыкия, 2015	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
124	Калмыкия, 2017	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M988	Туркмения, 1972	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M1332	Челябинск, 2000	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M1337	Астрахань, 2000	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
P18748	Сочи, 2004	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2403	Одесса, 2011	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M1522	Казань, 2014	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
8	Калмыкия, 2014	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
433	Проба воды	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2843	2015, Сочи	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3178	Калмыкия, 2016	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	Калмыкия, 2017	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Примечание. \* В скобках указано число замен (несинонимичных/синонимичных).

которого характерна несинонимичная замена аденина (А) на гуанин (G) в позиции 266 [12] (табл., указано только пять штаммов). Геном всех токсигенных штаммов имел и второй ОП — VPI-2 протяженностью 57,3 т.п.н., содержащий кластер генов, кодирующих систему рестрикции — модификации, а также кластер генов, происходящих от бактериофагов. Кроме того, в его состав входил локус VC1773-VC1784 с генами, кодирующими белки, участвующие в утилизации N-ацетилглюкозамина и сиаловой кислоты (*nan-nag* — область), используемых в качестве источника углерода, и ген нейраминидазы (*nanH*), усиливающий связывание энтеротоксина с эпителием клеток тонкого кишечника путем расщепления полисиалоганглиозидов до моносиалоганглиозидов GM1, являющегося рецептором для этого белка [14]. Нуклеотидная последовательность этого ОП у изученных токсигенных штаммов не отличалась от таковой референсного штамма. Помимо мобильных элементов, мы провели также анализ неуклеотидных последовательностей ряда генов коровой части хромосом, стабильно наследуемых всеми холерными вибрионами: *hlyA*, *harA* и *rtxA*. Выбор этих генов был обусловлен тем, что их продукты обеспечивают не только метаболическую возможность адаптации вибрионов к разным условиям обитания в водной среде, но и относятся к дополнительным факторам патогенности. Ген *hlyA* кодирует гемолизин/цитотоксин, *harA* определяет биосинтез гемагглютинин/протеазы, *rtxA* отвечает за продукцию мультифункционального цитотоксина RTX (*repeats in toxin*) [12, 16]. Если между нуклеотидными последовательностями генов *hlyA* и *harA* исследуемых и референсного штамма не было отличий, то в гене *rtxA* все геноварианты содержали одну замену G/A в позиции 13602, что привело к образованию стоп-кодона, преждевременно завершающего биосинтез этого белка (табл.). Таким образом, геном изученных токсигенных штаммов содержал весь набор основных и дополнительных генов вирулентности, характерных для референсного штамма. Исключением были лишь геноварианты возбудителя, число однонуклеотидных замен в геноме которых было незначительно. Генотип токсигенных штаммов обозначили как *ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>*.

Вторая группа состояла из девяти нетоксигенных штаммов, выделенных в разные временные периоды (1965-2017 гг.) в различных регионах РФ, а также в Украине и Туркмении (табл.). Все эти штаммы были лишены профага СТХφ с ключевыми (*ctxAB*) и дополнительными (*zot* и *ace*) генами токсинов. Однако эти вибрионы имели в геноме весь блок генов, входящих в состав ОП VPI-1 — второго ключевого мобильного элемента, продукты которого абсолютно необходимы для колонизации вибрионами тонкого кишечника (табл.). Тем не менее, согласно результатам сравнительного биоинформационного анализа, проведенного с помощью программы Mauve 2.4.0, нуклеотидная последовательность VPI-1 ни одного из взятых нетоксигенных изолятов не была идентична таковой референсного токсигенного штамма. Отличия генома VPI-1 проявлялись в наличии в разных генах и межгенных пространствах разного типа мутаций: одиночных нуклеотидных замен, а также вставок и делеций разной протяженности (от 1 до 31 п.н.). Сравнение нуклеотидных последовательностей отдельных генов, наиболее важных для проявления вирулентных свойств — структурного гена *tcpA*, кодирующего основную субъединицу ТСР, и ключевых регуляторных генов *toxT*, *tcpP* и *tcpH*, контролирующих экспрессию основных генов вирулентности, выявило следующее. Нуклеотидная последовательность *tcpA* восьми нетоксигенных штаммов оказалась идентичной таковой референсного штамма N16961. Лишь у одного штамма (M1501, Калмыкия, 2011) ген *tcpA* имел несинонимичную замену в позиции 626 (A/T) (табл.). Результаты анализа последовательностей трех регуляторных генов *toxT*, *tcpP* и *tcpH* показали полное сходство двух первых генов с таковыми токсигенных штаммов. Однако у пяти нетоксигенных штаммов (56, 2613, 2687, 2688, 124), четыре из которых выделены в Республике Калмыкия в 2015-2017 гг., структура гена *tcpH* была иной, поскольку в позиции 146 присутствовала одна замена — C/G. Выявленная генетическая особенность штаммов, выделенных в одном и том же регионе, позволяет полагать о циркуляции в указанные выше годы на территории Калмыкии одной и той же популяции вибрионов. Штамм M501,

выявленный в том же регионе в 2011 г. и имеющий иной генетический маркер (однонуклеотидную замену в гене *tcpA*), вероятно, относился к другой обособленной популяции вибрионов. Таким образом, несмотря на выявленные отличия генома VPI-1 холерных вибрионов первой и второй групп, у всех изученных нетоксигенных штаммов, за исключением M1501, основные структурные и регуляторные гены вирулентности *tcpA*, *toxT* и *tcpP* были идентичны этим генам типичных штаммов возбудителя холеры Эль Тор из первой группы. Точечную мутацию, выраженную в замене одного нуклеотида на другой, выявили лишь в гене *tcpH*. Генотип этих штаммов обозначили *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>*.

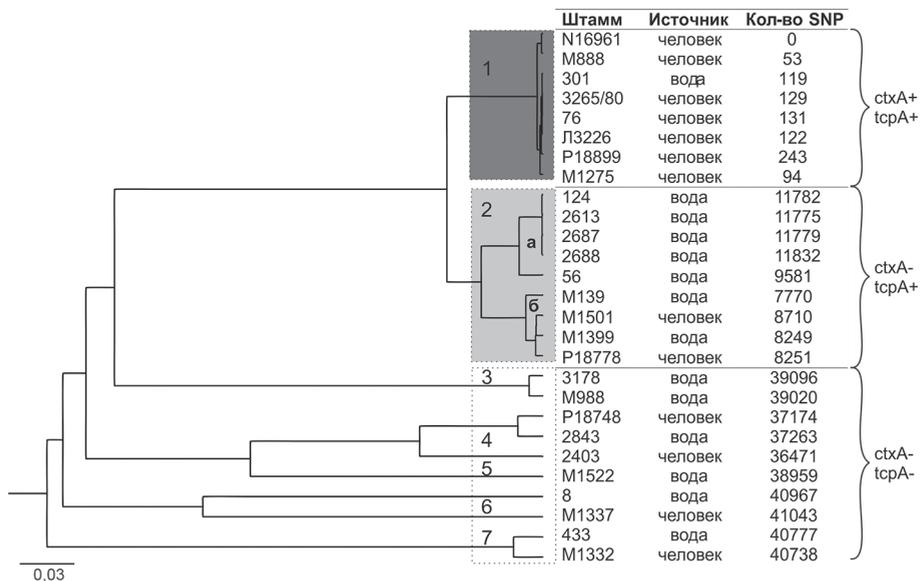
Установлено также присутствие в геноме штаммов *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>* ОП VPI-2. Результаты сравнительного анализа его нуклеотидной последовательности, проведенного также с помощью программы Mauve 2.4.0, показал на гетерогенность структуры VPI-2 у этих вибрионов. Среди девяти изолятов *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>* лишь у пяти (56, 2613, 2687, 2688, 124, M988) этот ОП был идентичен по структуре таковому токсигенных штаммов. Следует отметить, что четыре из них выделили в Калмыкии в 2015-2017 гг. и согласно нашему предположению, высказанному выше, они были представителями одной и той же популяции, циркулирующей на этой территории. В то же время, четыре штамма (M139, M1399, P18778 и M1501), изолированные, помимо M1501, в других географически обособленных регионах, утратили значительную часть этого «острова» размером 34046-34826 п.н., включающую практически все гены рестрикции — модификации, а также фагоподобные гены. Сохранился только центральный «район» этого ОП, содержащий ген *panH* и прилежащую к нему область *pan-nag*. Однако в гене *panH* появились многочисленные однонуклеотидные замены — 17-19 несинонимичных и 46-47 синонимичных (табл.). Что касается генов коровой области *hlyA*, *harA* и *rtxA*, то мутациями были затронуты лишь два из них — *hlyA* и *rtxA*. Почти 90,0% штаммов в гене *hlyA* несли единственную несинонимичную замену тимина (Т) на цитозин (С) в позиции 1358. В гене *rtxA* были также две несинонимичные замены G/A и A/G в позициях 6901 и 8731 соответственно, возможно не затрагивающие экспрессию этого гена (табл.).

Иную картину наблюдали при анализе генома нетоксигенных штаммов, относящихся к третьей группе, генотип которых обозначили *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>* из-за отсутствия не только профага СТХφ, но и ОП VPI-1. Из 10 изученных два штамма (M1332 и 433) практически утратили и ОП VPI-2, сохранив лишь единичные концевые гены. Протяженность их делеции составила 50505 — 50495 п.н. У восьми других этот мобильный элемент нес также делеции, но их протяженность была меньше — 339932 — 39076 п.н. По сравнению с интактным VPI-2 эти штаммы были лишены двух больших участков ДНК, содержащих гены рестрикции — модификации и фагоподобные гены. В состав их ОП входили лишь кластер генов *pan-nag*, а также ген *panH*. Учитывая функциональную важность гена *panH*, мы сравнили его нуклеотидную последовательность у всех штаммов, сохранивших часть генома VPI-2, с таковой референсного штамма и обнаружили большое число замен в нем. Их количество варьировало от 11-23 несинонимичных до 42-67 синонимичных в зависимости от штамма (табл.). Нуклеотидная последовательность коровых генов этой группы вибрионов также отличалась от таковой как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>* многочисленными однонуклеотидными заменами. Так, в гене *hlyA* штаммов *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>* общее количество синонимичных и несинонимичных замен в нем достигало 38-67 (табл.). Но наиболее высокий уровень вариабельности нуклеотидной последовательности был характерен для гена *rtxA*. В разных позициях в зависимости от штамма выявили 11-56 несинонимичных и 19-170 синонимичных однонуклеотидных замен (табл.).

Таким образом, обнаружено, что две исследованные группы нетоксигенных штаммов с генотипом *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>* и *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>* имели четкие отличия друг от друга. Во-первых, в состав первой хромосомы штаммов *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>* был внедрен геном ОП VPI-1, тогда как изоляты *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>* не имели его. Во-вторых, если более 55,0% изученных штаммов *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>* несли в геноме интактный VPI-2 и лишь около 44,0%

содержали протяженные делеции в этом мобильном элементе, то в случае изолятов  $ctxA^-tcpA^-$  картина была другой. Число штаммов с делетированным ОП возрастало до 80,0%, а 20,0% были лишены его. В третьих, изоляты  $ctxA^-tcpA^+$  и  $ctxA^-tcpA^-$  имели разные аллели генов *hlyA*, *hapA* и *gtxA*, что не исключает продукцию ими различающихся по биологической активности таких дополнительных факторов патогенности как гемолизин/цитотоксин, гемагглютинин/протеаза и цитотоксин RTX.

Столь значимые различия в структуре генома сравниваемых групп штаммов ставят вопрос об их филогенетических связях. Для его решения провели филогенетическую реконструкцию 26 штаммов: семи токсигенных  $ctxA^+tcpA^+$  и 19 нетоксигенных (девять изолятов  $ctxA^-tcpA^+$  и десять —  $ctxA^-tcpA^-$ ), выполненную методом SNP-типирования. При сравнении их нуклеотидной последовательности с таковой референсного штамма N16961 обнаружили 108292 одиночных нуклеотидных замен, или SNPs, в 99419 генах коровой части генома длиной 3234049 п.н. и 8873 межгенных пространствах. На основе анализа единичных полиморфных нуклеотидов в геноме этих штаммов построили филогенетическое дерево (рис.), на котором показано, что все токсигенные штаммы формировали отдельный кластер. В него входил референсный штамм N16961 из Бангладеш (1975 г.), являющийся типичным и отличающийся от других штаммов этого кластера 53–243 SNPs. При этом наиболее значимые различия по нуклеотидным заменам (111–231) были между N16961 и геновариантами, занесенными на территорию России и Украины в более поздние годы — 2006–2014. Нетоксигенные штаммы  $ctxA^-tcpA^+$  (9 изолятов) сформировали второй кластер, отличия которых от референсного штамма достигали 5602–8022 SNPs. Более того, эта группа штаммов оказалась генетически гетерогенной — различия между ними составляли от 9 до 7813 SNPs. Этот кластер включал, по крайней мере, две подгруппы (кластер 2, подгруппы а, б). В подгруппу а вошли четыре штамма из Калмыкии (124, 2613, 2687, 2688). Это служит в пользу нашего предположения относительно их принадлежности к одной и той же популяции, циркулировавшей в водоемах этого региона в 2015–2017 гг. Вместе с тем, штамм M1501, выделенный также в этом регионе в 2011 г., но вошедший в подгруппу б, относился, видимо, к другой популяции вибрионов. В целом кластер 2, состоящий из нетоксигенных штаммов с генотипом  $ctxA^-tcpA^+$ , и кластер 1, включающий токсигенные изоляты, различались между собой в среднем



#### Филогенетическое дерево токсигенных и нетоксигенных штаммов *V.cholerae* O1 биовара Эль Тор.

Темно-серым выделен кластер токсигенных штаммов  $ctxA^+tcpA^+$ , светло-серым — кластер нетоксигенных штаммов  $ctxA^-tcpA^+$ ; белым обозначены кластеры нетоксигенных штаммов  $ctxA^-tcpA^-$ .

по 9662 SNPs. Выявлено также 3037 SNPs, специфичных для 2 кластера. Несмотря на явное отсутствие генетической близости, представленные данные филогенетического анализа позволяют говорить о возможном существовании в далеком прошлом общего предка токсигенных и нетоксигенных  $ctxA^-tcpA^+$  штаммов, дальнейшая дивергенция которых привела к формированию двух кластеров. Что касается нетоксигенных штаммов  $ctxA^-tcpA^-$ , то совершенно очевидна их значительная удаленность от первых двух кластеров, а также высокий уровень их гетерогенности. Таким образом, байесовский анализ однонуклеотидных полиморфизмов на основании полного геномного секвенирования 28 исследуемых штаммов показал их филогенетические взаимосвязи. Группа токсигенных штаммов оказалась монофилетической, имеющей от 47 до 232 SNPs в консервативной части генома в сравнении с референсным, что может указывать на единый источник их происхождения. Нетоксигенные штаммы разделились на разные филогенетические группы, отличающиеся друг от друга по SNPs. Четко выражена обособленность широко распространенных в водоемах нетоксигенных штаммов  $ctxA^-tcpA^-$ , вошедших в 3-7 кластеры за счет высокой генетической вариабельности коровой части генома, от довольно редко выделяемых из внешней среды второй группы штаммов  $ctxA^-tcpA^+$ .

Поскольку сведения о взаимосвязи структуры генома *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор и их ролью в патогенезе холеры остаются противоречивыми, мы изучили патогенные свойства 12 нетоксигенных штаммов  $ctxA^-tcpA^-$  (пяти изолятов) и  $ctxA^-tcpA^+$  (семи изолятов) с известной и представленной выше структурой генома на модельных животных — 7-8-дневных крольчатах (40 животных). Кроме того в качестве контроля 15 животных заразили пятью токсигенными штаммами (M888, 76, L3226, M1275, 301), содержащими профаг СТХφ с генами холерного токсина. Проведенные исследования показали, что только токсигенные штаммы вызывали у животных развитие выраженной холерогенной реакции, типичной при экспериментальной холере — перерастяжение толстого кишечника прозрачной жидкостью и растяжение тонкого кишечника полупрозрачным содержимым. Вместе с тем, в случае нетоксигенных холерных вибрионов, независимо от их генотипа, ни в одном случае не наблюдали развития холерогенной реакции. У животных либо не было видимых изменений в кишечнике, либо были изменения, характерные для энтеропатогенного эффекта — слабое или умеренное растяжение кишечника мутной непрозрачной жидкостью, часто с образованием газов. Отдельного упоминания заслуживает тот факт, что среди изученных нетоксигенных штаммов со слабой энтеропатогенной реакцией были два штамма (M1332  $ctxA^-tcpA^-$  и P-18778  $ctxA^-tcpA^+$ ), выделенные от людей в Челябинске (2000 г.) и Ростовской области (2005 г.) соответственно и отнесенные ранее рядом исследователей к группе нетоксигенных изолятов, способных вызывать холеру [4, 5].

Принимая во внимание присутствие в геноме нетоксигенных вибрионов генов дополнительных факторов патогенности, которые могли вызвать энтеропатогенную реакцию, мы определили уровень экспрессии *hlyA* и *hapA*, полагая, что он будет различным у штаммов  $ctxA^-tcpA^-$  и  $ctxA^-tcpA^+$  из-за выявленных различий между ними в нуклеотидной последовательности этих генов. Однако наше предположение не подтвердилось, так как уровень продукции гемолизина и гемагглютинин/протеазы у обеих групп холерных вибрионов был примерно одинаков. Более того, экспрессия этих генов практически у всех нетоксигенных штаммов была эффективной, что может указывать на реально большой вклад их продуктов в энтеропатогенность вибрионов.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ инфекционного процесса у лабораторных животных, зараженных токсигенными и нетоксигенными штаммами *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с известной структурой генома подтвердил определяющую роль холерного токсина в развитии специфического холерогенного синдрома. При отсутствии этого ключевого фактора патогенности нетоксигенные штаммы могут быть причиной лишь энтеропатогенного эффекта, вызванного, видимо, дополнительными токсинами.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты мониторинга вибриофлоры водных объектов в РФ показали, что на фоне эпидемиологического благополучия регистрируется ежегодное выделение нетоксигенных штаммов холерного вибриона O1 серогруппы биовара Эль Тор. Только за последнее десятилетие было обнаружено более 700 нетоксигенных штаммов, выделенных из внешней среды и людей, среди которых примерно 98% не имели ключевых генов патогенности и эпидемичности (генотип  $ctxA^-tcpA^-$ ) и лишь около 2% генотипом  $ctxA^-tcpA^+$  содержали в геноме ОП VPI-1 с генами основного фактора колонизации. При этом на отдельных территориях РФ (Республика Калмыкия, Краснодарский край, Ростовская область, Приморский край) нетоксигенные холерные вибрионы выявляли наиболее часто [1 — 3].

Анализ генома секвенированных нами 19 природных нетоксигенных штаммов, выделенных на территории РФ и сопредельных государств, позволил получить новые сведения относительно их генетических свойств. Установлено, что почти 90% изученных штаммов  $ctxA^-tcpA^+$  в геноме VPI-1 несли ген  $tcpA$  типичных штаммов возбудителя холеры Эль Тор. В целом же структура VPI-1 у изолятов  $ctxA^-tcpA^+$  была очень сходной или идентичной таковой токсигенных вибрионов Эль Тор. Геном другого ОП VPI-2, общего для двух групп штаммов  $ctxA^-tcpA^+$  и  $ctxA^-tcpA^-$ , оказался нестабильным. Впервые выявлено и подтверждено, что более 40% изолятов  $ctxA^-tcpA^+$  несли делетированный VPI-2 и имели от 17-19 до 46-47 несинонимичных и синонимичных однонуклеотидных замен соответственно в гене  $panH$ , размещенном на этом ОП. Холерные вибрионы  $ctxA^-tcpA^-$  либо не имели VPI-2, либо редукция его генома была еще более выраженной. Важно отметить, что у всех нетоксигенных штаммов с делетированным VPI-2 в его геноме сохранился участок ДНК, содержащий ген нейраминидазы и гены утилизации аминокислот и сиаловых кислот, что, видимо, связано с их большой ролью в процессе выживания вибрионов в стрессовых условиях водной среды [14]. Обнаружены также значительные различия между изолятами  $ctxA^-tcpA^+$  и  $ctxA^-tcpA^-$  по нуклеотидной последовательности генов коровой области хромосомы —  $hlyA$ ,  $hapA$  и  $gtxA$ . У штаммов  $ctxA^-tcpA^-$  однонуклеотидных несинонимичных замен в этих генах было в 53 раза больше по сравнению с изолятами  $ctxA^-tcpA^+$ , а синонимических — в 172 раза. Возможно, такие различия в сравниваемых участках генома штаммов являются следствием адаптации вибрионов к меняющимся условиям окружающей среды и отражением степени их филогенетической удаленности друг от друга.

Действительно, реконструкция филогении их геномов подтвердило это предположение. Группа токсигенных штаммов, независимо от времени, места и источника их выделения, вошла в один кластер с наличием в их геноме от 53 до 243 SNPs по сравнению с типичным референсным штаммом N16961, что указывает на их клональное происхождение. Эти данные полностью согласуются с результатами других исследователей [2, 12]. Нетоксигенные штаммы образовали отдельные кластеры. Кластер 2 включал штаммы с генотипом  $ctxA^-tcpA^+$  и отличался от кластера токсигенных штаммов в среднем на 9662 SNPs, что дает возможность говорить об их давней обособленности друг от друга. Тем не менее, наличие в их геноме VPI-1, идентичного или сходного с таковым возбудителя холеры Эль Тор, небольшие различия в нуклеотидной последовательности изученных генов коровой части хромосомы могут указывать на существование общего предка у штаммов первых двух кластеров. Период обособления 1 кластера от 2 мог быть, видимо, связан с приобретением нетоксигенными клонами в эндемичных очагах, расположенных за пределами РФ, через горизонтальный перенос новых мобильных элементов (профагов вирулентности, островов пандемичности), необходимых для формирования возбудителя холеры Эль Тор. Выявление штаммов  $ctxA^-tcpA^+$  на территории РФ, способных к сохранению в водной среде в течение достаточно продолжительного времени (до 9 месяцев и более), возможно, обусловлено их заносом. Это предположение полностью согласуется с точкой зрения других исследователей [1, 2, 6], однако прямых доказательств такого процесса пока нет. В этой связи, принципиально важным является вопрос о длительности циркуляции одной и той же популяции вибрионов  $ctxA^-tcpA^+$  на территории РФ. Согласно нашим данным, полученным при анализе

генома пяти штаммов, изолированных в Калмыкии в 2011-2017 гг., можно говорить, что четырех из них (124, 2613, 2687, 2688) являются, видимо, представителями одной и той же популяции, циркулирующей в этом регионе длительное время (2015-2017 гг.). Вместе с тем, штамм M1501, выделенный также в этом регионе в 2011 г., относился, видимо, к другой обособленной популяции, появившейся в результате независимого заноса. Однако для полного прояснения этих вопросов нужны дополнительные исследования.

Отдельную ветвь эволюции представляли штаммы с генотипом  $ctxA^-tcpA^-$ , сформировавшие кластеры 3-7. Огромные отличия этих штаммов, вошедших в состав этих кластеров, от первых двух (39098-41045 SNPs), обнаружение 562-16722 специфичных SNPs, отсутствующих у всех других изученных изолятов, все это свидетельствовало о независимом происхождении указанных вибрионов, широко распространенных в воде поверхностных водоемов России. Более того, уровень генетической вариабельности этих изолятов был очень высок, что может быть следствием пребывания разных штаммов в различных стрессовых условиях окружающей среды. Сравнение последовательностей указанных штаммов показало наличие 562 — 41255 SNPs, отличающих нетоксигенные штаммы в рамках пяти последних кластеров. Эти штаммы, видимо, являются частью естественной гетерогенной микрофлоры воды поверхностных водоемов («водные» вибрионы Эль Тор), представители которой не имеют генетической близости с возбудителем холеры, что полностью совпадает с данными других исследователей [17].

Далее для подтверждения того, что возбудителем холеры могут быть только токсигенные штаммы, мы провели эксперименты по внутрикишечному заражению модельных животных клетками 12 нетоксигенных штаммов  $ctxA^-tcpA^+$  и  $ctxA^-tcpA^-$ , выделенных в разное время и на различных территориях, полный геном которых был секвенирован. В качестве контрольных образцов для заражения использовали семь вирулентных штаммов также с известной структурой генома. Оказалось, что только токсигенные штаммы вызывали у животных типичную холерную инфекцию. Ни один из проверенных нетоксигенных штаммов, лишенных генов холерного токсина, не был способен к развитию специфической холерогенной реакции у зараженных кроликов. Вместе с тем, нетоксигенные штаммы в ряде случаев вызывали слабый или умеренный энтеропатогенный эффект. Это было ожидаемо, поскольку все проверенные штаммы эффективно продуцировали, по крайней мере, два дополнительных фактора патогенности — термолabileмный гемолизин и гемагглютинин/протеазу, обладающих цитотоксической активностью и способностью разрушать цитокины хозяина, участвующие в мобилизации защитных сил макроорганизма.

Обобщая сказанное, следует отметить, что к холерным вибрионам O1 серогруппы биовара Эль Тор относят как токсигенные, так и нетоксигенные штаммы, различающиеся по молекулярно-биологическим свойствам и эпидемической значимости. Среди изученных 26 штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных как из воды поверхностных водоемов, так и от человека, выявлено три основные группы с разным генотипом: токсигенные  $ctxA^+tcpA^+$ , взятые для сравнения, нетоксигенные  $ctxA^-tcpA^+$  и нетоксигенные  $ctxA^-tcpA^-$ . На основе анализа секвенированных нами полных геномов нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор  $ctxA^-tcpA^+$  и  $ctxA^-tcpA^-$ , изолированных в разное время на территории различных регионов РФ и сопредельных стран, установлено, что эти штаммы отличаются друг от друга не только по составу и структуре мобильных элементов. Существенными были различия в нуклеотидной последовательности изученных генов коровой области, кодирующих дополнительные факторы патогенности. Более того, обнаружены огромные отличия штаммов  $ctxA^-tcpA^+$  и  $ctxA^-tcpA^-$  по количеству однонуклеотидных замен в геноме, достигающих до 39098-41045 SNPs. Большая частота изменений в геноме холерных вибрионов  $ctxA^-tcpA^-$ , независимо от времени и места их выделения, по сравнению с таковой у изолятов  $ctxA^-tcpA^+$ , дает веские основания считать, что эти штаммы имеют давнее и независимое происхождение. Длительная циркуляция этих штаммов в водной среде обусловили высокий уровень их генетической вариабельности в результате воздействия различных стрессовых факторов. Высказано предположение о заносе штаммов  $ctxA^-tcpA^+$  на территорию РФ. На модели штаммов

с установленной структурой генома экспериментально доказана неспособность нетоксигенных холерных вибрионов вызывать развитие типичной холерогенной реакции у кроликов-сосунков. Вероятно, эти вибрионы реализуют в восприимчивом организме другие факторы патогенности. Однако это заболевание относится к острым кишечным инфекциям, не имеющим, в отличие от холеры, тенденции к эпидемическому распространению.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Водопьянов С.О. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>, выделенных из водных объектов Российской Федерации, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014, 9:32-34.
2. Миронова Л.В. Научное обоснование совершенствования подходов к идентификации и молекулярному типированию *Vibrio cholerae* в системе микробиологического мониторинга. Автореф. дисс. докт. мед. наук. Иркутск, 2017.
3. Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Самородова А.В., Кругликов В.Д., Титова С.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Анисимова Г.Б. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и России в 2007—2016 гг. Прогноз на 2017 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2017, 1:13-20.
4. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И., Монахова Е.В., Водопьянов С.О., Телесманич Н.Р., Дудина Н.А. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>. *Журн. микробиол.* 2007, 1:23-29.
5. Ратникова Л.И., Кузьмина Н.Я. Случай холеры в Челябинске. *Эпидемиол. инф. болезней*. 2002, 2:53-54.
6. Сизова Ю.В. Влияние стрессового воздействия на токсинопродукцию и другие свойства холерных вибрионов O1 серогруппы. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Саратов, 2017.
7. Смирнова Н.И., Кутырев В.В., Заднова С.П., Краснов Я.М., Горяев А.А., Лозовский Ю.В. Генетическая характеристика штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в разные периоды 7 пандемии холеры. *Журн. микробиол.* 2011, 3:3-10.
8. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Кутырев В.В. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью. *Генетика*. 2016, 52(9):1029-1041.
9. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation. *Brit. J. Pharmacol.* 1955, 10:153-9.
10. Dziejman M., Balon E., Boyd D. et al. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99(3):1556-1561.
11. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Chang Y. et al. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect. Immun.* 1992, 60(2):472-478.
12. Hu D., Liu B., Feng L. et al. Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016, 113(48): E7730-E7739.
13. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W. C. et al. M. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholera*. *Nature*. 2000, 406(6795):477-483.
14. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology*. 2002, 148:3681-3693.
15. Menzl K., Maier E., Chakraborty T. et al. *HlyA* hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *Eur. J. Biochem.* 1996, 40:646-654.
16. Olivier V., Haines G. K., Tan Y. et al. Hemolysin and the multifunctional autoprocessing RTX toxin are virulence factors during intestinal infection of mice with *Vibrio cholerae* El Tor O1 strains. *Infect. Immun.* 2007, 75(10):5035-5042.
17. Pang B., Yan M., Cui Z. et al. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. *J. Bacteriol.* 2007, 189(13):4837-49.
18. Yemen: Cholera Response Weekly Epidemiological Bulletin: W4 2018. Report from World Health Organization. 28 Jan 2018:1-11.

*Поступила 09.04.18*

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

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АДАПТАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ТИПИЧНЫХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ EL TOR* БИОВАРА EL TOR

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

*Цель.* Исследование биологических свойств природных штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor, влияющих на их адаптационные способности в условиях недостатка питательных веществ, при сравнительном анализе с типичными штаммами. *Материалы и методы.* Конкурентную пробу проводили путем посева смеси клеток двух сравниваемых штаммов в автоклавированную речную воду. Скорость роста штаммов определяли по значению оптической плотности. Экспрессию генов изучали методом ОТ-ПЦР с рассчитанными праймерами и зондами. *Результаты.* Установлено, что при совместном культивировании типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor в условиях недостатка питательных веществ (автоклавированная речная вода) при комнатной температуре уровень выживаемости штаммов геновариантов выше, чем типичных штаммов, что указывает на их выраженные адаптационные преимущества в данных условиях. Показано, что селективные преимущества штаммов геновариантов обеспечиваются более высокой скоростью роста клеток и повышенной экспрессией гена *rpoS*. *Заключение.* Получены новые данные о способности бактерий штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor в отличие от типичных изолятов к быстрому росту и повышенной экспрессии глобального регулятора стрессового ответа гена *rpoS*, что, возможно, способствует их лучшей адаптации не только в условиях недостатка питательных веществ, но при действии других стрессовых факторов.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 25—30

Ключевые слова: типичные штаммы и штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor, конкурентная проба, скорость роста, ОТ-ПЦР, экспрессия гена *rpoS*

S.P.Zadnova, A.A.Kritsky, N.A.Plekhanov, N.B.Cheldyshova, N.I.Smirnova

## COMPARATIVE ANALYSIS OF ADAPTATION PROPERTIES IN TYPICAL AND GENETICALLY ALTERED *VIBRIO CHOLERAЕ EL TOR* STRAINS

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

*Aim.* Study of biological properties in natural strains of genovariants of *V. cholerae* biovar *El Tor*, affecting their adaptation capacities under nutrient deficiency while comparing them with typical strains. *Materials and methods.* Competitive sampling was carried out through plating a mixture of cells of the two strains under investigation into autoclaved river water. Growth rate was evaluated through the optic density values. Gene expression was studied applying RT-PCR with designed primers and probes. *Results.* It is established that during combined cultivation of *V. cholerae El Tor* typical strains and genovariants under the shortage of nutrient substances (autoclaved river water), at room temperature, the level of survivability in genetically altered strains is higher than in typical strains, which points to their expressed adaptation advantages over the typical ones under the stated conditions. It is demonstrated that selective benefits of genovariant strains are provided by higher cell growth rate and increased *rpoS* gene expression. *Conclusion.* Obtained have been new data on the ability of bacterial strains of *V. cholerae El Tor* genovariants to rapidly grow and better express global regulator of stress response, *rpoS* gene, which, probably, contributes to their enhanced adaptation not only under nutrient deficiency, but under the influence of other stress factors too.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 25—30

Key words: typical strains and strains of genovariants of *Vibrio cholerae* O1, biovar *El Tor*, competitive sampling, growth rate, RT-PCR, *rpoS* gene expression

## ВВЕДЕНИЕ

В истории холеры зарегистрировано семь пандемий, которые были вызваны штаммами *Vibrio cholerae* O1 серогруппы, включающей два биовара — классический и El Tor. Чрезвычайно вирулентные штаммы классического биовара предположительно были возбудителями первых шести пандемий. С 1961 года и по настоящее время продолжается седьмая пандемия холеры, вызванная типичными штаммами *V. cholerae* O1 биовара El Tor. Несмотря на то, что классические и El Tor вибрионы относятся к одной O1 серогруппе, они имеют ряд фенотипических и генетических различий, а также отличаются по выживанию во внешней среде. Классические вибрионы продуцируют больше холерного токсина (ХТ), вызывают тяжелые формы болезни, но быстро погибают при попадании в открытые водоемы. В то же время, El Tor вибрионы синтезируют меньше ХТ, имеют легкую клинику («мягкая» холера), но способны длительное время сохраняться во внешней среде [1]. При изучении выживаемости классических и El Tor вибрионов методом конкурентной пробы было выявлено, что El Tor вибрионы лучше растут и доминируют над классическими вибрионами, которые в итоге переходят в некультивируемое состояние [10]. Однако несмотря на проводимые интенсивные молекулярно-генетические и биохимические исследования, механизмы, ответственные за широкое распространение El Tor вибрионов и вытеснения классических вибрионов, до сих пор не установлены.

В 90-х годах прошлого столетия возникли и получили широкое распространение генетически измененные штаммы (или геноварианты) *V. cholerae* биовара El Tor. Геноварианты отличаются от типичных El Tor вибрионов повышенной вирулентностью, что выражается в более тяжелых проявлениях болезни и высоких показателях смертности. Данные штаммы содержат в опероне *stxAB*, кодирующем биосинтез ХТ, ген *stxB* классических вибрионов (*stxB1*) в отличие от типичных El Tor вибрионов, имеющих аллель *stxB* El Tor (*stxB3*). Геноварианты синтезируют повышенное количество ХТ I (классического) типа, приближаясь по данному показателю к высокотоксигенным штаммам классического биовара [2,6,9,12]. Несмотря на интенсивные фенотипические и молекулярно-генетические исследования штаммов геновариантов, причины их глобального распространения и вытеснения типичных изолятов также не установлены. Высказано предположение, что селективные преимущества штаммов геновариантов обусловлены повышенной вирулентностью в совокупности с высокой способностью к выживанию и множественной устойчивостью к антибиотикам [11]. При этом данных о способности штаммов геновариантов выживать при действии различных неблагоприятных факторов внешней среды получено не достаточно.

Цель работы состояла в изучении биологических свойств природных штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor, влияющих на их адаптационные способности в условиях недостатка питательных веществ, при сравнительном анализе с типичными штаммами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на 8 штаммах *V. cholerae* биовара El Tor, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов).

Конкурентную пробу проводили по методу R. Freter с соавт. путем посева смеси клеток двух сравниваемых штаммов в автоклавированную речную воду [7]. Штаммы выращивали на LB агаре при температуре 37°C в течение ночи и готовили в физиологическом растворе суспензии одинаковой оптической плотности (ОП), контролируя её на спектрофотометре «Biowave DNA» (Biochrom Ltd, Англия). Полученные суспензии доводили до концентрации  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл и вносили по 0,5 мл в 4,5 мл стерилизованной речной воды так, чтобы конечная концентрация каждого штамма составляла  $5 \times 10^6$  КОЕ/мл. Параллельно для контроля выживаемости исследуемые штаммы засеивали в автоклавированную воду по отдельности. Посевы культивирова-

ли при комнатной температуре (22-25°C), делая высевы на агар LB как из смеси, так и из контрольных проб, и подсчитывали число выросших колоний.

Скорость роста штаммов определяли по значению оптической плотности (ОП) при длине волны 600 нм на спектрофотометре «Biowave DNA» (Biochrom Ltd, Англия) через 4 часа выращивания в LB бульоне. Параллельно с определением ОП подсчитывали количество выросших колоний при высеве бактерий на пластинки LB агара.

Экспрессию гена *groS* определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени на термоциклере «Rotor-Gene Q 5plex» (Qiagen Inc, GmbH, Германия) с праймерами (*groS*-RT1 — GAACCAAACACGCACCATTC и *groS*-RT2 — TCATCGACAGGTCGGTCTAA) и TaqMan зондом (FAM)GCCTTGACCAGAACCTACACCAG-(BHQ1), рассчитанными авторами и синтезированными в «Синтол» (Россия). Для изучения экспрессии штаммы выращивали в течение 4 часов в LB бульоне на шейкере при 37 °C. Тотальную РНК из клеток выделяли с использованием набора реактивов «SV total RNA isolation system» (Promega, США). Определение концентрации выделенных препаратов РНК и их выравнивание проводили на спектрофотометре «Biowave DNA» (Biochrom Ltd, Англия). Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли с помощью набора реагентов «Реверта» (InterLabServis, Россия). В качестве стандартов для построения калибровочной кривой использовали разведения плазмидной ДНК (от 10<sup>7</sup> до 10<sup>3</sup>) с клонированным участком исследуемого гена. Нормирование полученных данных проводили относительно конститутивно экспрессирующегося гена *recA* методом 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> [8]. Праймеры и зонд на данный ген также рассчитаны авторами (*recA*-RT1 — ACGGGTAACCTCAAGCAATC; *recA*-RT2 — TATCCAAACGAACAGAAGCG; *recA*-зонд — (FAM)CCTGGCGGTAACGCACTGA-(BHQ1). ПЦР проводили на трех независимо полученных образцах кДНК. В качестве контрольного штамма, экспрессия которого принималась за 1, использовался штамм *V. cholerae* M818.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программ Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Inc) и Rotor-Gene Q Software version 2.3.1 (Qiagen).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы была изучена способность штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor выживать в конкурентной пробе с типичными штаммами в условиях недостатка питательных веществ (автоклавируемая речная вода). Для постановки конкурентной пробы методом селекции на питательных средах, содержащих антибиотик, были получены мутанты, устойчивые к определенному антибиотику, что было необходимо для последующей дифференциации штаммов в конкурентной пробе. Среди полученных штаммов, несущих спонтанные мутации устойчивости к рифампицину, спектиномицину, канамицину и стрептомицину, были отобраны клоны, показавшие наибольшую стабильность наследования приобретенного признака.

Далее из произвольно взятых штаммов были сформированы четыре пары (типичный/геновариант) штаммов с разной чувствительностью к антибиотикам. Типичные штаммы (M1011, M1062, M893, M818) были изолированы в 1970-1972 гг., штаммы геновариантов (M1270, P17644, L3226, 301) — в 1993-2011 гг. (таблица). Штаммы были помещены в автоклавируемую речную воду.

В результате проведенных исследований установлено, что типичные штаммы имели более низкий уровень выживаемости по сравнению со штаммами геновариантов. Так, в конкурентной пробе M1011Km<sup>R</sup>/M1270 Sp<sup>R</sup> КОЕ геновариантов уже на 4 сутки превышало КОЕ типичных штаммов в 77,6 раза. На 6 сутки их совместной инкубации наблюдалось отсутствие роста типичного штамма *V. cholerae* M1011 Km<sup>R</sup> на фоне активного роста штамма геноварианта M1270 Sp<sup>R</sup>, популяция которого сократилась незначительно. В популяции штаммов M893Rif<sup>R</sup>/301Sp<sup>R</sup> на 4 сутки исследования КОЕ обоих штаммов было примерно одинаковым. Однако на 18 сутки КОЕ штамма геноварианта 301Sp<sup>R</sup> было в 3,9 раза больше, чем у M893Rif<sup>R</sup>, а количество бактерий штамма P17644Sp<sup>R</sup> (проба P17644Sp<sup>R</sup>/M1062Rif<sup>R</sup>) превышало количество

**Результаты конкурентной пробы типичных штаммов и штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в автоклавированной речной воде, анализ скорости роста и экспрессии гена *groS***

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Место, год и источник выделения	КОЕ/мл*, определенное в водной среде через:				Скорость роста**		Относительная оценка экспрессии гена <i>groS</i> методом ОТ-ПЦР
		4 сут в смеси	6 сут в смеси	18 сут в смеси	18 сут монокультура	Количество КОЕ (x10 <sup>4</sup> )	ОП при 600 нм	
M1011 Km <sup>R</sup>	Башкирия, 1972, больной	1,06x10 <sup>4</sup>	0	0	1,7x10 <sup>4</sup>	850±20	0,23±0,04	0,12±0,03
M1270 Sp <sup>R</sup>	Татарстан, 1993, больной	8,22x10 <sup>5</sup>	6,4x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>	7,2x10 <sup>4</sup>	4251±29	1,1±0,01	0,88±0,03
M1062 Rif <sup>R</sup>	Астрахань, 1970, больной	2,0x10 <sup>4</sup>	н.о.	1,05x10 <sup>4</sup>	2,25x10 <sup>4</sup>	2960±110	0,84±0,01	0,35±0,05
P17644 Sp <sup>R</sup>	Ачинск, 1997, больной	6,04x10 <sup>4</sup>	н.о.	2,5x10 <sup>4</sup>	7,2x10 <sup>4</sup>	4736±32	1,45±0,02	2,77±0,08
M893 Rif <sup>R</sup>	Астрахань, 1970, больной	5,1x10 <sup>5</sup>	н.о.	1,24x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	2355±11	0,6±0,015	0
301 Sp <sup>R</sup>	Таганрог, 2011, внеш. среда	5,3x10 <sup>5</sup>	н.о.	4,0x10 <sup>4</sup>	9,8x10 <sup>4</sup>	4240±56	1,09±0,04	1,83±0,4
M818 Rif <sup>R</sup>	Саратов, 1970, больной	3,6x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	0	9,05x10 <sup>4</sup>	4501±61	0,97±0,005	1 (контроль)
Л3226 Str <sup>R</sup>	Москва, 2010, больной	3,32x10 <sup>5</sup>	2,6x10 <sup>5</sup>	2,15x10 <sup>5</sup>	3,78x10 <sup>5</sup>	4945±22	1,16±0,03	1,26±0,06

Примечание. н.о. — не определяли; \* приведены средние значения 3 опытов; \*\* рост в бульоне LB в течение 4 часов.

бактерий типичного штамма в данный период времени в 3,2 раза. Необходимо отметить, что, несмотря на отсутствие роста некоторых типичных штаммов (M1011 Km<sup>R</sup>, M818 Rif<sup>R</sup>) в конкурентной пробе, в контрольных пробирках (монокультура) указанные штаммы продолжали высеваться (таблица).

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что при совместном культивировании типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor в автоклавированной речной воде при комнатной температуре уровень адаптации последних был выше, чем у типичных штаммов.

На основании полученных сведений о доминировании штаммов геновариантов в конкурентной пробе нами было высказано предположение, что они могут отличаться от типичных изолятов более высокой скоростью роста. Действительно, в результате проведенных исследований установлено, что изученные штаммы геновариантов росли быстрее, чем типичные штаммы. Так, через 4 часа выращивания ОП штамма геноварианта M1270 Sp<sup>R</sup> (из пары M1011 Km<sup>R</sup>/M1270 Sp<sup>R</sup>) превышала данный показатель типичного штамма в 4,8 раза. ОП штамма геноварианта *V. cholerae* Л3226 Str<sup>R</sup> (M818 Rif<sup>R</sup> /Л3226 Str<sup>R</sup>) была в 1,2 раза, а у штаммов геновариантов P17644 Sp<sup>R</sup> и 301 Sp<sup>R</sup> соответственно в 1,7 и 1,8 раза больше, чем у типичных изолятов в паре. При этом данные по оптической плотности полностью согласовывались со сведениями, полученными при подсчете количества выросших на агаре колоний (таблица).

Итак, изученные штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor отличаются от типичных штаммов повышенной скоростью роста, что, возможно, способствует увеличению их адаптационных свойств при совместном нахождении с типичными штаммами.

Согласно данным литературы скорость роста бактерий является сложным процессом, зависящим от экспрессии многих генов. При этом важная роль в изменении экспрессии генов в условиях недостатка питательных веществ принадлежит альтернативным сигма-субъединицам, в том числе  $\sigma^s$ , кодируемой геном *groS* [5]. Учитывая данные литературы, на следующем этапе работы были проведены эксперименты по изучению экспрессии гена *groS* в анализируемых штаммах. В результате установлено, что экспрессия *groS* в штаммах геновариантов была в 1,3-7,9 раза больше, чем у типичных изолятов (таблица). Исключение составил только типичный штамм *V. cholerae* M893, у которого экспрессию гена *groS* определить не удалось. Возможно,

в данном штамме изменена структура гена *groS*, но для проверки данного предположения необходимы дополнительные исследования.

Для подтверждения полученных экспериментальных данных мы расширили выборку штаммов, взяв в анализ еще 8 штаммов геновариантов, в том числе завезенных на территорию РФ в последние годы. В результате все проверенные штаммы геновариантов также отличались от типичных изолятов повышенной скоростью роста и увеличенной экспрессией гена *groS* (данные не приводятся).

В ходе работы установлено, что штаммы геновариантов имеют конкурентные преимущества при их совместном нахождении с типичными штаммами в условиях недостатка питательных веществ (автоклавируемая речная вода). Согласно данным литературы выживание бактерий при действии различных стрессовых факторов (в том числе и при недостатке питательных веществ) зависит от скорости роста клеток непосредственно перед стрессом [5]. Действительно нами было установлено, что штаммы геновариантов в отличие от типичных изолятов растут быстрее, что, возможно, является одним из механизмов их лучшей адаптации при совместном нахождении с типичными штаммами. При этом необходимо отметить, что высокая скорость роста штаммов геновариантов могла быть обусловлена изменением процессов метаболизма, в том числе установленной нами ранее измененной способностью к ферментации глюкозы данными штаммами [4].

На основании выявленных селективных преимуществ штаммов геновариантов в условиях недостатка питательных веществ и способности к быстрому росту было высказано предположение, что в данных штаммах может быть увеличена экспрессия гена *groS*, являющегося глобальным регулятором стрессового ответа в штаммах холерного вибриона. По данным литературы ген *groS* кодирует биосинтез альтернативной сигма субъединицы  $\sigma^S$ , связывающейся с РНК-полимеразой и контролирующей экспрессию более 25 генов в штаммах холерного вибриона, в том числе необходимых для выживания в условиях стресса [13]. Специфическое накопление белка *RpoS* начинается в начале стационарной фазы роста бактерий, а при попадании бактерий в неблагоприятные условия (низкий pH, повышенная температура, осмотический и оксидативный стресс, недостаток питательных веществ) обеспечивает своевременную транскрипцию набора генов, необходимых для роста клеток в данных стрессовых условиях [5,13]. Действительно при изучении экспрессии гена *groS* методом ОТ-ПЦР было установлено, что в штаммах геновариантов его уровень экспрессии в 1,3-7,9 раза выше, чем у типичных штаммов. На наш взгляд, полученные сведения о повышенном уровне экспрессии гена *groS* в штаммах геновариантов будут востребованы в дальнейшей работе при изучении экологических свойств современного возбудителя холеры, а также могут объяснить некоторые ранее полученные результаты, в том числе повышенную устойчивость штаммов геновариантов по сравнению с типичными изолятами к осмотическому и оксидативному стрессу [3].

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor при совместном нахождении с типичными изолятами в условиях недостатка питательных веществ обладают выраженными адаптационными преимуществами. Одним из выявленных механизмов их селективного преимущества является повышенная скорость роста клеток. Важным, на наш взгляд, является установление повышенной экспрессии гена *groS* в штаммах геновариантов, что может способствовать их лучшей выживаемости при действии других стрессовых факторов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бароян О.В. Холера Эль-Тор. 2 изд. перераб. и доп. М., Медицина, 1971.
2. Заднова С.П., Шашкова А.В., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Фенотипический и генетический анализ измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара эльтор. Пробл. особо опасных инф. 2012, 1:57-61.
3. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Крепостнова И.М., Ерохин П.С., Смирнова Н.И. Влияние осмотического и оксидативного стрессов на штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. Журн. микробиол. 2015, 6:55-62.

4. Заднова С.П., Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Адамов А.К., Девдариани З.Л., Кутырев В.В. Сравнительный анализ метаболизма глюкозы в штаммах *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. 2017, 2:64-69.
5. Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология: Прокариоты. М., Мир, 2005.
6. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кулышань Т.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период. Вестник Российской академии медицинских наук. 2014,7-8:46-53.
7. Freter R., O'Brien P.C., Macsai M.S. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: in vivo studies. Infect. Immun. 1981, 34(1):234-240.
8. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods. 2001, 25(4):402-408.
9. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A. et al. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2002, 40(9):3296-3299.
10. Pradhan S., Mallick S.K., Chowdhury R. *Vibrio cholerae* classical biotype is converted to the viable non-culturable state when cultured with the El Tor biotype. PLOS ONE. 2013, 8: e53504.
11. Reimer A.R., Domselaar G.V., Stroika S. et al. Comparative Genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa Emerg. Infect. Dis. 2011, 17(11): 2113-2121.
12. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G. et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. Infect. Immun. 2011, 49:3739-49.
13. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 1998, 180:773-784.

*Поступила 15.07.18*

Контактная информация: Заднова Светлана Петровна, д.б.н.,  
410005, Саратов, Университетская, 46, р.т. (8452)26-47-23

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*В.Г.Акимкин<sup>1</sup>, А.В.Горелов<sup>1</sup>, А.Т.Подколзин<sup>1</sup>, Н.Б.Денисюк<sup>2</sup>*

## **ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ОРЕНБУРГСКОМ РЕГИОНЕ В ПРЕДВАКЦИНАЛЬНЫЙ ПЕРИОД**

<sup>1</sup>Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; <sup>2</sup>Оренбургский государственный медицинский университет

*Цель.* Провести анализ эпидемиологической ситуации по ротавирусной инфекции в Оренбургской области с учетом проявлений эпидемического процесса и молекулярно-генетических характеристик ротавирусов группы А. *Материалы и методы.* Представлены результаты эпидемиологического и молекулярно-генетического мониторинга ротавирусной инфекции в период 2013-2017гг. Молекулярно-генетическое типирование проведено на 232 образцах фекалий пациентов возраста до 3 лет с клиникой РВИ. Использовались методы ретроспективного эпидемиологического анализа, ИФА, ПЦР. *Результаты.* Показатели заболеваемости РВИ — высокие и имели тенденцию к росту. Наиболее поражаемым контингентом были дети возраста до 14 лет. Генетический потенциал популяции ротавирусов в регионе представлен десятью основными генотипами. Ведущее значение в эпидемическом процессе имели генотипы с наиболее высокой частотой встречаемости: G4[P]8 (56,9%), G9[P]8 (12,9%), Mixt (8,6%), G2[P]4 (7,7%), G1[P]8 (6,5%). *Заключение.* Выявлен значительный рост заболеваемости РВИ среди детского населения. Определены доминирующие генотипы ротавирусов, показано их региональное многообразие и смена в течение нескольких сезонов.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 30—36

Ключевые слова: генотипы, дети, заболеваемость, ротавирусная инфекция

## EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC MONITORING OF ROTAVIRUS INFECTION IN THE ORENBURG REGION IN THE PERIOD PREDICTIVELY

<sup>1</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; <sup>2</sup>Orenburg State Medical University, Russia

*Aim.* To analyze the epidemiological situation of rotavirus infection in the Orenburg region, taking into account the manifestations of the epidemic process and the molecular genetic characteristics of rotavirus group. *Materials and methods.* We presented the results of epidemiological and molecular genetic monitoring of rotavirus infection in the period 2013-2017. Molecular genetic typing was performed in 232 fecal samples of patients under 3 years of age with rotavirus infection. Were used methods of retrospective epidemiological analysis, ELISA, PCR. *Results.* The incidence of high tear and had a tendency to increase. The most affected were children under 14 years of age. The genetic potential of the rotavirus population in the region was represented by ten main genotypes. The leading significance in the epidemic process were genotypes with the highest frequency of occurrence: G4[P]8 (56,9%), G9[P]8 (12,9%), Mixt (8,6%), G2[P]4 (7,7%), G1[P]8 (6,5%). *Conclusion.* Were revealed a significant increase in the incidence of rotavirus infection among children. Were revealed the dominant genotypes of rotaviruses, their regional diversity and change during several seasons.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 30—36

Key words: genotypes, children, morbidity, rotavirus infection

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы острых кишечных инфекций (ОКИ) у детей обусловлена устойчивым сохранением ведущих мест в структуре детской заболеваемости и смертности. Диарейные заболевания занимают второе место в структуре смертности от инфекций детей младше 5 лет по всему миру. В 2011 году инфекционная диарея стала причиной 9,9% из 6,9 млн смертей в этой возрастной группе, причем более 70% умерших были младше 2 лет. По данным экспертов ВОЗ, среди 1-1,2 млрд диарейных заболеваний, регистрируемых ежегодно, от 49-67% приходится на вирусные инфекции. Выбор мер, необходимых для эффективного снижения заболеваемости и контроля за распространением вирусных диарей, является одной из важнейших проблем, стоящих перед системой здравоохранения как в развивающихся, так и в развитых странах [7, 12].

В настоящее время ротавирусы рассматривают как основной этиологический фактор ОКИ вирусного происхождения, особенно у детей возраста до 5 лет. Ежегодно во всем мире отмечается более 110 млн случаев ротавирусного гастроэнтерита, при этом лишь 25 млн заболевших обращаются за медицинской помощью, из них 2 млн детей госпитализируются в стационар. Количество летальных исходов в последние годы при ротавирусной инфекции достигает 352-611 тыс. случаев, из которых более 80% регистрируется в странах Азии и Африки [8]. На сегодняшний день ротавирусная инфекция (РВИ) самая массовая кишечная инфекция практически на всех территориях Земного Шара и является глобальной актуальной проблемой [12].

В Российской Федерации этиологическое подтверждение находит ротавирусный гастроэнтерит, частота которого, по данным отечественных авторов, в структуре ОКИ колеблется от 7 до 35%, а среди детей в возрасте до 3 лет превышает 60% [6]. Нозокомиальной инфекцией можно считать 20-50% случаев вирусного гастроэнтерита в детских соматических стационарах и родильных домах, при этом самые жесткие противоэпидемические мероприятия особо не улучшают ситуацию. Внутрибольничному инфицированию способствуют холодный сезон, длительное пребывание детей в стационаре и скученность в палатах [4,5]. Ротавирусная инфекция является серьезным экономическим бременем для системы здравоохранения.

Для создания поливалентной вакцины и оценки уже разработанных вакцин необходимо проведение мониторинга за циркуляцией ротавирусов различных геноти-

пов, распространенных на определенной территории. Более 95% случаев РВИ в мире вызываются пятью основными серотипами: G1[P]8, G2[P]4, G3[P]8, G4[P]8 и G9[P]8. В регионах РФ циркулируют различные генотипы ротавирусов группы А, но наиболее часто встречаются G1[P]8 и G4[P]8. Многочисленные исследования показали существование географических различий в распространенности различных генотипов ротавирусов [6, 9]. Установлен факт их временного перераспределения, зафиксировано появление большого количества нетипируемых штаммов, и постоянно сообщается о находках новых, эпидемически значимых вариантов ротавирусов [1,2].

Таким образом, в условиях планирования вакцинации от ротавирусной инфекции на регулярной основе приоритетным направлением повышения эффективности эпидемиологического надзора за ротавирусной инфекцией следует рассматривать совершенствование подходов к организации и проведению молекулярно-генетического типирования циркулирующих генотипов в отдельно взятом регионе.

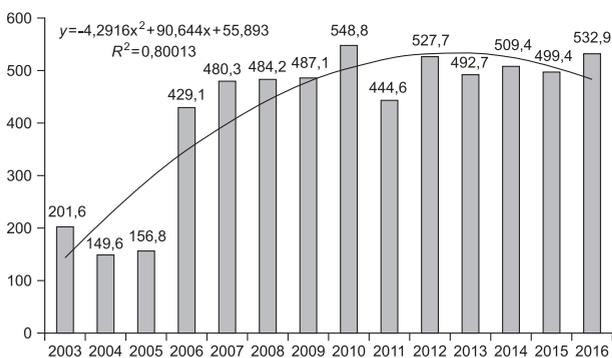
Цель исследования: проанализировать эпидемиологическую ситуацию по ротавирусной инфекции в Оренбургской области в предвакцинальный период с учетом проявлений эпидемического процесса и молекулярно-генетических характеристик ротавирусов группы А.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы данные материалов официальной статистики, представленные в документах государственного статистического учета заболеваемости по всем случаям РВИ за 2007-2016 гг. Использованы описательно-оценочные методы, методы ретроспективного эпидемиологического анализа. Сезонность РВИ оценивалась на основании помесячного распределения пациентов в период наблюдения 2007-2016 гг. Для прогнозирования заболеваемости РВИ использовалась методика экстраполяции. Генетическая структура ротавирусов представлена в 232 образцах фекалий от пациентов возраста до 3 лет с клиникой РВИ, проходивших стационарное лечение в Оренбургской областной клинической инфекционной больнице в период 2013-2017 гг. Молекулярно-генетические исследования с применением наборов реагентов и лабораторных методик на основе ПЦР проводились в лаборатории отдела молекулярной диагностики ЦНИИ эпидемиологии. Статистическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За последние десять лет показатели заболеваемости ОКИ в Оренбургской области — высокие и имели тенденцию к росту (рис.1). Структура заболеваемости населения ОКИ на территории области за период 2007-2016 гг. характеризовалась снижением удельного веса доли кишечных инфекций неустановленной



**Рис. 1.** Динамика уровня заболеваемости ОКИ у населения Оренбургской области в 2003-2016 гг. (на 100 тыс. населения).

etiологии. На фоне внедрения новых лабораторных методик и увеличения охвата населения лабораторным обследованием доля вирусных диарей в структуре ОКИ установленной этиологии увеличилась к концу периода наблюдения до 48,9%, определив ведущее значение ротавирусных гастроэнтеритов.

Многолетняя динамика уровня заболеваемости РВИ населения Оренбургской области показала значительный рост показателей с 2007 года (в 26,8 раза, с 2,7 на 100 тыс. населения в 2007 г. до 74,9

на 100 тыс. населения в 2016 г.), при этом более чем в 2 раза рост показателя заболеваемости РВИ произошел за последние 4 года ( $p < 0,001$ ) (рис.2). Прогнозируемый рост показателя заболеваемости РВИ по Оренбургской области на ближайшие 5 лет с использованием метода экстраполяции составил как минимум в 2 раза. Во внутригодовой динамике заболеваемости РВИ была выявлена зимне-весенняя сезонность, отмечена одна сезонная волна заболеваемости с максимально выраженными пиковыми месячными значениями в феврале, марте.

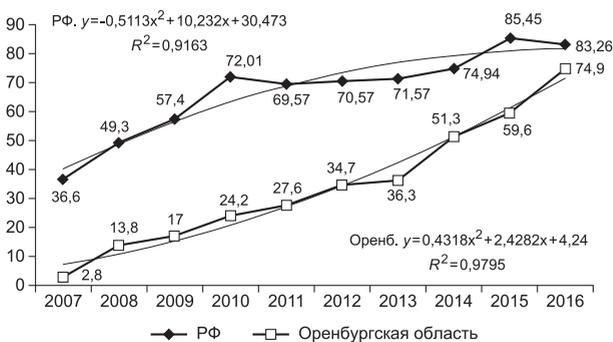


Рис. 2. Динамика уровня заболеваемости РВИ у населения Оренбургской области в 2007-2016 гг. в сравнении с показателями заболеваемости по РФ (на 100 тыс. населения).

Наиболее поражаемым контингентом были дети до 14 лет, составляющие 98% от общего числа зарегистрированных случаев, при этом определяли возрастную структуру дети возраста до двух лет. Эпидемический процесс РВИ на территории Оренбургской области определялся спорадической заболеваемостью. Официальные данные по вспышечной заболеваемости с участием ротавирусов представлены в Государственных докладах по Оренбургской области, начиная с 2015 года. По итогам двух лет (2015-2016 гг.) ротавирусы группы А в 11-19% случаев являлись причиной вспышечной заболеваемости, занимали третье ранговое место в структуре вспышечной заболеваемости (уступая норовирусам и энтеровирусам), что указывает на высокую эпидемиологическую значимость ротавирусов в реализации вспышечной заболеваемости в Оренбургской области, как и в целом по РФ. Вспышечная заболеваемость РВИ регистрировалась преимущественно у детей в организованных коллективах с высокой долей детей (92,3% в 2015 году и 100% в 2016 году), с фекально-оральным механизмом передачи (с реализацией контактно-бытового и пищевого путей), что определяло комплекс необходимых противоэпидемических мероприятий (О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Оренбургской области в 2016 году. Государственный доклад).

Была определена общая генетическая структура популяции ротавирусов группы А, выраженная частотами аллелей G/P, были установлены основные и доминирующие генотипы ротавирусов, их межсезонные колебания. Генетический потенциал ротавирусов за весь период исследования был представлен десятью основными вариантами генотипов по G/P аллелям: G4[P]8, G3[P]8, G3[P]9, G2[P]4, G1[P]8, G9[P]8, G12[P]8, Mixt, ведущее значение в эпидемическом процессе имели генотипы с наиболее высокой частотой встречаемости: G4[P]8 (56,9%), G9[P]8 (12,9%), Mixt (8,6%), G2[P]4 (7,7%), G1[P]8 (6,5%) (табл.).

**Частота выявления различных генотипов ротавирусов группы А на территории Оренбургской области в разные эпидемические сезоны**

Генотипы	Эпидемический сезон (гг.)									
	2013-2014 n=69		2014-2015 n=57		2015-2016 n=54		2016-2017 n=52		Всего n=232	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
G4[P]8	41	59,4**	48	84,3**	29	53,7*	14	26,9	132	56,9
G3[P]8	11	15,9	1	1,7	0	0	1	1,9	13	5,6
Mixt	8	11,6	1	1,7	11	20,4	0	0	20	8,6
G2[P]4	7	10,1	0	0	6	11,1	5	9,6	18	7,7
G1[P]8	1	1,5	7	12,3	4	7,5	3	5,8	15	6,5
G3[P]9	1	1,5	0	0	1	1,8	0	0	2	0,9
G9[P]8	0	0	0	0	1	1,8	29	55,8*	30	12,9
G12[P]8	0	0	0	0	2	3,7	0	0	2	0,9

Примечание. \*  $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ; \*\*  $p < 0,001$ ,  $\chi^2$ .

Генотип G4[P]8 стабильно и достоверно чаще ( $p < 0,001$ ,  $\chi^2$ ) других генотипов доминировал в трех эпидемических сезонах 2014–2016 гг., в сезон 2016–2017 гг. произошла смена доминирующего G4[P]8 генотипа на G9[P]8 генотип. Генотип G9[P]8 отсутствовал в двух сезонах начала исследования (сезон 2013–2014 гг., сезон 2014–2015 гг.), определялся в единичных случаях в сезоне 2015–2016 гг. и занимал лидирующую позицию в сезон 2016–2017 гг. с достоверным отличием от генотипов G4[P]8, G2[P]4 ( $p = 0,006$ ;  $p < 0,001$ ,  $\chi^2$ ), переместив на вторую позицию генотип G4[P]8 и подтверждая теорию сезонной смены и изменчивости генотипов. Штаммы генотипов Mixt (8,6%), G2[P]4 (7,7%), G1[P]8 (6,5%) присутствовали в популяции эпизодически с неустойчивыми показателями в течение всех сезонов. Генотипы G3[P]9 (0,9%), G12[P]8 (0,9%) регистрировались в популяции в единичных случаях, что позволило отнести их к числу редких, не оказывающих заметного влияния на генофонд популяции ротавирусов в регионе в целом.

Полученные данные по циркуляции ротавирусов подтвердили их неоднородность и сравнимы с данными мониторинга за циркуляцией ротавирусов группы А в РФ в указанные эпидемические сезоны. Отмечалась выраженная географическая неоднородность в распределении различных генотипов ротавирусов в пределах каждого сезона, при которой генотип, имеющий максимальную распространенность в целом по стране, оказывался минорным на отдельных территориях [1, 3]. В 2016 году сохранялось превалирование G4[P]8 генотипа, отмечена тенденция к снижению частоты выявления G3[P]8 и увеличению G9[P]8 генотипов (Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году»). По данным Европейской сети надзора за ротавирусами, в период 2011–2014 гг. в 14 странах Евросоюза, на территории которых проводился мониторинг антигенных типов ротавирусов, отмечалось доминирование G1[P]8 генотипа, составляющего 40–42% от всех выявленных изолятов. На территории Китая в 2012–2013 гг. отмечалось превалирование генотипа G9[P]8, в более ранние периоды превалировал G3[P]8 генотип. Таким образом, генотип G4[P]8 не являлся превалирующим ни для стран Евросоюза, ни для восточных соседей Российской Федерации [9].

Были определены частотные характеристики G/P аллелей в популяции ротавирусов в регионе. По выявляемым вариантам на протяжении всего периода исследования по аллели G наибольшую распространенность достоверно чаще имела аллель G4 ( $p < 0,001$ ,  $\chi^2$ ). Имели стабильный уровень, но несколько меньшую распространенность аллели G1 и G2. Аллель G3 лишь в начале исследования (сезон 2013–2014 гг.) имела достаточно высокую частоту встречаемости, принимая единичные случаи в конечном периоде исследования. Аллель G9 показала высокую активность в конечном периоде исследования (сезон 2016–2017 гг.), достоверно чаще других аллелей этого сезона ( $p = 0,005$ ,  $\chi^2$ ), в остальные периоды аллели G3 и G9 имели в популяции низкую частоту встречаемости с нестабильными позициями, периодически сменяя друг друга и снижая свою численность вплоть до полного отсутствия. По аллели [P] доминирующие позиции за весь период исследования имела аллель [P]8 с достоверными отличиями по сравнению с другими аллелями ( $p < 0,001$ ,  $\chi^2$ ), аллель [P]4 имела незначительные колебания по частоте встречаемости в разные сезоны, но занимала постоянные позиции с более низким уровнем. Аллель [P]9 за весь период наблюдений была выявлена однократно в двух разных сезонах, что позволило отнести данный вариант в число редко встречаемых, не оказывающих заметного влияния на генофонд популяции ротавирусов в регионе в целом.

В представленных для исследования образцах была получена высокая частота сочетанного выявления одновременно различных генотипов ротавирусов (20 образцов), которые составили группу сочетанных (Mixt) форм. Частота выявления сочетанных форм различных генотипов (ротавирус-ротавирусных) также варьировала в разные эпидемические сезоны. Так, в сезон 2013–2014 гг. на долю генотипа G4,3[P]8 приходилось 62,5%, при этом в следующем эпидемическом сезоне 2014–2015 гг. указанный генотип утратил свое эпидемиологическое значение и не циркулировал,

а выявился лишь один случай РВИ вызванной генотипом G2,3[P]8, не циркулировавшего в предыдущем сезоне и не имеющего эпидемиологического значения в популяции ротавирусов в целом. В сезоне 2015-2016 гг. у 54,5% детей выявляли РВИ вызванную генотипом G4,1[P]8, данный генотип не циркулировал в двух предыдущих эпидемических сезонах и утратил свое значение уже в следующем сезоне 2016-2017 гг. На протяжении всего периода исследования по аллели G наибольшую распространенность имели аллели G4(80%) и G3(45%) при одинаковой и достаточно высокой (в 30%) доле аллелей G1 и G2 и очень низкой доле аллели G9 (5,0%). По аллели [P] доминирующие позиции за период исследования имела аллель [P]8 с частотой встречаемости 100%, на долю аллели [P]4 приходилось 25%. Сочетанные формы различных генотипов в образцах регистрировались в течение трех эпидемических сезонов, кроме сезона 2016-2017 гг. с достаточно высокой частотой 11,6% в сезоне 2013-2014 гг. и очень высокой частотой 20,4% в сезон 2015-2016 гг. На протяжении всего периода исследования эпидемиологическое значение имели генотипы G4,3[P]8 и G4,1[P]8, сменяя друг друга в разные сезоны. Средний показатель частоты выявления сочетанных форм различных генотипов за весь период исследования по региону составил 8,6% (20 образцов из 232), что значительно превысило аналогичный показатель по РФ (4,4%).

В исследованиях последних лет по РФ частота выявления в образцах сочетанных форм различных генотипов ротавирусов для периода 2011-2015 гг. составила 4,4%. В период 2006-2013 гг. для стран Евросоюза данный показатель суммарно составил 7%. Для таких стран как США, Япония, ряда стран Европы, характеризующихся относительно умеренной активностью циркуляции ротавирусов среди детей младших возрастных групп, доля случаев сочетанного выявления в образцах нескольких генотипов ротавирусов колеблется в пределах 1-6%, на территориях с высокой активностью циркуляции ротавирусов в популяции она может достигать 10-18%. По заключению ряда исследователей, высокая частота сочетанного выявления в образцах различных генотипов ротавирусов группы А создает условия для реализации рекомбинационной и реассортационной изменчивости и может служить потенциальным критерием активности их эволюции на определенной территории [6, 9, 11].

Таким образом, с учетом высокой частоты выявления сочетанных форм можно сформулировать эпидемиологический прогноз для региона: в условиях отсутствия вакцинации на территории региона в течение нескольких лет высокие изменчивость и скорость накопления мутаций могут привести к появлению новых генетических комбинаций ротавирусов, вызывающих нетипичные, возможно, более тяжелые формы заболеваний. Научные данные подтверждают, что такие события могут сопровождаться периодическим появлением мутантных генотипов штаммов, несущих в себе риск эволюционного скачка, что делает вероятной угрозу возникновения штаммов, способных вызвать пандемии [10]. Территориальная близость Казахстана и Средней Азии, открытость границ и высокий уровень строительной миграции населения (особенно в летний период) являясь неблагоприятными факторами для накопления мутантных генотипов в условиях региона. Усиливают роль неблагоприятных факторов отсутствие лабораторной диагностики РВИ в приграничных районах Оренбургской области (Акбулакском, Первомайском, Светлинском, Соль-Илецком, Ташлинском) и характерный для региона умеренный климатический пояс. В сложившейся ситуации эпидемиологический и молекулярно-генетический мониторинг за циркуляцией ротавирусов на территории Оренбургского региона позволит не только правильно оценить проявления эпидемического процесса РВИ, но и своевременно принять решения по разработке и организации противоэпидемических мероприятий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Симбирцев А.С. Генетические и антигенные варианты ротавируса человека, циркулирующие на Европейской территории России. Инфекция и иммунитет. 2014, 4(3):229-234.

2. Жираковская, Е.В., Аксанова Р.Х., Горбунова М.Г. и др. Генетическое разнообразие изолятов ротавирусов группы А, выявленных в Западной Сибири в 2007-2011 гг. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012, 4:33-41.
3. Зайцева Е.В., Ольнева Т.А., Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Шипулин Г.А. и др. Результаты мониторинга антигенных типов ротавирусов гр.А на территории Российской Федерации в период 2011-2015 гг. Клиническая лабораторная диагностика. 2016, 61(7) 445-448.
4. Кригер Е.А., Самодова О.В., Назаренко С.Ю. Внутрибольничная ротавирусная инфекция у детей. Инфекционные болезни. 2013, 11(3):62-65.
5. Литвинчук О.А., Коновалова Т.А., Подколзин А.Т., Горелов А.В., Шипулин Г.А. Нозокомиальные кишечные инфекции в инфекционных отделениях детских стационаров. Молекулярная диагностика. 2014, 2(12):413-415.
6. Плоскирева А.А. Острые кишечные инфекции вирусной этиологии у детей: клиника, диагностика и терапия. Автореферат дисс. докт. мед. наук. М, 2016.
7. Подколзин А.Т. Эпидемиологическая и клиническая характеристика острых кишечных инфекций вирусной этиологии в Российской Федерации. Автореф. дисс. докт. мед. наук. М., 2015.
8. Lanata C.F. Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF Global causes of diarrheal disease mortality in children younger 5 years of age: a systematic review. PLoS One. 2013, 8(9): e72788.
9. Lozano R., Naghavi M., Foreman K. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 2013;380(9859):2095-2128.
10. Mandal S., Mandal M.D. Is Rotavirus Gastroenteritis a Global Emerging. Re-Emerg Probl. Transl. Med. 2014, 4(143):2161-1025.
11. Parashar U.D., Gibson C.J., Bresee J.S. et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea. Emerg. Infect. Dis. 2006, 12:304-306.
12. Vesicari T., Hemming M., Huhti L. et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with more severe clinical manifestations of acute gastroenteritis. Pediatr. Infect. Dis. J. 2014, 33(4):366-371.

*Поступила 29.11.18*

Контактная информация: Денисюк Нина Борисовна, к.м.н.,  
460000, Оренбург, ул. Советская, 6, р.т. (3532)77-61-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Е.А.Базыкина<sup>1,2</sup>, О.Е.Троценко<sup>2</sup>, В.Б.Туркутоков<sup>1</sup>, Л.А.Балахонцева<sup>2</sup>, В.О.Котова<sup>2</sup>*

## **ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВИЧ-АССОЦИИРОВАННОГО ТУБЕРКУЛЕЗА В ДАЛЬНЕВОСТОЧНОМ РЕГИОНЕ**

<sup>1</sup>Тихоокеанский государственный медицинский институт, Владивосток; <sup>2</sup>Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии

*Цель.* Выявить эпидемиологические проявления сочетанной патологии ВИЧ-инфекции и туберкулеза (ТБ) в Дальневосточном федеральном округе (ДФО). *Материалы и методы.* Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ данных официальной статистической формы №61 «Сведения о контингентах больных ВИЧ-инфекцией» в отношении сочетанного инфицирования ВИЧ и ТБ пациентов, состоящих на диспансерном учете. *Результаты.* В ДФО отмечена тенденция роста общей распространенности ТБ на фоне относительной стабилизации частоты ежегодного выявления данного заболевания среди ВИЧ-позитивных лиц (2006-2015 гг.). Показано, что большинство субъектов ДФО (Хабаровский и Приморский края, Амурская и Еврейская автономная области, Чукотский автономный округ и Республика Якутия) являются территориями высокого риска заражения ТБ. Выявлена статистически значимая ( $r=0,66$ ,  $p=0,003$ ) прямая связь между возникновением активной формы ТБ у лиц с ВИЧ-инфекцией и развитием стадии СПИД. Доля пациентов с активным ТБ от общего числа ВИЧ-позитивных в среднем по ДФО за 10 лет составила 65,0%. Превалентность ТБ у ВИЧ-инфицированных лиц из мест лишения свободы на 19,2%

превысила аналогичный показатель у свободного гражданского населения. *Заключение.* ДФО является территорией Российской Федерации с высоким и нестабильным уровнем распространения ТБ среди ВИЧ-положительных лиц.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 36—44

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, туберкулез, эпидемический процесс, проявления эпидемиологического процесса

*E.A.Bazykina*<sup>1,2</sup>, *O.E.Trotsenko*<sup>2</sup>, *V.B.Turkutyukov*<sup>1</sup>, *L.A.Balakhontseva*<sup>2</sup>, *V.O.Kotova*<sup>2</sup>

## EPIDEMIOLOGY OF HIV-ASSOCIATED TUBERCULOSIS IN THE FAR EASTERN FEDERAL DISTRICT

<sup>1</sup>Pacific State Medical University, Vladivostok; <sup>2</sup>Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russia

*Aim.* To determine epidemiologic manifestations of HIV-infection associated with tuberculosis in the Far Eastern Federal District (FEFD). *Materials and methods.* The retrospective epidemiologic analysis was performed based on the official statistical data form № 61 «Data on HIV infected population» in reference to clinically registered HIV and tuberculosis co-infected patients. *Results.* The research revealed a growth trend of general tuberculosis prevalence against the background of stabilization of the tuberculosis incidence in HIV-positive patients in the FEFD during 2006-2015. High tuberculosis-burden was registered in the most of the Far Eastern federal district constituent entities (Khabarovsk and Primorsky regions, Jewish and Chukotka autonomous districts, Amursk oblast, and Republic Sakha (Yakutia)). A statistically significant positive correlation ( $r=0,66$ ,  $p=0,003$ ) between percentage of active tuberculosis in HIV-positive patients and percentage of patients with AIDS was identified. The percentage of active tuberculosis in HIV-positive people on average over 10 years equaled to 65.0%. The prevalence rate of tuberculosis was higher by 19.2% in HIV-positive inmates compared with HIV-positive civilians. *Conclusion.* The FEFD is a constituent entity of the Russian Federation with high and unstable levels of tuberculosis prevalence in people living with HIV.

Zh. Mikrobiol. (Moscow). 2019, No. 2, P. 36—44

Key words: HIV-infection, tuberculosis, epidemic process, manifestation of the epidemiologic process

## ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез (ТБ) является одной из основных причин смерти ВИЧ-инфицированных лиц и относится к СПИД-индикаторным заболеваниям. Так, в 2016 году удельный вес туберкулеза составил 40% в структуре смерти среди ВИЧ-положительных пациентов в мире. Риск развития туберкулеза у ВИЧ-инфицированных в 20-30 раз выше по сравнению с неинфицированными лицами [2, 9].

В Российской Федерации распространенность и заболеваемость туберкулезом населения имеют тенденцию к снижению, тогда как аналогичный общероссийский показатель, определенный для ВИЧ-инфицированных лиц, напротив, ежегодно растет [3, 6, 7]. Увеличивается и частота развития тяжелых форм заболевания у ВИЧ-положительных пациентов, инфицированных микобактериями туберкулеза [11]. При отсутствии лечения или нерегулярном приеме антиретровирусных и противотуберкулезных препаратов у ВИЧ-положительных пациентов, как правило, развиваются наиболее тяжелые генерализованные (55%) и диссеминированные (15%) формы туберкулеза, что связано с резким ослаблением иммунитета у данной группы пациентов из-за нарушения слаженной работы Th1, Th2-лимфоцитов и макрофагов, отвечающих за элиминацию микобактерий и ограничение казеозного некроза в очаге, а также с формированием множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) возбудителей туберкулеза [3, 6, 11].

Рядом авторов показано, что распространенность среди населения Дальневосточного федерального округа (ДФО) туберкулеза с МЛУ микобактерий в 2 ра-

за превысила аналогичный российский показатель, составив в 2016 г. 51,7 случаев на 100 тыс. населения. Отмеченный факт свидетельствует о более высоком в ДФО риске заражения данной формой туберкулеза населения, включая ВИЧ-инфицированных лиц [3]. Напряженная ситуация в отношении сочетанного инфицирования ВИЧ/ТБ складывается и в учреждениях Федеральной службы исполнения наказаний (ФСИН), где содержится значительная доля ко-инфицированных ВИЧ/ТБ заключенных [5].

В связи с вышеизложенным, нам представилось важным выявить основные эпидемиологические проявления сочетанной патологии ВИЧ-инфекции и туберкулеза, характерные для Дальневосточного федерального округа, что и явилось целью настоящей работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для достижения поставленной цели были использованы данные официальной годовой статистической формы № 61 «Сведения о контингентах больных ВИЧ-инфекцией» за 2006-2015 гг., оформляемой региональными центрами по профилактике и борьбе со СПИД ДФО. В его состав входят Хабаровский край, Еврейская автономная область (ЕАО), Приморский край, Республика Саха (Якутия), Чукотский автономный округ (ЧАО), Сахалинская область, Магаданская область, Амурская область и Камчатский край.

Расчет уровня заболеваемости и распространенности пациентов с сочетанным инфицированием ВИЧ и *Mycobacterium tuberculosis*, в том числе с активным туберкулезным процессом, произведен за период наблюдения 2006-2015 гг., исходя из общего числа ВИЧ-инфицированных пациентов, находившихся на диспансерном учете. Для каждого субъекта ДФО определены отдельные показатели пораженности туберкулезом ВИЧ-позитивного свободного населения и заключенных лиц, а также удельный вес ВИЧ/ТБ — ко-инфицированных заключенных, отбывавших наказание в системе ФСИН за 2010-2015 гг., в структуре общего числа ВИЧ-позитивных пациентов, состоявших на диспансерном учете на конец отчетного периода.

При статистической обработке результатов исследования проводилось вычисление средних значений ( $M$ ) и ошибки средней величины ( $m$ ). Достоверность различия полученных результатов подтверждалась с помощью  $t$ -критерия Стьюдента для независимых переменных. Разница относительных показателей вычислялась с использованием общестатистических методов анализа. Статистическая достоверность выявленных различий подтверждалась при  $p < 0,05$ . Выравнивание динамических рядов с вычислением среднескользящих темпов прироста/убыли показателей осуществлялось методом наименьших квадратов (регрессии). Корреляционный анализ проводился посредством вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ динамики и интенсивности эпидемического процесса показал, что в целом по ДФО за 10 лет наблюдения (2006-2015 гг.) показатель распространенности туберкулеза среди общего числа ВИЧ-инфицированных лиц, состоящих на диспансерном учете (в расчете на 1000 пациентов с ВИЧ-инфекцией), имел тенденцию к росту — с  $72,6 \pm 3,4\%$  до  $162,8 \pm 3,4\%$ , соответственно в 2006 и 2015 гг., увеличившись за эти годы наблюдения почти в 2,2 раза ( $p < 0,001$ ). При этом, среднескользящий темп прироста составил 8,2%.

Средний уровень превалентности туберкулеза среди ВИЧ-инфицированных лиц в целом по ДФО за анализируемые годы составил  $148,1 \pm 1,2\%$ . Однако выявлена явная территориальная неравномерность данного показателя. Наиболее неблагоприятная ситуация сложилась в Еврейской автономной области (ЕАО), Хабаровском и Приморском краях, где среднескользящие показатели распространенности туберкулеза среди ВИЧ-положительных лиц превысили аналогичный федераль-

ный окружной уровень и составили, соответственно,  $336,6 \pm 16,6\%$ ,  $180,9 \pm 3,4\%$  и  $156,9 \pm 1,6\%$ . При этом, если на территории ЕАО выявлена тенденция снижения данного показателя ( $-1,4\%$ ) за 10 лет наблюдения, то в Хабаровском и Приморском краях, напротив, средний темп прироста за 2006-2015 гг. составил  $8,6\%$  и  $9,5\%$ , соответственно. Несмотря на относительно небольшую частоту распространенности данной ко-инфекции ( $83,6 \pm 11,2\%$ ), высокий темп прироста случаев туберкулеза у ВИЧ-инфицированных пациентов отмечен и в Чукотском автономном округе ( $16,5\%$ ). Наиболее выраженная тенденция к снижению уровня распространенности сочетанной патологии имела место в Магаданской области и Камчатском крае, где среднеголетний темп убыли составил  $19,7\%$  и  $16,8\%$ , соответственно, и средние за 10 лет по региону показатели превалентности туберкулеза у лиц с ВИЧ-инфекцией были значительно меньше таковых, отмеченных в целом по ДФО.

Не менее важным является показатель частоты возникновения новых случаев туберкулеза у ВИЧ-инфицированных, состоящих на диспансерном учете. Так, за анализируемый период заболеваемость туберкулезом указанных ВИЧ-инфицированных лиц составила в целом по ДФО  $39,7 \pm 0,7\%$  в среднем в год. При этом, среднеголетние показатели выявления новых случаев туберкулеза на фоне ВИЧ-инфекции варьировали по субъектам ДФО от  $14,0 \pm 3,2\%$  в Магаданской области до  $46,7 \pm 0,9\%$  в Приморском крае. Причем, в Приморском крае и ЕАО они превысили аналогичный уровень, отмеченный в целом по Дальневосточному региону. Статистически значимо меньший среднеголетний уровень заболеваемости ВИЧ/ТБ по сравнению со средним федеральным окружным уровнем ( $39,7 \pm 0,7\%$ ) отмечен в Сахалинской области ( $30,3 \pm 3,1\%$ ,  $p=0,003$ ), Хабаровском ( $29,8 \pm 1,5\%$ ,  $p=10^{-9}$ ) и Камчатском ( $17,6 \pm 3,19\%$ ,  $p=10^{-11}$ ) краях, Республике (Саха) Якутия ( $16,4 \pm 1,7\%$ ,  $p < 10^{-20}$ ) и Магаданской области ( $14,0 \pm 3,2\%$ ,  $p=10^{-15}$ ). В последних трех субъектах отмечены наименьшие в ДФО показатели среди ВИЧ-инфицированных пациентов, что коррелирует с данными литературы, указывающими на наиболее низкий уровень заболеваемости туберкулезом и среди совокупного населения Магаданской области, Республики Саха (Якутия) и Камчатского края по сравнению с другими регионами ДФО за 2006-2015 гг. [1].

Несмотря на то, что в целом по ДФО среднегодовой темп прироста заболеваемости туберкулезом ВИЧ-инфицированных пациентов составил всего  $1,0\%$ , в большинстве субъектов ДФО зарегистрированы более высокие аналогичные показатели. Так, в Хабаровском крае темп прироста составил  $9,9\%$ , Амурской области —  $9,4\%$ , Республике Саха (Якутия) —  $6,6\%$ , ЕАО —  $5,3\%$ , ЧАО —  $3,6\%$  и Сахалинской области —  $1,7\%$ . В Приморском крае за 10-летний период наблюдения произошла относительная стабилизация интенсивности эпидемического процесса туберкулеза у ВИЧ-инфицированных пациентов. Снижение показателей заболеваемости произошло в Камчатском крае и Магаданской области (среднеголетние темпы убыли составили  $5,7\%$  и  $6,2\%$ , соответственно).

Наибольшую эпидемиологическую опасность представляют ВИЧ-позитивные пациенты с активным туберкулезом в связи с возможным бактериовыделением, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя к противотуберкулезным препаратам. Причем, риск заражения в случае наличия активного туберкулезного процесса у источника инфекции велик как для контактных ВИЧ-позитивных лиц, так и для контактных лиц с отсутствием ВИЧ-инфекции. Важно отметить, что доля активного туберкулеза среди общего числа ВИЧ/ТБ ко-инфицированных лиц ДФО за 10-летний период оставалась высокой ( $49,7 \pm 1,1\%$  и выше) и в среднем составила  $65,0 \pm 0,4\%$ , что является прогностически неблагоприятным эпидемиологическим признаком. В многолетней динамике наибольшие значения показателей регистрировались в 2006, 2010 и 2015 гг.

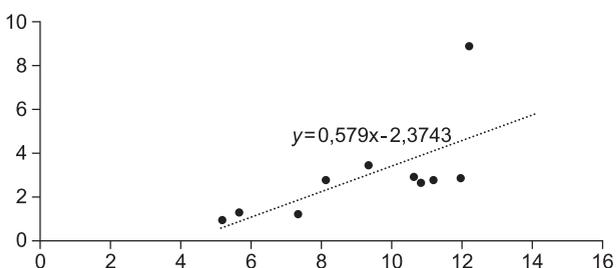
При этом, среднеголетний удельный вес активного туберкулеза на фоне ВИЧ-инфекции значительно варьировал на территориях ДФО. Достоверно более низкие показатели по сравнению со средним по ДФО значением выявлены лишь в Хабаровском крае ( $55,6 \pm 1,0\%$ ,  $p < 10^{-20}$ ), тогда как в ЕАО и Приморском крае средний

за 10 лет удельный вес оказался статистически значимо более высоким —  $92,3 \pm 1,6\%$  ( $p=10^{-17}$ ) и  $66,6 \pm 0,5\%$ , ( $p=0,02$ ) соответственно. На остальных территориях ДФО (Амурская область —  $64,6 \pm 2,7\%$ ; Республика Саха (Якутия) —  $67,2 \pm 2,6\%$ ; ЧАО —  $58,8 \pm 6,9\%$ ; Сахалинская область —  $70,1 \pm 2,5\%$ , Магаданская область —  $56,5 \pm 7,3\%$ , Камчатский край —  $72,4 \pm 5,9\%$ ) достоверных отличий от среднемноголетнего значения доли активного туберкулеза среди ВИЧ/ТБ инфицированных лиц, рассчитанного в целом для ДФО, выявлено не было ( $p > 0,05$ ).

Как известно, при контакте с источником инфекции развитие туберкулезного процесса наиболее часто происходит у людей с выраженным иммунодефицитом. Поскольку для стадии СПИД (развернутой стадии ВИЧ-инфекции) характерна наиболее яркая выраженность иммунодефицита, способствующая активизации условно патогенных и патогенных возбудителей, которые обитают в организме ВИЧ-инфицированных пациентов, нами предпринята попытка установления связи динамического изменения по годам (с 2006 по 2015 гг.) показателей частоты развития туберкулеза, в том числе активного, и СПИД среди лиц с ВИЧ-инфекцией, находящихся на диспансерном наблюдении (рис.).

Для измерения тесноты связи между изучаемыми явлениями, а также для установления направления зависимости между ними применен способ вычисления коэффициента корреляции ( $r$ ). При этом, корреляционный анализ выявил прямую связь, как между частотой распространения туберкулеза и удельным весом СПИД, так и между долей активного туберкулеза и частотой выявления СПИД среди ВИЧ-инфицированных лиц. Степень тесноты связи была расценена как средняя, несмотря на то, что во втором случае (при наличии у больных ВИЧ-инфекцией активного туберкулеза) коэффициент корреляции оказался несколько выше ( $r=0,66$  против  $r=0,46$ ), и только для него установлена достоверность ( $p=0,0034$ ). Выявленная таким образом статистически значимая связь может указывать либо на причинную зависимость развития стадии СПИД от наличия активной формы туберкулеза у ВИЧ-инфицированных пациентов, либо на взаимное негативное влияние явлений друг на друга.

Не менее значимой остается проблема распространения туберкулеза среди ВИЧ-инфицированных лиц, находящихся в местах лишения свободы. Согласно данным литературы, высокая скученность и низкий уровень санитарно-гигиенических условий жизни, все еще имеющих место в учреждениях уголовно-исполнительной системы, а также особый контингент содержащихся в них лиц, как правило, из числа маргинальных слоёв общества и социально неадаптированных групп насе-



**Корреляция между удельным весом ВИЧ-позитивных пациентов с активным туберкулезом и пациентов в стадии СПИД, находящихся на диспансерном учете в территориальных центрах ДФО по борьбе и профилактике со СПИД в 2006-2015 гг. (в расчете на 100 ВИЧ-инфицированных).**

Ось ординат — доля ВИЧ-позитивных пациентов в стадии СПИД (%). Ось абсцисс — доля активного туберкулеза среди ВИЧ-позитивных лиц (%). Кружками показаны годы (2006-2015), во время которых проводился анализ сравниваемых показателей. Пунктиром обозначена прямая регрессии.

ления (употребляющих алкоголь, наркотические препараты и пр.), способствуют распространению туберкулеза и ВИЧ-инфекции, уровни заболеваемости которыми в учреждениях системы исполнения наказаний превышают аналогичные показатели среди свободного населения. В связи с этим, авторы публикаций по данной теме считают неустойчивой эпидемиологическую ситуацию в пенитенциарных учреждениях по туберкулезу, протекающего в том числе в ассоциации с ВИЧ-инфекцией. Более того, следственный изолятор, по мнению исследователей, следует рассматривать в качестве места, в котором среди заключенных под стражу лиц часто выявляются ВИЧ-инфекция

и туберкулез впервые [4, 8, 10]. Так, отмечено ежегодное увеличение (на 10–20%) числа лиц с туберкулезом среди освободившихся из заключения людей по сравнению с количеством вновь поступивших в места лишения свободы, что, несомненно, оказывает существенное влияние на эпидемиологическую обстановку и среди гражданского населения [6].

В целом по ДФО на протяжении шестилетнего периода наблюдения (2010–2015 гг.) распространенность туберкулеза среди заключенных с ВИЧ-положительным статусом практически ежегодно, за исключением 2013 г., оставалась выше аналогичного показателя, определенного для ВИЧ-инфицированного свободного населения. Среднемноголетний уровень распространенности туберкулеза среди ВИЧ-инфицированных, находившихся в местах лишения свободы, превысил аналогичный показатель среди гражданского населения почти на 19,2% ( $p=0,0004$ ).

Однако необходимо отметить, что данное явление четко прослеживалось лишь в 3 из 9 территорий ДФО: Республике Саха (Якутия), Еврейской автономной области и Магаданской области, причем для первых двух субъектов разница в показателях превалентности оказалась достоверной. В Приморском крае показатели распространения туберкулеза среди ВИЧ-инфицированных лиц из числа заключенных и свободного гражданского населения оказались практически одинаковыми. Напротив, в двух субъектах ДФО (Хабаровский край и Сахалинская область) среднемноголетний показатель пораженности туберкулезом свободного населения с ВИЧ-инфекцией оказался статистически значимо выше в сравнении с аналогичным показателем среди заключенных. В Амурской области, Камчатском крае и ЧАО распространённость туберкулеза на фоне ВИЧ-инфекции также превысила таковую для заключенных, но статистически достоверной разницы между показателями не получено (табл.).

При распределении общего числа ВИЧ/ТБ-инфицированных пациентов ДФО по социальному статусу отмечено, что доля ВИЧ/ТБ-инфицированных заключенных среди них оказалась невысокой и составила в среднем за 2010–2015 гг.  $11,2 \pm 0,3\%$ . Причем, в указанный период наблюдения данный показатель имел прогностически благоприятную динамику — тенденцию к ежегодному снижению показателей (от 15,9% в 2010 г. до 9,8% в 2015 г.), что свидетельствует о постепенном уменьшении роли заключенных в развитии эпидемического процесса туберкулеза среди ВИЧ-позитивных лиц в совокупности по ДФО.

Средние за 6 лет наблюдения показатели удельного веса ВИЧ/ТБ ко-инфицированных заключенных на административных территориях ДФО оказались нерав-

**Территориальное распределение показателей распространенности туберкулеза среди ВИЧ-позитивных лиц из числа гражданского свободного населения, находившихся на диспансерном учете в территориальных центрах по борьбе и профилактике со СПИД в ДФО, и среди ВИЧ-инфицированных лиц пенитенциарной системы (2010–2015 гг.)**

Территория	Распространенность туберкулеза среди ВИЧ-позитивного свободного населения (%)	Распространенность туберкулеза среди ВИЧ-позитивных лиц, находящихся в местах лишения свободы (%)	Коэффициент достоверности отличий показателей (p)
Хабаровский край	207,3±4,5*	154,3±9,0*	0,0000001
Приморский край	186,0±2,2	188,3±7,1	0,8
Республика Саха (Якутия)	57,0±3,9*	121,6±20,5*	0,002
Амурская область	136,5±8,6	107,6±20,8	0,2
ЕАО	141,9±16,4*	718,8±30,0*	<10 <sup>-20</sup>
Сахалинская область	110,0±6,6*	63,3±19,4*	0,02
Магаданская область	20,1±4,5	54,9±23,9	0,2
Камчатский край	26,2±4,5	19,6±19,4	0,7
ЧАО	95,1±13,2	0±1000	0,9
ДФО	167,0±1,7*	186,2±5,2*	0,0004

Примечание. \* Показатель достоверно отличается от среднерегионального ( $p < 0,05$ ).

номерными. Так, в ЕАО выявлена наибольшая доля ко-инфицированных ВИЧ/ТБ лиц, содержащихся в учреждениях ФСИН —  $71,6 \pm 3,0\%$ , что почти в 6,5 раза ( $p < 10^{-20}$ ) превышает среднемноголетний показатель по ДФО. Данный факт вполне объясним нахождением на территории субъекта лечебно-исправительного учреждения, специализирующегося на лечении больных туберкулезом. Несмотря на это, за анализируемый период времени на данной территории наблюдалась тенденция к ежегодному снижению указанного показателя, а среднемноголетний темп убыли доли ВИЧ/ТБ ко-инфицированных заключенных в структуре общего числа пациентов с сочетанием ВИЧ-инфекции и туберкулеза составил 21,1%. В Хабаровском крае аналогичный показатель оказался незначительно, но все же достоверно выше среднего федерального окружного, составил  $13,0 \pm 0,8\%$  ( $p = 0,03$ ). Однако, в отличие от ЕАО, в данном субъекте выявлен выраженный темп прироста удельного веса заболеваемости заключенных лиц туберкулезом и ВИЧ-инфекцией, составивший в структуре ВИЧ/ТБ инфицированных пациентов края в среднем 13,0% в год.

Удельный вес ко-инфицированных ВИЧ/туберкулезом заключенных статистически значимо ниже среднего по ДФО оказался в Приморском крае, Сахалинской области и Камчатском крае —  $8,9 \pm 0,4\%$  ( $p = 10^{-5}$ ),  $3,9 \pm 1,2\%$  ( $p = 10^{-8}$ ) и  $2,94 \pm 2,89\%$  ( $p = 0,005$ ), соответственно. Более того, в Приморском и Камчатском краях зарегистрирован выраженный темп убыли выше названного показателя — в среднем на 16,9% и 17,1% соответственно. В Сахалинской области, напротив, отмечен значительный прирост — на 7,5%. В остальных субъектах ДФО — Амурской области, ЧАО, Республике Саха (Якутия), Магаданской области — достоверного отличия показателей от среднего значения по ДФО не выявлено.

Анализ результатов проведенного в Дальневосточном федеральном округе Российской Федерации исследования позволил выявить динамику и интенсивность распространённости и заболеваемости туберкулезом ВИЧ-инфицированных лиц в период наблюдения с 2006 по 2015 г., особенности территориального распределения данной патологии по административным территориям округа и характер её распространения в определенных группах населения (в частности, среди заключенных лиц из пенитенциарной системы ДФО), которые по существу отражают основные проявления эпидемического процесса (ЭП) туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией.

Так, в динамике ЭП в целом по ДФО отмечена тенденция роста (с 72,6‰ до 162,8‰) общей распространённости туберкулеза на фоне относительной стабилизации (с 34,5 до 35,6‰, соответственно с 2006 по 2015 г.) частоты ежегодного выявления данного заболевания среди ВИЧ-инфицированных пациентов, состоящих на диспансерном учете. Данное явление, скорее всего, свидетельствует преимущественно об эффекте накопления с годами ВИЧ-инфицированных лиц с туберкулезом, нелегко поддающимся излечению из-за наличия у таких больных выраженного иммунодефицита, а также в связи с частым поздним выявлением туберкулеза и, как следствие, несвоевременно начатой его терапией.

При этом, в процессе проведения эпидемиологического анализа отмечено, что интенсивность распространения ВИЧ/ТБ-инфекции значительно варьировала по административным территориям ДФО. Так, с учетом среднемноголетних показателей превалентности сочетанной патологии, наиболее высокая в ДФО интенсивность ЭП туберкулеза у ВИЧ-инфицированных лиц отмечена в ЕАО, Хабаровском и Приморском краях (336,6‰, 180,9‰ и 156,9‰, соответственно). При этом, выраженная тенденция к росту ежегодных показателей распространённости ВИЧ-ТБ-инфицирования выявлена в указанных двух последних субъектах, а также в Чукотском автономном округе (+8,6%, +9,5% и +16,5%, соответственно). Более того, прирост новых случаев заболеваний туберкулезом у ВИЧ-инфицированных оказался более высоким, чем в среднем по ДФО, практически в тех же административных образованиях, то есть в Хабаровском крае, ЕАО и ЧАО (соответственно, +9,9%, +5,3% и +3,6%). Помимо этого, темпы прироста новых случаев туберкулеза у ВИЧ-инфицированных пациентов, превышающие средний по ДФО показатель, зарегистрирова-

ны еще в двух субъектах: в Амурской области и Республике Саха (Якутия), соответственно, +9,4% и +6,6%.

Следовательно, большинство перечисленных субъектов ДФО, а это Хабаровский и Приморский края, Амурская и Еврейская автономная области, Чукотский автономный округ и Республика (Саха) Якутия, можно отнести к территориям высокого риска заражения туберкулезом, особенно при наличии выраженного иммунодефицита и высокой восприимчивости к инфекции у контактных лиц. Важно обратить внимание на то, что и в целом по Дальневосточному федеральному округу выявлена неблагополучная эпидемиологическая ситуация по указанной сочетанной патологии. Так, в период с 2009 по 2015 гг. частота возникновения новых случаев инфицирования туберкулезом лиц с положительным ВИЧ-статусом в округе значительно (более, чем в 1,7 раза) превышала аналогичные ежегодные показатели для РФ. Только в течение трех последних лет наблюдения (за 2013, 2014 и 2015 гг.) заболеваемость туберкулезом среди ВИЧ-инфицированных составляла в ДФО 43,6‰, 39,2‰, 35,6‰ против 20,1‰, 20,7‰, 20,7‰ в РФ, соответственно.

Более чем у половины (в среднем 65,0%) таких больных в ДФО отмечен активный туберкулезный процесс, представляющий наибольшую опасность для окружающих. Отмеченный факт вполне мог быть связан и с увеличением в последние годы наблюдения доли ВИЧ-инфицированных пациентов в терминальной стадии заболевания. Благодаря проведенному корреляционному анализу удалось выявить статистически значимую возможность взаимного негативного влияния активной фазы туберкулеза и развернутой стадии ВИЧ-инфекции (стадии СПИД).

Следует отметить, что вклад особого контингента ВИЧ/ТБ ко-инфицированных пациентов, находившихся в учреждениях исполнения наказаний, в общую статистику данной сочетанной патологии у всех ВИЧ-инфицированных пациентов, находившихся на диспансерном наблюдении, оказался в ДФО невысоким. Так, средний за 6 лет наблюдения (2010-2015 гг.) удельный вес заключенных в общей структуре ВИЧ/ТБ ко-инфекции в целом по округу составил  $11,2 \pm 0,3\%$  и в многолетней динамике показатели имели тенденцию к снижению. Однако настораживает тот факт, что среднесуточный показатель распространенности туберкулеза на фоне ВИЧ-инфекции среди лиц из мест лишения свободы все же на 19,2% превысил аналогичный показатель, отмеченный для свободного гражданского населения. Можно сделать вывод о том, что пенитенциарные учреждения ДФО, особенно следственные изоляторы, относящиеся к разряду закрытых коллективов, продолжают оставаться местом, где имеются условия для существования всех трех звеньев ЭП туберкулеза (источника инфекции, путей и факторов передачи возбудителей, восприимчивых к заражению лиц), особенно у ВИЧ-инфицированных людей, а выраженные проявления ЭП туберкулеза в пенитенциарной системе, в свою очередь, могут влиять на эпидемиологическую обстановку по туберкулезу в целом по региону.

Таким образом, Дальневосточный федеральный округ является территорией РФ с достаточно высоким и нестабильным уровнем распространения туберкулеза, особенно среди такой когорты населения, как ВИЧ-инфицированные лица. Ввиду существующей в мире, в том числе и в России, тенденции слияния эпидемических процессов туберкулеза и ВИЧ-инфекции, необходимо усиление противоэпидемических мероприятий, направленных на профилактику, раннюю диагностику и лечение туберкулеза у ВИЧ-позитивных лиц. Вследствие высокой скученности людей, неудовлетворительных санитарно-гигиенических условий в учреждениях ФСИН и асоциального поведения, характерного для большей части заключенных, особое внимание следует уделять выявлению в них ВИЧ-инфицированных лиц, которые подвержены наибольшему риску заражения туберкулезом. Противотуберкулезная настороженность актуальна и в связи с превалированием сложных и атипичных форм туберкулеза у ВИЧ-инфицированных лиц, высокой частотой рецидивов туберкулеза после проведенного лечения, а также неэффективностью стандартной противотуберкулезной терапии на фоне ВИЧ-инфекции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева Т.В., Ревякина О.В., Филиппова О.П., Краснов В.А. Туберкулез в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах (2007-2016 гг.). Туберкулез и болезни легких. 2017, 95(8):12-17.
2. Беляков Н.А., Рассохин В.В., Трофимова Т.Н., Степанова Е.В., Пантелеев А.М., Леонова О.Н., Бузунова С.А., Коновалова Н.В., Миличкина А.М., Тотолян А.А. Коморбидные и тяжелые формы ВИЧ-инфекции в России. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2016, 8(3):9-25.
3. Быхалов Л.С., Смирнов А.В. Клинико-морфологическая характеристика, медико-социальные параметры лиц с ВИЧ-инфекцией и туберкулезом. Волгоградский научно-медицинский журнал. 2014, 2(42):28-30.
4. Вострокнутов М.Е., Сысоев П.Г. Динамика эпидемиологических показателей сочетанной патологии «туберкулез и ВИЧ-инфекция» среди лиц, отбывающих наказание. Здоровье и образование в XXI веке. 2017, 19(11):181-186
5. Загдын З.М., Галкин В.Б., Баласанянц Г.С. Сочетанная патология: туберкулез и ВИЧ-инфекция на Северо-Западе России. Журнал инфектологии. 2013, 5(3):19-27.
6. Кульчавеня Е.В., Алексеева Т.В., Шевченко С.Ю. Внегочный туберкулез в Сибири и на Дальнем Востоке. Туберкулез и болезни легких. 2017, 95(3):24-27.
7. Нечаева О.Б. Мониторинг туберкулеза и ВИЧ-инфекции в Российской Федерации. Медицинский алфавит. 2017, 30(3):24-33
8. Нечаева О.Б., Одинцов В.Е. Эпидемическая ситуация по туберкулезу и ВИЧ-инфекции в учреждениях уголовно-исполнительной системы России. Туберкулез и болезни легких. 2015, 3:36-41.
9. ВОЗ. Туберкулез, информационный бюллетень ВОЗ, октябрь 2017. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/ru/>
10. Туленков А.А., Пономарев С.Б. К вопросу актуальности ВИЧ-инфекции в учреждениях уголовно-исполнительной системы России. Дневник Казанской медицинской школы. 2017, 3(17):26-28
11. Jacob M. Gray, Cohn. David L. Tuberculosis and HIV Coinfection. Semin. Respir. Crit. Care Med. 2013, 34(01):32-43.

Поступила 25.06.18

Контактная информация: Базыкина Елена Анатольевна,  
680000, Хабаровск, ул. Шевченко 2, р.т. (4212) 46-18-55

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Н.Ф.Василенко, О.В.Малецкая, Т.В.Таран, Д.А.Прислегина, Е.А.Манин, О.В.Семенко, А.Н.Куличенко*

## **АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ НА ЮГЕ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ В 2017 ГОДУ**

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Анализ эпидемиологической обстановки по природно-очаговым инфекциям (ПОИ) на юге европейской части Российской Федерации в 2017 году. *Материалы и методы.* Использованы донесения, предоставленные Управлениями Роспотребнадзора, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации, научно-исследовательскими противочумными институтами и противочумными станциями Роспотребнадзора из 8 субъектов Южного и 7 субъектов Северо-Кавказского федеральных округов. Обработку полученных данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 2010. *Результаты.* На территории юга европейской части России в 2017 г. зарегистрировано 962 случая заболевания ПОИ, из которых 89 % были вызваны возбудителями бактериальной природы, 11 % — вирусной. По сравнению с 2016 г. доля ПОИ бактериальной этиологии возросла на 2,3 %, вирусной — снизилась на 50,7 %. Количество больных ПОИ снизилось по сравнению с предыдущим годом на 8 %. Эпидемиологические осложнения преимущественно наблюдались по «клещевым» инфекциям, доля которых в общей структуре выявленных случаев заболевания ПОИ составила 78,6 % (756 случаев). Выявлены 6 заносных случаев лихорадки денге. *Заключение.* Анализ заболеваемости ПОИ в 2017 г. на

юге России свидетельствует о сохраняющейся активности природных очагов бактериальных и вирусных инфекций, в связи с чем, вопросы профилактики природно-очаговых инфекционных болезней и постоянного мониторинга их природных очагов в субъектах ЮФО и СКФО остаются по-прежнему актуальными.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 44—50

Ключевые слова: природно-очаговые инфекции, заболеваемость, нозологическая форма, субъекты юга России

*N.F.Vasilenko, O.V.Maletskaya, T.V.Taran, D.A.Prislegina, E.A.Manin, O.V.Semenko, A.N.Kulichenko*

## **ANALYSIS OF NATURAL FOCAL INFECTIONS INCIDENCE IN THE SOUTH OF THE EUROPEAN PART OF THE RUSSIAN FEDERATION IN 2017**

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* The analysis of epidemiological situation on natural focal infections in the south of the European part of the Russian Federation in 2017. *Materials and methods.* Data of statistical documentation of Departments of Rospotrebnadzor, Centers of Hygiene and Epidemiology in subjects of the Russian Federation, Plague Control Research Institutions and Anti-Plague stations from 8 subjects of the Southern and 7 subjects of the North-Caucasian Federal Districts were used. The findings have been treated using by Microsoft Excel 2010 program. *Results.* On the territory of the south of the European part of the Russian Federation 962 cases of natural focal infectious diseases (of which 89 per cent were bacterial etiology and 11 per cent were viral etiology) were identified in 2017. Compared with 2016 the rate of bacterial natural focal infections increased by 2,3 per cent, the rate of viral natural focal infections decreased by 50,7 per cent. The number of natural focal infections patients decreased by 8 per cent compared to the previous year. The most of epidemiological complications were observed on the «tick-borne» infections, the rate of which in the general structure of the reported natural focal infections cases amounted to 78,6 per cent (756 patients). Also 6 dengue fever cases were registered, but all of the patients might have acquired the disease after travelling to other areas. *Conclusion.* The analysis of natural focal infections morbidity in the south of the European part of the Russian Federation in 2017 demonstrates the retention of activity of the natural foci of bacterial and viral infections, therefore questions of prevention of natural focal infectious diseases and constant monitoring of their natural foci in subjects of the Southern and North-Caucasian Federal Districts had the particular relevance.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 44—50

Key words: natural focal infections, morbidity, nosological form, subjects of the south of Russia

## **ВВЕДЕНИЕ**

Природно-очаговые инфекции (ПОИ) характеризуются способностью возбудителей длительное время сохраняться в окружающей среде на отдельных территориях — природных очагах, в организмах животных, в том числе грызунов, птиц, кровососущих членистоногих, которые являются источниками и переносчиками возбудителей указанных инфекций. Эпидемическое значение ПОИ приобретают в активный весенне-осенний период, когда люди выезжают на отдых в природные биотопы, на дачные участки, а дети — в летние загородные оздоровительные учреждения. Для человека, попадающего на территорию с повышенной эпизоотичностью, опасность заражения остаётся по-прежнему высокой. В периоды активизации природных очагов можно ожидать возникновения вспышек инфекционных болезней среди населения. Поэтому чрезвычайно важной является информация об эпидемиологической обстановке по актуальным для региона природно-очаговым инфекциям, источникам и путях заражения возбудителями ПОИ.

Цель работы — анализ эпидемиологической обстановки по природно-очаговым инфекциям на юге европейской части Российской Федерации в 2017 году.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения анализа заболеваемости природно-очаговыми инфекциями на юге европейской части России использованы еженедельные и окончательные до-несения, представленные Управлениями Роспотребнадзора, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации, научно-исследовательскими противочумными институтами и противочумными станциями Роспотребнадзора из 8 субъектов Южного федерального округа (ЮФО) и 7 субъектов Северо-Кавказского федерального округа (СКФО). Обработку полученных данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2017 г. в Российской Федерации зарегистрирован 20 171 случай заболевания ПОИ, что выше предыдущего года на 13,8% (17 724 — в 2016 г.). Структура заболеваемости ПОИ на юге европейской части России — в ЮФО и СКФО (юг России) имеет свои особенности. Из 16 нозологических форм природно-очаговых инфекционных болезней, подлежащих регистрации в Российской Федерации в соответствии с формой 1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях», на юге России практически ежегодно регистрируются 10-12: туляремия, лептоспироз, клещевой боррелиоз (КБ), псевдотуберкулёз, кишечный иерсиниоз, Ку-лихорадка, риккетсиозы (в т.ч. Астраханская пятнистая лихорадка — АПЛ, марсельская лихорадка), Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ), лихорадка Западного Нила (ЛЗН), геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), клещевой вирусный энцефалит (КВЭ), бешенство [2, 4, 5].

На территории юга России в 2017 г. зарегистрировано 962 случая заболевания ПОИ, из которых 89% были вызваны возбудителями бактериальной природы, 11% — вирусной. По сравнению с 2016 г. доля ПОИ бактериальной этиологии возросла на 2,3%, вирусной — снизилась на 50,7%.

### Количество случаев заболеваний ПОИ в ЮФО, СКФО и Российской Федерации в 2017 г.

Нозологическая форма ПОИ	Количество случаев заболеваний ПОИ		
	РФ	ЮФО	СКФО
Туляремия	168	13	49
Лептоспироз	175	33	6
КБ (болезнь Лайма)	6717	278	33
Псевдотуберкулёз	587	4	1
Кишечный иерсиниоз	*	13	64
Лихорадка Ку	148	100	40
АПЛ	176	175	0
КГЛ	79	59	20
ЛЗН	13	2	0
ГЛПС	8298	13	1
КВЭ	1943	3	0
Бешенство	2	1	0
Лихорадка денге	*	6	0
Марсельская лихорадка	*	48	0
Гранулоцитарный анаплазмоз человека	31	0	0
Моноцитарный эрлихиоз человека	19	0	0

Примечание. \* Нет данных.

Заболеваемость, как и в предыдущие годы, регистрировалась по актуальным для юга России инфекционным болезням. Кроме того, в 2017 г. выявлены 6 заносных случаев лихорадки денге (4 — в Волгоградской области и 2 — в Краснодарском крае, заражение больные связывали с выездом в Таиланд и Индию).

АПЛ и КГЛ — инфекционные болезни, эндемичные исключительно для юга России. Также здесь выявляется основная доля зарегистрированных в Российской Федерации больных Ку-лихорадкой и ЛЗН.

Количество случаев заболеваний ПОИ в 2017 г. в сравнительном аспекте по ЮФО, СКФО и по Российской Федерации в целом представлено в табл. 1.

В течение последних 20 лет КГЛ является одной из самых актуальных природно-очаговых инфекций ЮФО и СКФО, где в период с 1999—2017 гг. эпидемические проявления зарегистрированы в 9 из 15 субъектов [1, 3].

В 2017 г. на юге России было отмечено двукратное снижение количества случаев заболевания КГЛ по сравнению с предыдущим годом (79 случаев в 2017 г., 162 случая в 2016 г.), число летальных случаев снизилось

в 1,5 раза и составило в 2017 г. 4 случая (против 6 — в 2016 г.), 2 из которых — в Ростовской области.

Больные КГЛ регистрировались в 7 субъектах юга России: Ростовской области — 38, Ставропольском крае — 19, Республике Калмыкия — 14, Волгоградской области — 4, Астраханской области — 2, по 1 случаю — в Республике Дагестан и Республике Крым. Самой неблагополучной по заболеваемости КГЛ в 2017 г. была Ростовская область, где выявлено 38 больных, тем не менее, число заболевших по сравнению с предыдущим годом уменьшилось на 33,3 % (38 случаев в 2017 г., 57 — в 2016 г.).

Количество случаев заболевания ЛЗН на юге России в 2017 г. по сравнению с 2016 г. уменьшилось в 16,5 раза (на 94%), всего зарегистрировано 2 больных — по 1 случаю в Ростовской области (г. Ростов-на-Дону) и Астраханской области (г. Астрахань). В указанных регионах ЛЗН эпидемически проявляется ежегодно.

Случаи заболевания ГЛПС на юге Российской Федерации ежегодно регистрируются в Волгоградской области и Краснодарском крае, но при этом основная доля больных выявляется в Краснодарском крае. В отдельные годы по одному случаю ГЛПС было диагностировано в Ставропольском крае (2012 г.), Республике Калмыкия (2012 и 2014 гг.) и Республике Адыгея (2014 и 2015 гг.). Число выявленных случаев заболевания ГЛПС на юге России в 2017 г. составило 93,3 % от показателя 2016 г. (14 и 15 случаев соответственно), т. е. осталось практически на том же уровне.

В 2017 г. на юге России зарегистрированы 3 случая заболевания людей клещевым вирусным энцефалитом (Краснодарский край — 2 завозных случая, Республика Крым — 1 случай). В Краснодарском крае оба больных выявлены в июне, в Республике Крым — в августе. Во всех случаях больные отмечали укус клеща — в Челябинской области (1 случай, Краснодарский край), в Алтайском крае (1 случай, Краснодарский край), 1 случай — в Республике Крым (г. Старый Крым).

В 2017 г. случаи заболевания Ку-лихорадкой на юге России были выявлены в Астраханской области, эндемичной по данной ПОИ — 95; в Ставропольском крае — 40, а также 5 случаев — в Волгоградской области, где в 3 предыдущих года (2014-2016 гг.) больных Ку-лихорадкой не было, хотя ранее заболеваемость регистрировалась практически ежегодно. Также в предыдущие годы спорадические случаи Ку-лихорадки отмечались в Краснодарском и Ставропольском краях (2010 г.), в Республике Калмыкия (2007—2012 г.). В целом, в последние годы отмечается ежегодное увеличение случаев Ку-лихорадки на юге России.

Количество больных клещевым боррелиозом на юге России в 2017 г., по сравнению с 2016 г., увеличилось на 46 %, всего зарегистрировано 311 случаев: в Краснодарском крае (149), Ростовской области (34), Ставропольском крае (32), Республике Адыгея (5), Волгоградской области (4), Республике Дагестан (1), Республике Крым (71) и городе федерального значения Севастополь (15). Наиболее неблагополучным как по территориальному распространению, так и по количеству случаев заболевания клещевым боррелиозом, как и в предыдущие годы, был Краснодарский край, где болезнь регистрируется ежегодно, а в 2017 г. выявлено 47,9% от числа всех больных на юге России.

Число выявленных случаев заболевания кишечным иерсиниозом на юге России в 2017 г., по сравнению с 2016 г., уменьшилось на 42,2%, всего зарегистрировано 77 больных. Большинство случаев заболевания (83,1%) выявлено в Ставропольском крае, также больные зарегистрированы в Краснодарском крае (1), Ростовской области (4), Республике Крым (3), Севастополе (4) и Волгоградской области (1).

Псевдотуберкулёз на юге европейской части Российской Федерации с 2008 г. до 2016 г. регистрировался только в Краснодарском и Ставропольском краях, где больные выявлялись ежегодно, в последние годы на уровне единичных спорадических случаев. В 2017 г. зарегистрировано всего 5 больных псевдотуберкулёзом, 2 из них проживали в Республике Адыгея (г. Майкоп, по 1 случаю в апреле и в ноябре), по 1 — в Ставропольском крае (г. Кисловодск, июнь), в Ростовской области (г. Ростов-на-

Дону, ноябрь) и в Республике Крым (Симферопольский район, ноябрь). Среди заболевших псевдотуберкулёзом было 3 детей до 14 лет (по 1 в Ставропольском крае, Республиках Крым и Адыгея).

В 2017 г. на территории субъектов юга России было выявлено 223 случая заболевания людей риккетсиозами.

Случаи заболевания АПЛ в Российской Федерации ежегодно регистрируются в Астраханской области, а с 2011 г. — и в Республике Калмыкия, но при этом основная доля больных по-прежнему выявляется в Астраханской области, где в 2017 г. зарегистрировано 170 случаев, что составило 97,1% всех случаев АПЛ по Российской Федерации (в 2016 г. 293 человека, 98% всех случаев). В Республике Калмыкия выявлено 5 случаев (2,9%). По сравнению с предыдущим годом, количество зарегистрированных случаев заболевания АПЛ в Астраханской области уменьшилось на 41,4%, при этом 46 (27,1%) больных выявлено в Астрахани. В 2017 г. случаи заболевания АПЛ у детей до 14 лет составили 20% от числа всех больных этой инфекцией в ЮФО (все выявлены на территории Астраханской области).

Больные марсельской лихорадкой в Российской Федерации ежегодно регистрируются в Республике Крым, количество выявленных случаев в 2017 г., по сравнению с 2016 г., увеличилось на 54,3% (в 2017 г. — 48 больных, в 2016 г. — 35). В предыдущие годы случаи марсельской лихорадки регистрировались только в Республике Крым, в 2017 г. 2 случая отмечено в Краснодарском крае.

В 2017 г. на юге европейской части Российской Федерации зарегистрировано 62 случая заболевания туляремией, что в 15,5 раза больше, чем в 2016 г. (4 случая). Количество больных туляремией возросло преимущественно за счёт вспышки этой инфекции в Ставропольском крае. В течение предыдущих 5 лет (с 2012 г. по 2016 г.) ежегодная заболеваемость туляремией колебалась между 0—9 случаями, а в 2017 г. выявлено 49 случаев заболевания, квалифицированных как «вспышка туляремии» и преимущественно связанных с охотой на зайцев и пребыванием заболевших лиц в сельской местности на эндемичной территории (43 случая из 49).

Вспышке туляремии предшествовала очень высокая (в сравнении со средними многолетними данными) численность мелких мышевидных грызунов в Петровском районе, выявленная при эпизоотологическом мониторинге осенью 2016 г. и давшая основание к неблагоприятному прогнозу по туляремии на осенне-зимний период 2016-2017 гг. Случаи заболевания туляремией в Ставропольском крае регистрировались с января по август с максимальным выявлением больных (20) в январе. Динамика случаев заболевания туляремией соответствовала сезонному распределению для края. Больные регистрировались в 8 административных образованиях края, максимальное количество выявлено в Петровском и Ипатовском районах — 16 и 17 случаев соответственно.

Случаи заболевания туляремией выявлены в Краснодарском крае (4), что несколько превысило ежегодный показатель за предыдущие 5 лет (1-2 случая в год). Также 4 больных туляремией зарегистрированы в Республике Крым. В Ростовской области с 2000 г. случаи заболевания туляремией не отмечались, а в 2017 г. заболели 5 человек.

Количество зарегистрированных случаев заболевания лептоспирозом на юге России в 2017 г., по сравнению с 2016 г., сократилось почти в 1,5 раза и практически вернулось к уровню 2015 г. (2015 г. — 41; в 2016 г. — 57; 2017 — 39). Больные регистрировались также, как и в предыдущем году, в Краснодарском и Ставропольском краях, Ростовской области, Республике Крым, кроме этого, в Кабардино-Балкарской Республике и Республике Адыгея.

В апреле 2017 г. зарегистрирован случай заболевания бешенством у 49-летней жительницы Бахчисарайского района Республики Крым, обратившейся за медицинской помощью через 2 суток после начала заболевания (дата заболевания — 11.04.2017 г.) и госпитализированной через сутки с предварительным диагнозом «бешенство». Инфицирование больная связывала с нанесением царапин домашним котом в конце декабря 2016 г.

В 2017 г. в Волгоградской области (г. Волгоград) и Краснодарском крае (г. Анапа, г. Сочи) было зарегистрировано 6 заносных случаев лихорадки денге (по 1 случаю в январе, марте, августе, сентябре и 2 случая в декабре). Из них: 4 мужчин, 2 женщины от 20 до 39 лет. Двое больных лихорадкой денге (Краснодарский край и Волгоградская область) являлись жителями Индии. Все 6 заболевших связывают инфицирование вирусом — возбудителем лихорадки денге с пребыванием в Индии (Волгоградская область — 1, Краснодарский край — 1) или в Таиланде (Волгоградская область — 3, Краснодарский край — 1).

В 2017 г. количество зарегистрированных случаев заболевания ПОИ на юге России (962 случая) снизилось по сравнению с предыдущим годом на 8 %. Эпидемиологические осложнения в 2017 г., как и в предыдущие годы, преимущественно наблюдались по «клещевым» инфекциям, доля которых в общей структуре выявленных случаев заболевания ПОИ составила 78,6 % (756 случаев).

Наиболее неблагоприятными по количеству выявленных больных «клещевыми» ПОИ были Астраханская область (так же, как и в 2016 г.) — зарегистрировано 267 случаев заболевания по 3 нозологическим формам (АПЛ, Ку-лихорадка, КГЛ), Краснодарский край — 153 (3 нозологии — КБ, марсельская лихорадка и КВЭ) и Республика Крым — 134 (4 нозологии — КГЛ, КБ, марсельская лихорадка, КВЭ). Заболеваемость тремя формами «клещевых» ПОИ (Ку-лихорадка, КГЛ и КБ) отмечалась в Ставропольском крае (91) и Волгоградской области (13), двумя (КГЛ и КБ) — в Ростовской области (72) и Республике Дагестан (2), а также в Республике Калмыкия (19, КГЛ и АПЛ), одной — в Республике Адыгея (5, КБ). В Республиках Ингушетия, Северная Осетия-Алания, Чеченской и Карачаево-Черкесской и Кабардино-Балкарской Республиках случаев заболевания «клещевыми» ПОИ в 2017 г. не зарегистрировано.

Количество лиц, обратившихся в лечебно-профилактические организации (ЛПО) по поводу укусов клещами в 2017 г., по сравнению с 2016 г., уменьшилось на территории большинства субъектов юга России в среднем в 1,2 раза, что связано как с неблагоприятным влиянием погодных-климатических условий на активность и жизнедеятельность клещей, так и эффективностью проводимых противоклещевых мероприятий.

Наибольшее количество обращений зарегистрировано в Ростовской области (8266) и в Ставропольском крае (6965), что обусловлено как актуальностью «клещевых» инфекций в этих субъектах, так и организацией информационно-разъяснительной работы среди населения. Активность клещей на всей территории юга России преимущественно наблюдалась в мае-июне, когда в ЛПО обратилось большинство пострадавших.

Таким образом, проведенный анализ заболеваемости природно-очаговыми инфекциями в 2017 г. на юге европейской части Российской Федерации свидетельствует о сохраняющейся активности природных очагов бактериальных и вирусных инфекций, в связи с чем, вопросы профилактики природно-очаговых инфекционных болезней и постоянного мониторинга их природных очагов в субъектах ЮФО и СКФО остаются по-прежнему актуальными. Разработка эффективных противоэпидемических и профилактических мероприятий, направленных на снижение лоймопотенциала очагов и уровня заболеваемости людей природно-очаговыми инфекциями, возможна лишь на основе осуществления действенного эпидемиологического надзора, включающего системы информационного обеспечения на основе ГИС (ArcGIS), эпидемиологической диагностики, разработки и контроля управленческих решений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Шапошникова Л.И., Таран Т.В., Куличенко А.Н. Причины обострения эпидемиологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2016 году. Журн. микробиол. 2017, 5:17-23.

2. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Шапошникова Л.И., Волюнкина А.С., Лисицкая Я.В., Варфоломеева Н.Г., Куличенко А.Н. Мониторинг природно-очаговых инфекций на юге европейской части России в 2016 году. *Здоровье населения и среда обитания*. 2018, 1 (298):30-32.
3. Волюнкина А.С., Котенев Е.С., Лисицкая Я.В., Малецкая О.В., Пакскина Н.Д., Шапошникова Л.И., Яцменко Е.В., Куличенко А.Н. Анализ заболеваемости Крымской геморрагической лихорадкой в Российской Федерации в 2017 г. и прогноз на 2018 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018, 1:12-15.
4. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Прислегина Д.А., Василенко Н.Ф., Таран Т.В., Манин Е.А., Семенов А.В., Дубянский В.М. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2017 г. (Аналитический обзор). Ставрополь, 2018.
5. Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Шапошникова Л.И., Котенев Е.С. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекциям в Крымском федеральном округе в 2014-2015 гг. *Журн. микробиол.* 2016, 2:62-69.

Поступила 08.07.18

Контактная информация: Василенко Надежда Филипповна, д.б.н., проф., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (652) 26-03-83

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*С.Г.Марданлы<sup>1,2</sup>, В.А.Арсеньева<sup>1</sup>, С.С.Марданлы<sup>1,3</sup>, С.В.Ротанов<sup>1,4</sup>*

## **РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВИРУСОВ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА СРЕДИ КОНТИНГЕНТОВ РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА**

<sup>1</sup>ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск; <sup>2</sup>Государственный гуманитарно-технологический университет, Орехово-Зуево; <sup>3</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва; <sup>4</sup>Московский НПЦ дерматовенерологии и косметологии

*Цель.* Оценить инфицированность как отдельными типами ВГЧ, так и их сочетаниями двух категорий населения — детей и пожилых лиц. *Материалы и методы.* Методом ИФА исследованы на наличие IgG к вирусам герпеса человека 1-6 и 8 типов сыворотки детей в возрасте 0-18 лет (от 1006 человек) и пожилых пациентов в возрасте 60-99 лет (1004 человека). *Результаты.* Показано, что в обследованных контингентах от 45 до 61,3% детей в возрасте 0-2 года инфицированы ВГЧ-1, ВГЧ-3, ВГЧ-4, ВГЧ-5 и ВГЧ-6. Отмечена последующая динамика инфицированности первым, третьим и четвертым типами ВГЧ, выражающаяся в итоговом постоянном росте вплоть до 16-18-летнего возраста. Не выявлено связи с возрастом детей инфицированности ВГЧ-2, ВГЧ-6 и ВГЧ-8 — для ВГЧ-6 она колеблется в пределах 45-68%, а для ВГЧ-2 и ВГЧ-8 не поднимается выше 3,5 и 10%, соответственно. Пожилые пациенты всех возрастных групп в подавляющем большинстве инфицированы ВГЧ-1, ВГЧ-3, ВГЧ-4 и ВГЧ-5, антитела к ВГЧ-2 выявлены у 21,3-26,6% всех обследованных лиц этого возраста. *Заключение.* Чтобы обеспечить эффективное планирование и реализацию адекватных лечебно-профилактических мер, которые позволят свести до минимума неблагоприятные медико-социальные последствия распространения ГВИ среди населения РФ, необходимо дальнейшее обстоятельное исследование инфицированности ВГЧ всех групп населения.

*Журн. микробиол.*, 2019, № 2, С. 50—55

**Ключевые слова:** герпесвирусные инфекции (ГВИ), вирусы герпеса человека 1-6, 8 типа (ВГЧ-1 — ВГЧ-6, ВГЧ-8), IgG, дети, пожилые пациенты

## THE PREVALENCE RATE OF HUMAN HERPES VIRUSES AMONG DIFFERENT AGE POPULATIONS

<sup>1</sup> «EKOLab», Elektrogorsk; <sup>2</sup> State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuevo; <sup>3</sup> Gamaleya Nationale Research Center of Epidemiology and Microbiology, <sup>4</sup> Moscow Scientific-Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Russia

*Aim.* To evaluate infection with both individual types of HHV and their combinations for two categories of population — children and elderly persons. *Materials and methods.* The presence of IgG to human herpes viruses 1-6 and 8 types in sera of children aged 0-18 (1006 individuals) and elderly patients aged 60-99 (1004 individuals) was investigated by ELISA-method. *Results.* It was shown that 45 — 61,3% of examined children (aged 0-2 years) are infected with HHV-1, HHV-3, HHV-4, HHV-5 and HHV-6. The subsequent dynamics of infection with the first, third and fourth types of HHV expressed in the final constant growth up to 16-18 years was noted. There was no connection between children age and HHV-2, HHV-6 and HHV-8, it was ranged from 45 to 68% for HHV-6 and did not rise above 3.5 and 10% for HHV-2 and HHV-8 respectively. In most cases elderly persons of all age groups were infected with HHV-1, HHV-3, HHV-4 and HHV-5, antibodies to HHV-2 were detected in 21,3-26,6% of all individuals of this age. *Conclusion.* In order to ensure effective planning and implementation of adequate treatment and preventive measures that will minimize the adverse medical and social consequences of HHV spread among the population of the Russian Federation, it is necessary to continue detailed study of HHV infection in all population groups.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 50—55

Key words: herpes virus infections (HVI), human herpes viruses type 1-6, 8 (HHV-1—HHV-6, HHV-8), IgG, children, elderly patients

## ВВЕДЕНИЕ

Герпесвирусные инфекции человека (ГВИ) — группа антропонозных инфекций, которые характеризуются хроническим рецидивирующим течением и пожизненным персистированием возбудителей в организме [1-3, 7].

Возбудителями ГВИ являются 8 типов герпесвирусов [1-3, 6-9]: вирусы простого герпеса 1 и 2 типа — вирус герпеса человека тип 1 и вирус герпеса человека тип 2 (ВПГ-1 и ВПГ-2, или ВГЧ-1 и ВГЧ-2); вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса — вирус герпеса человека тип 3 (ВВО-ОГ, или ВГЧ-3); вирус Эпштейна-Барр — вирус герпеса человека тип 4 (ВЭБ, или ВГЧ-4); цитомегаловирус — вирус герпеса человека тип 5 (ЦМВ, или ВГЧ-5); вирусы герпеса человека 6, 7 и 8 типов (ВГЧ-6, ВГЧ-7, ВГЧ-8).

Несмотря на то, что в последние годы показана прямая связь ГВИ и с проблемами материнства-детства, и с приобретенными иммунодефицитными состояниями, и с развитием различных злокачественных новообразований, их фактическое распространение среди населения РФ охарактеризовано еще недостаточно. Большинство исследований такого рода ограничивается оценками инфицированности различных групп населения отдельными типами вирусов герпеса человека, хотя для этой группы инфекций характерна высокая частота зараженности несколькими типами ВГЧ одновременно [1-7].

В связи с этим, нами предпринята попытка оценить инфицированность отдельными типами ВГЧ и их сочетаниями двух категорий населения: детей (0 — 18 лет) и пожилых лиц (60 — 90 лет).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были исследованы 2010 сывороток крови, представленные из ЛПУ Люберецкого района Московской области.

Коллекция сывороток крови детей в возрасте от 0 до 18 лет (1006 образцов) для осуществления эпидемиологического анализа была разделена на 9 возрастных

групп: 1 группа (0-2 года) — 110 образцов; 2 группа (2,1-4 года) — 103; 3 группа (4,1-6 лет) — 117; 4 группа (6,1-8 лет) — 107; 5 группа (8,1-10 лет) — 100; 6 группа (10,1-12 лет) — 119; 7 группа (12,1-14 лет) — 116; 8 группа (14,1-16 лет) — 124; 9 группа (16,1-18 лет) — 110 образцов.

Комплект из 1004 образцов, характеризующий контингент пациентов пожилого возраста, также был разделен на возрастные группы: 1 группа (60-65 лет) — 139 образцов; 2 группа (65,1-70 лет) — 132; 3 группа (70,1-75 лет) — 123; 4 группа (75,1-80 лет) — 275; 5 группа (80,1-85 лет) — 132; 6 группа (85,1-90 лет) — 139; 7 группа (90,1-97 лет) — 64 образца.

Во всех образцах методом ИФА было определено наличие специфических IgG к ВГЧ, что по современным представлениям является свидетельством инфицирования обследуемых лиц соответствующими патогенами. В исследовании были применены иммуноферментные тест-системы (ИФТС): «ИФА-ВПГ-1-IgG», «ИФА-ВПГ-2-IgG», «ИФА-Ветряная оспа-IgG», «ИФА-Эпштейн-Барр-IgG», «ИФА-ЦМВ-IgG», «ИФА-ВГЧ-6-IgG», «ИФА-ВГЧ-8-IgG», разработанные и произведенные для ЗАО «ЭКОлаб».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования обоих контингентов на наличие IgG к отдельным типам ВГЧ представлены в табл. 1.

Первое, что можно отметить — это довольно высокий процент (от 45 до 61,3%) инфицированности детей в возрасте от 0 до 2 лет первым, третьим, четвертым, пятым и шестым типами вирусов. При этом сходная последующая динамика инфицированности детей по возрастным группам наблюдается для ВГЧ-1 и ВГ-5 и для ВГЧ-3 и ВГЧ-4. Начиная с третьей возрастной группы (4-6 лет) можно отметить также подобие динамики инфицированности для ВГЧ-1, ВГ-3 и для ВГЧ-5 — сначала некоторое снижение, а затем постоянный рост до 16-18-летнего возраста.

Какую бы то ни было связь с возрастом не удается отметить относительно зараженности обследованного контингента вторым, шестым и восьмым типами

Таблица 1. Частота выявления методом ИФА специфических IgG к отдельным типам ВГЧ в крови у детей и пожилых пациентов

Обследуемый контингент, группа	Количество положительных результатов определения специфических IgG (в %) к ВГЧ							
	ВГЧ-1	ВГЧ-2	ВГЧ-3	ВГЧ-4	ВГЧ-5	ВГЧ-6	ВГЧ-8	
Дети	1 (0,5-2 года)	45,0	3,6	50,5	61,3	56,8	50	0
	2 (2,1-4 года)	27,9	1,9	45,2	61,5	55,8	45,2	10,6
	3 (4,1-6 лет)	37,6	0,9	57,7	65,8	48,7	68,2	4,5
	4 (6,1-8 лет)	20,0	0	52,0	60,0	28,0	60,9	0
	5 (8,1-10 лет)	41,6	0	84,2	86,1	55,4	47,6	4,8
	6 (10,1-12 лет)	39,1	1,7	94,8	87,0	53,9	65,0	0
	7 (12,1-14 лет)	45,0	1,7	85,8	85,0	59,2	57,1	0
	8 (14,1-16 лет)	50,8	0	86,3	85,5	60,5	50,0	0
	9 (16,1-18 лет)	60,2	1,8	82,3	89,4	64,6	57,1	0
Пожилые лица	1 (60-65 лет)	98,6	21,3	94,3	99,3	96,5	69,6	0
	2 (65,1-70 лет)	99,2	26,2	96,9	99,2	98,5	68,4	0
	3 (70,1-75 лет)	98,4	26,6	98,4	99,2	97,7	36,0	0
	4 (75,1-80 лет)	97,8	23,4	94,1	98,9	97,8	60,0	0
	5 (80,1-85 лет)	98,5	22,4	95,5	97,0	98,5	58,4	0
	6 (85,1-90 лет)	98,6	24,5	95,0	98,6	98,6	52,4	0
	7 (90,1 и более лет)	100	20,6	96,8	98,4	100	33,3	0

ВГЧ — для ВГЧ-6 она колеблется в пределах 45-68%, а для ВГЧ-2 и ВГЧ-8 не поднимается выше 3,5 и 10 %, соответственно.

В отличие от детского контингента результаты обследования всех 7 групп пожилых пациентов практически не зависят от возраста обследованных. IgG к ВГЧ-1, ВГЧ-3, ВГЧ-4 и ВГЧ-5 обнаруживаются у подавляющего большинства обследованных во всех группах, а положительная реакция на антитела к ВГЧ-2 обнаруживается у 21,3-26,6% обследованных, т.е. также практически в одинаковой доле для всех возрастов в обследованном диапазоне. Нет постоянства в проценте положительных реакций на IgG к ВГЧ-6 — он колеблется, причем безо всякой закономерности, от 69,7 до 33,3%, а антитела к ВГЧ-8 не обнаружены во всех возрастных группах, что, по нашему мнению, связано, скорее, с особенностями ИФТС, использованных нами для их выявления

Проведенное исследование позволило оценить также инфицированность обследованных контингентов одновременно несколькими типами ВГЧ (табл. 2).

Представленные данные показывают, что в любой из обследованных возрастных групп немало детей, одновременно инфицированных двумя (от 18,6 до 35,9%, в среднем 25%), тремя (от 17,1 до 40,7%, в среднем 27,3%) и четырьмя (от 13,2 до 30,8%, в среднем 29,2%) типами ВГЧ. Значительно более редки случаи инфицирования пятью типами ВГЧ (от 0 до 6,7%, в среднем 2,7%); более сложные миксты представлены вообще единичными случаями.

Результаты аналогичного анализа для контингента пожилых пациентов показывают, прежде всего, практическое отсутствие различий между обследованными группами. Кроме того, среди обследованных не выявлено лиц, интактных ко всем типам ВГЧ, инфицированных только одним типом и инфицированных семью типами. Редки случаи одновременного выявления антител к двум и трем типам ВГЧ (от 0 до 1,5%, в среднем 0,7%), а также к шести типам (от 0 до 4,5%, в среднем 1,8). Основная масса обследованных пожилых пациентов инфицирована четырьмя

Таблица 2. Распределения числа типов ВГЧ, антитела к которым одновременно обнаруживаются в крови обследованных детей и пожилых пациентов разных возрастных групп

Контингент обследуемых	Группа	% лиц с антителами к ... типам ВГЧ							
		0	1	2	3	4	5	6	7
Дети	1	12,6	23,4	18,9	17,1	26,2	1,8	0	0
	2	14,4	17,3	22,1	20,3	16,3	6,7	1,9	1,0
	3	6,0	23,1	35,9	20,9	13,2	0,9	0	0
	4	16,0	12,0	28,0	28,0	16,0	0	0	0
	5	2,0	14,9	25,7	30,7	23,8	2,0	0	0
	6	1,7	13,0	31,3	24,3	26,1	3,5	0	0
	7	0	9,2	29,2	29,2	30,8	1,7	0	0
	8	0,8	9,7	22,6	34,7	29,8	2,4	0	0
	9	0	6,2	18,6	40,7	29,2	5,3	0	0
Средние значения		5,9	14,3	25,8	27,3	23,5	2,7	0,2	0,1
Пожилые пациенты	1	0	0	0	0	66,7	23,4	2,1	0
	2	0	0	0,8	0,8	62,3	32,3	1,5	0
	3	0	0	0,8	0,8	63,3	28,9	2,3	0
	4	0	0	1,5	1,5	67,7	23,4	0,7	0
	5	0	0	0	0	67,9	20,9	4,5	0
	6	0	0	0,7	0,7	68,3	22,3	3,6	0
	7	0	0	0	0	74,6	20,6	0	0
Средние значения		0	0	0,7	0,7	65,9	25,1	1,8	0

(от 62,3 до 74,6%, в среднем 65,9%) и пятью (от 20,6 до 32,3%, в среднем 25,1%) типами ВГЧ.

Результаты исследования двух групп населения одного из муниципальных образований Московской области на наличие в крови IgG к семи типам вирусов герпеса человека при всей их ориентировочности все же дают достаточно ясное представление о характере инфицированности населения РФ герпесвирусами, т.е. о фактической распространенности ГВИ — группы инфекций, медико-социальная значимость которых за последние годы существенно выросла и продолжает расти.

Обращает на себя внимание факт наличия большого числа лиц, инфицированных сразу несколькими типами ВГЧ, при чем такая множественная ГВИ выявляется, начиная уже с детского возраста. И если для группы детей возрастом 0-2 года наличие в крови антител к 2-4 типам ВГЧ можно отнести за счет материнских антител, то явную тенденция к увеличению во все более старших группах доли детей, в крови которых выявляются антитела к нескольким типам ВГЧ, можно объяснить только наличием у таких детей соответствующих смешанных инфекций. Именно смешанные инфекции ответственны и за высокую частоту одновременного выявления антител к четырем и пяти типам ВГЧ у всех возрастных групп пожилых пациентов.

Вторым моментом, характеризующим инфицированность населения ВГЧ, можно считать долю лиц, интактных ко всем типам герпесвирусов. Эта доля невелика даже у детей самого младшего возраста, и если у детей первых месяцев жизни это отчасти можно объяснить, как уже говорилось, наличием в их крови материнских IgG, то это никак не может объяснить столь же малую долю полностью интактных к ВГЧ детей 4-10-летнего возраста и практическое их отсутствие у детей старше 10 лет.

Кроме того, если у детей доля инфицированных только одним или двумя типами ВГЧ еще достаточно велика (14,3 и 25,8%, соответственно, по всей выборке), то у пожилых пациентов их доля, как и доля полностью интактных к ВГЧ, лиц равна нулю или близка к этому значению, т.е. к 60 годам жизни жители обследованного района практически поголовно инфицированы не менее чем тремя типами, а большинство — уже четырьмя типами ВГЧ, это, как правило, ВГЧ-1 (ВПГ-1), ВГЧ-3 (ВВО-ОГ), ВГЧ-4 (ВЭБ) и ВГЧ-5 (ЦМВ). Инфицированность населения ВГЧ-2 (ВПГ-2) сравнительно невелика даже для лиц пожилого возраста и очень мала у детей всех возрастных групп.

Материалы, полученные в настоящем исследовании, однозначно свидетельствуют о необходимости проведения дальнейшего еще более обстоятельного серологического скрининга населения относительно возбудителей ГВИ, для того чтобы получить полную характеристику их распространенности среди всех групп населения, т.е. информацию, необходимую для планирования и реализации адекватных профилактических, а при необходимости, и лечебных мероприятий, которые позволят свести до минимума неблагоприятные медико-социальные последствия распространения этой группы инфекций.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Викулов Г.Х. Герпесвирусные инфекции человека в новом тысячелетии: классификация, эпидемиология и медико-социальное значение. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014, 3:35-40.
2. Исаков В.А., Е.И. Архипова, Исаков Д.В. Герпесвирусные инфекции человека. Руководство для врачей. Исаков В.А. (ред.) СПб., СпецЛит, 2013.
3. Кускова Т.К., Белова Е.Г. Семейство герпесвирусов на современном этапе. Лечащий врач. 2004, 5:611-619.
4. Марданлы С.Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH-группы на основе современных технологий лабораторной диагностики: Дисс. д-ра мед. наук. М., 2016.
5. Мурзич А.В., Голубев М.А. Герпетическая инфекция. Южно-Российский медицинский журнал. 1998, 3:33-40.
6. Марданлы С.Г. Герпесвирусные инфекции: учебное пособие. Орехово-Зуево, ГГТУ, 2017.

7. Рахманова А.Г., Кирпичникова Г.И., Неверов В.А. Этиопатогенез, лабораторная диагностика и терапия герпесвирусных инфекций. СПб, 2003.
8. Adams M.J., Carstens E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of virology. 2012, 157(7):1411-1422.
9. Davison A.J., Eberle R., Ehlers B. et al. The order herpesvirales. Archives of virology. 2009, 154(1): 171-177.

Поступила 26.10.18

Контактная информация: Марданлы С.С., 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

А.А.Марков<sup>1,3</sup>, Т.Х.Тимохина<sup>1</sup>, Н.Б.Перунова<sup>2</sup>, Я.И.Паромова<sup>1</sup>, Е.В.Иванова<sup>2,4</sup>

## ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM № 791 В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ

<sup>1</sup>Тюменский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>Оренбургский научный центр, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, <sup>3</sup>ООО Научно-производственное инновационное объединение «Мультифункциональная медицинская лаборатория», Тюмень, <sup>4</sup>Оренбургский государственный медицинский университет

*Цель.* Изучить влияние экзометаболитов Bifidobacterium bifidum на биологические свойства возбудителей гнойно-септических осложнений в травматолого-ортопедической практике и оценить их воздействие на репаративную регенерацию костной ткани перимплантационной зоны в послеоперационном периоде. *Материалы и методы.* В работе использованы музейные культуры V. bifidum 791, S. aureus 25923 ATCC, P. aeruginosa 27853 ATCC и антибиотикорезистентные госпитальные изоляты, выделенные от пациентов с перипротезной инфекцией и остеомиелитом (S.aureus 889, S. epidermidis 2041, P. aeruginosa 9672). Супернатант (экзометаболиты) V. bifidum 791 получали из бульонной культуры, которую центрифугировали и пропускали через мембранный фильтр. При исследовании влияния экзометаболитов бифидобактерий на пролиферативную активность бактерий двухсуточный супернатант V. bifidum соинкубировали в течении 24 с культурами музейных и госпитальных штаммов. Формирование биопленки в эксперименте in vitro изучали через 24 и 96 часов. Обработку имплантатов экзометаболитами бифидобактерий осуществляли в течение 30 минут. Экспериментальное исследование проводили на кроликах породы «Фландр». В большеберцовые кости животных вкручивались титановые имплантаты без покрытия (контроль) и с пористым СБКФМ покрытием, обработанным экзометаболитами V. bifidum (опыт). Гистологическое исследование и компьютерная микротомография проводились с использованием прибора SkyScan 1172 (BRUKER). *Результаты.* Супернатант V. bifidum 791 в зависимости от сроков культивирования бифидобактерий в разной степени оказывал бактериостатическое и бактерицидное действие, а также ингибировал биопленкообразование исследуемых культур микроорганизмов, включая антибиотикорезистентные штаммы. В экспериментах in vivo применение пористого СБКФМ покрытия на титановых имплантатах, обработанного супернатантом бифидобактерий, позволяло сохранять показатели минеральной плотности перимплантационной зоны на высоком уровне в сравнении с использованием контрольных титановых имплантатов без покрытия. *Заключение.* Положительные результаты доклинических экспериментов перспективны для проведения дальнейших клинических исследований в травматолого-ортопедической практике, что в конечном итоге позволит снизить риск развития гнойно-септических осложнений и предотвратить миграцию металлоконструкций и нестабильность эндопротезов в послеоперационном периоде.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 55—61

Ключевые слова: V. bifidum 791, биопленки микроорганизмов, антибиотикорезистентные штаммы, травматолого-ортопедическая практика, титановые имплантаты

## POSSIBILITY OF USING EXOMETABOLITES *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* № 791 IN TRAUMATOLOGY AND ORTHOPEDICS

<sup>1</sup>Tyumen State Medical University, <sup>2</sup>Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, <sup>3</sup>Limited Liability Company Scientific-Production Innovative Association «Multifunctional Medical Laboratory», Tyumen, <sup>4</sup>Orenburg State Medical University, Russia

*Aim.* To study the effect of exometabolites of *Bifidobacterium bifidum* on the biological properties of causative agents of purulent-septic complications in trauma and orthopedic practice and to evaluate their effect on reparative bone tissue regeneration in the peri-implant zone in the postoperative period. *Materials and methods.* Using the museum cultures of *B. bifidum* 791, *S. aureus* 25923 ATCC, *P. aeruginosa* 27853 ATCC and antibiotic-resistant hospital strains, isolated from patients with periprosthetic infection and osteomyelitis (*S.aureus* 889, *S. epidermidis* 2041, *P. aeruginosa* 9672). The supernatant (exometabolites) of *B. bifidum* 791 was obtained from a broth culture, which was centrifuged and passed through a membrane filter. In studying the effect of exometabolites of bifidobacteria on the proliferative activity of bacteria, the two-day supernatant of *B. bifidum* was co-incubated for 24 cultures of museum and hospital strains. The biofilm formation in vitro experiment was studied after 24 and 96 hours. Treatment of implants with exometabolites of bifidobacteria was carried out for 30 minutes. Experimental research was carried out on rabbits of breed «Flandr». Titanium implants without coating (control) and with porous SBKFM coating treated with exometabolites of *B. bifidum* (experiment) were screwed into the tibial bones of animals. Histological examination and computed microtomography were performed using a SkyScan 1172 instrument (BRUKER). *Result.* Depending on the time of cultivation of bifidobacteria, the supernatant *B. bifidum* 791 had a bacteriostatic and bactericidal effect to varying degrees, and also inhibited the biofilm formation of the studied microorganism cultures, including antibiotic-resistant strains. In in vivo experiments, the use of porous SBKFM coatings on titanium implants treated with the supernatant of bifidobacteria made it possible to maintain the mineral density indices of the peri-implantation zone at a high level in comparison with the use of control titanium implants without coating. *Conclusion.* Positive results of preclinical experiments are promising for further clinical research in trauma and orthopedic practice, which ultimately will reduce the risk of developing septic complications and prevent the migration of metal structures and instability of endoprostheses in the postoperative period.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), No. 2, P. 55—61

Key words: *B. bifidum* 791, biofilms of microorganisms, antibiotic-resistant strains, traumatologic-orthopedic practice, titanium implants

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на все достижения асептики и антисептики, риск развития гнойно-септических осложнений в раннем и позднем послеоперационном периодах по данным отечественных и зарубежных авторов достигает 37,8% от всех оперативных вмешательств [1, 7, 8, 16].

Сложность проведения антибактериальной терапии усугубляется формированием биопленок на поверхности установленных эндопротезов и имплантатов. Бактерии в составе биопленок усиливают свою патогенность, проявляют более высокую устойчивость к антибиотикам и другим лекарственным препаратам, что, в свою очередь, приводит к хронизации инфекционного процесса [6, 11, 14].

Учитывая стадийность развития биопленки, важно предотвратить первичную контаминацию имплантируемых материалов микроорганизмами. В условиях современного мира, в котором все чаще встречается резистентность бактерий ко многим антибиотикам, а в определенных случаях отмечается и полиантибиотико-резистентность, изучение антимикробных свойств метаболитов пробиотических микроорганизмов (в частности бифидо- и лактобацилл) приобретает все более важное значение. Поиск препаратов, биологически безопасных для организма человека, обладающих высокими антимикробными свойствами, перспективно и следует

рассматривать с позиции ассоциативного симбиоза — многокомпонентной интегративной системы (макропартнер, нормофлора, условно патогенные и патогенные микроорганизмы).

Перспективность применения симбиотического подхода в медицине обоснована результатами научных исследований, которые доказали, что экзометаболиты представителей симбиотической нормофлоры (бифидобактерий) обладают высокой антимикробной активностью, противовоспалительными свойствами, а также предупреждают гипоксию тканей и микроциркуляторные нарушения за счет содержания в них карбоновых кислот, микробного лизоцима, перекиси водорода, бактериоцинов, протеолитических ферментов, витаминов [2, 3, 5, 9, 10].

В связи с вышесказанным интерес представляет изучение и практическое применение антимикробных свойств супернатанта (экзометаболиты) бифидофлоры в травматолого-ортопедической практике для предотвращения первичной контаминации имплантатов микроорганизмами и влияния на репаративную регенерацию костной ткани периимплантационной зоны в послеоперационном периоде.

Цель работы — изучение влияния экзометаболитов *Bifidobacterium bifidum* на биологические свойства возбудителей гнойно-септических осложнений в травматолого-ортопедической практике и оценка их воздействие на репаративную регенерацию костной ткани периимплантационной зоны в послеоперационном периоде.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве штамма-продуцента была использована производственная культура *Bifidobacterium bifidum* 791 (№ депонента АС-1247 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика»), использующаяся при производстве пробиотика «Бифидумбактерин».

Супернатант (экзометаболиты) *B. bifidum* 791 получали из бульонной культуры бифидобактерий. Исследуемую культуру инокулировали в питательный бульон Schaedler, культивировали в течении 24 (суточная бульонная культура), 48 (двухсуточная), 72 (трехсуточная) и 96 (четырёхсуточная) часов в условиях анаэробного термостата (Binder, Германия) при 37°C, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 минут и пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм («Millipore», Франция).

При исследовании пролиферативной и антимикробной активности в эксперименте *in vitro* использовали двухсуточный (48 часов культивирования бифидобактерий в питательном бульоне) супернатант *B. bifidum*, музейные тест-штаммы: *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC и антибиотикорезистентные госпитальные изоляты, выделенные от пациентов с перипротезной инфекцией и остеомиелитом: *Staphylococcus aureus* 889 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* 2041, *Pseudomonas aeruginosa* 9672.

Выделение, идентификацию и определение чувствительности возбудителей к антибиотикам проводили на базе бактериологической лаборатории ГБУЗ ТО ОКБ № 2 г. Тюмени в соответствии с приказом МЗ СССР № 535 Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений.

Эксперимент *in vitro* по изучению бактерицидного влияния в отношении тест-штаммов бактерий проводили методом десятикратных разведений супернатанта *B. bifidum*, полученного из двухсуточной бульонной культуры бифидобактерий. Исследуемый супернатант соинкубировали с чистой культурой музейных и госпитальных штаммов бактерий в соотношении 9:1 при 37°C в течение 24 часов, затем из каждого разведения производили высеивание по 0,1 мл на плотные питательные среды: желточно-солевой агар для *Staphylococcus aureus* и *epidermidis*, агар Мюллера-Хинтона — *Pseudomonas aeruginosa*. Пролиферативную активность тест-штаммов бактерий оценивали через 24 часа.

Нанесение пористого синтетического биоактивного кальций-фосфатного минерального (СБКФМ) покрытия на титановые имплантаты для экспериментов осуществлялась по авторской методике [12].

В основе изучения формирования биопленки использовали метод G. O'Toole [15], модифицированный в авторском исполнении. В опытах в качестве «подложки» использовали образцы титановых имплантатов с пористым СБКФМ покрытием, обработанные экзометаболитами бифидобактерий, т.е., выдержанные 30 минут в двухсуточных экзометаболических растворах. Контрольные образцы титановых имплантатов с пористым ПСБКФМ покрытием не обрабатывали экзометаболическими веществами. Контрольные опытные образцы погружали в питательный бульон с музейными и госпитальными тест-штаммами ( $1,5 \times 10^3$  КОЕ/мл) с экспозицией в 24 и 96 часов. После экспозиции образцы кратковременно погружали в физиологический раствор для избавления от планктонных клеток и опускали на 45 минут в 0,1% раствор генцианвиолета, затем промывали в физиологическом растворе и помещали в этиловый спирт (2 мл) на 15 минут. Оптическую плотность (OD) окрашенного спирта измеряли на фотоэлектроколориметре (КФК-3).

Экспериментальное исследование *in vivo* проводили на 27 кроликах породы «Фландр» в возрасте 7-8 месяцев, с массой тела 5,8 — 6, 6 кг. В большеберцовые кости животных после предварительного засверливания вкручивались титановые имплантаты без покрытия (контроль), с пористым СБКФМ покрытием и с пористым СБКФМ покрытием, обработанным экзометаболическими веществами *V. bifidum* (опыт). Оперативное вмешательство выполнялось в асептических условиях, под внутривенным наркозом.

Животных выводили из эксперимента в следующие сроки: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 20, 30 и 50 суток. Костная ткань периимплантационной зоны во все вышеуказанные сроки исследовалась методом гистологического исследования и компьютерной микрофотографии с использованием прибора высокого разрешения SkyScan 1172 (BRUKER). Данный метод позволяет проводить реконструкцию трехмерных моделей рентгеновских изображений и анализировать качество костной ткани периимплантационной зоны с высоким разрешением. Динамику оценивали по изменению показателя минеральной плотности костной ткани — BMD ( $\text{г/см}^3$ ).

Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, USA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах *in vitro* установлено, что суточный супернатант *V. bifidum* 791 проявлял бактериостатическое действие в отношении исследуемых штаммов микроорганизмов, а трех- и четырехсуточный — бактерицидное. Двухсуточные экзометаболические растворы *V. bifidum* отличались максимальной бактерицидной активностью, что дало основание использовать их в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Результаты исследования по изучению бактерицидных свойств супернатанта *V. bifidum* в отношении антибиотикорезистентных госпитальных изолятов *S. aureus* 889 (MRSA), *S. epidermidis* 2041 и *P. aeruginosa* 9672 показали отсутствие роста бактерий в максимальных концентрациях ( $1,5 \times 10^7$  КОЕ/мл), что свидетельствовало о высокой антимикробной активности супернатанта бифидобактерий в отношении не только тест-штаммов бактерий, но и антибиотикорезистентных госпитальных изолятов.

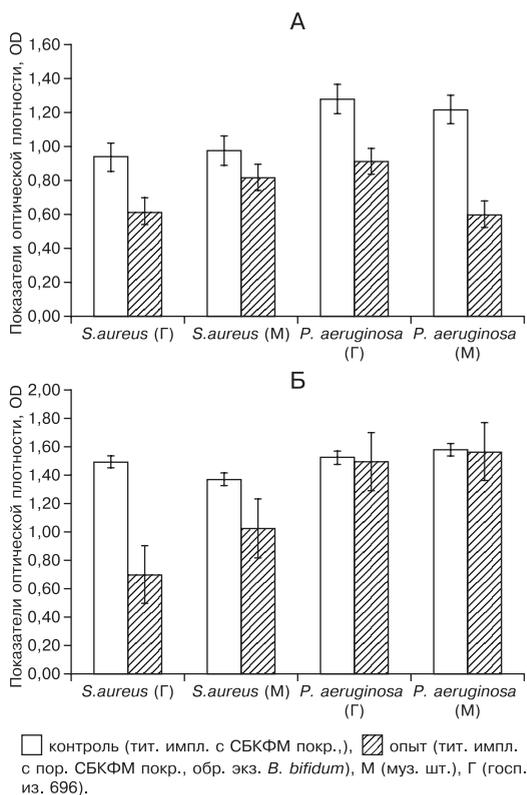
При изучении влияния супернатанта *V. bifidum* 791 на биопленкообразование бактерий установлено, что наиболее выраженное снижение показателей оптической плотности было выявлено через 24 часа экспозиции. Среди всех исследуемых культур микроорганизмов более чувствительным к экзометаболическим веществам бифидобактерий оказался музейный тест-штамм *P. aeruginosa*, у которого отмечено снижение показателя биопленкообразования на  $50 \pm 3\%$  от значений контроля (рис. 1 А). Через 96 часов эксперимента максимальное ингибирование биопленкообразования бы-

ло выявлено в отношении госпитального тест-штамма *S. aureus*, у которого различия значений оптической плотности в опыте и контроле составило  $53 \pm 3\%$  (рис. 1 Б).

Результаты гистологического исследования и компьютерной рентгеновской микрофотографии в экспериментах на кроликах показали более выраженную резорбцию костной ткани периимплантационной зоны при использовании титановых имплантатов без покрытия. В таблице представлены данные по изменению минеральной плотности, являющейся одним из показателей качества костной ткани. Определено снижение данного показателя при анализе периимплантационной зоны титанового имплантата без покрытия, как с 3 по 9 сутки, так и с 11 по 50 сутки исследований, что свидетельствовало о снижении прочности кости. Напротив, применение пористого СБКФМ покрытия на титановых имплантатах, обработанного экзометаболизмом бифидобактерий, позволило сохранить качество костной ткани, определяемое сохранением показателя минеральной плотности периимплантационной зоны на высоком уровне в сравнении с использованием контрольных титановых имплантатов без покрытия.

Результаты проведенных *in vivo* и *in vitro* экспериментов подтверждают роль микробного фактора в предотвращении инфекционного процесса при хирургической патологии, о чем также свидетельствуют экспериментальные исследования на модели штамма *B. subtilis* № 534, транслоцирующегося из кишечника к очагу воспаления [13]. В нашей работе мы использовали супернатант бифидобактерий, являющихся представителями нормальной микрофлоры человека и способных снижать персистентный потенциал патогенов и регулировать иммунный гомеостаз хозяина [3]. Проведенные исследования позволили установить высокую антибактериальную активность и способность супернатанта штаммов *B. bifidum* 791 подавлять формирование биопленок у антибиотикорезистентных госпитальных изолятов, выделенных от пациентов с перипротезной инфекцией и остеомиелитом.

Использование экзометаболизмов *B. bifidum* с синтетическим биоактивным кальций-фосфатным минеральным покрытием на титановых имплантатах в экспериментах *in vivo* показало, что минеральная плотность костной ткани периимплантационной зоны претерпевает меньшие изменения и остается на высо-



**Влияние экзометаболизмов на формирование биопленки музейными тест-штаммами и госпитальными изолятами через 24 (А) и 96 (Б) часов.**

**Сравнительная оценка показателей минеральной плотности периимплантационной зоны костной ткани при использовании имплантатов в эксперименте *in vivo***

Сутки	Вид имплантата	BMD (г/см <sup>3</sup> )
3 по 9	Ti	0,788 ± 0,040
3 по 9	Ti + ПСБКФМП + Э/М	0,818 ± 0,046
3 по 9	Нормальная кость	0,915 ± 0,011
11 по 50	Ti	0,735 ± 0,018
11 по 50	Ti + ПСБКФМП + Э/М	0,832 ± 0,018
11 по 50	Нормальная кость	0,940 ± 0,010

Условные обозначения: Ti — титановый имплантат; Ti + ПСБКФМП + Э/М — титановый имплантат с пористым синтетическим биоактивным кальций-фосфатным минеральным покрытием, обработанный двухсуточными экзометаболизмами *B. bifidum*; BMD — показатель минеральной плотности костной ткани (в г/см<sup>3</sup>).

ком уровне, в сравнение с изменениями при использовании титановых имплантатов без покрытия. Это позволяет утверждать, что в случае применения экзометаболитов *B. bifidum* с синтетическим биоактивным кальций-фосфатным минеральным покрытием на титановых имплантатах будет формироваться прочный костно-металлический блок в послеоперационном периоде.

Выявленная нами в работе антимикробная и антибиопленочная активность бифидобактерий в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов открывает перспективу создания на их основе антимикробных средств, имеющих преимущество в сравнении с широко используемыми в травматолого-ортопедической практике антибиотиками и антисептическими препаратами. Положительные результаты доклинических экспериментов перспективны для проведения дальнейших клинических исследований в травматолого-ортопедической практике, что в конечном итоге позволит снизить риск развития гнойно-септических осложнений и предотвратить миграцию металлоконструкций и нестабильность эндопротезов в послеоперационном периоде.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Божкова С.А., Тихилов Р.М., Разоренов В.Л. и др. Микробиологические аспекты антибактериальной терапии парапротезной инфекции, вызванной грамположительными возбудителями. *Инфекции в хирургии*. 2011, 9 (3):31-36.
2. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В. Анализ профилактического и лечебного действия пробиотических препаратов с позиций новых научных технологий. *Журнал микробиологии*. 2015, 2:90-104.
3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека: монография. О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова, Е.В. Иванова. Екатеринбург, УрО РАН, 2014.
4. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург, УрО РАН, 2007.
5. Вахитов Т.Я. Регуляторные функции бактериальных экзометаболитов на внутривидовом и межвидовых уровнях. Дисс. д-ра биол. наук. СПб, 2007.
6. Льюис К. Персистирующие клетки и загадка выживания биопленок. *Биохимия*. 2005, 70(2):327-336.
7. Лещинин Я. М. Инфекции области хирургического вмешательства (ИОХВ) в экстренном хирургическом стационаре: распространенность и структура. Многопрофильная больница: проблемы и решения. Ленинск-Кузнецкий, 2011.
8. Малков И.С., Шакиров М.И., Пизамутдинов Е.З. и др. Интраоперационная профилактика раневых гнойно-воспалительных осложнений. *Казанский медицинский журнал*. 2006, 2:108-110.
9. Молохова Е.И., Сорокина Ю.В. Разработки отечественных метаболических пробиотиков и их стандартизация. *Сибирский медицинский журнал (г. Томск)*. 2011, 26(1):29-33.
10. Постникова Е.А., Ефимов Б.А., Володин Н.Н., Кафарская Л.И. Поиск перспективных штаммов бифидобактерий и лактобацилл для разработки новых биопрепаратов. *Журн. микробиол.* 2004, 2:64-69.
11. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Андреев А.Л., Алексеева Н.В. и др. Электронно-микроскопическое изучение биоплёнок, образуемых бактериями *Burkholderia cerasia*. *Микробиология*. 2008, 77(1):63-70.
12. Марков А.А., Соколюк А.А. Способ нанесения синтетического биоактивного кальций-фосфатного минерального комплекса на имплантаты медицинского назначения. Патент РФ № 2606366 от 10.01.2017. Бюл. № 1.
13. Тарасенко В.С., Никитенко В.И., Стадников А.А. Экспериментально-клиническое обоснование применения споробактерина в комплексном лечении панкреонекроза. *Вестн. хирургии им. И.И. Грекова*. 2002, 161(1):110-114.
14. Тец Г.В. Роль внеклеточной ДНК и липидов матрикса во взаимодействии бактерий биоплёнок с антибиотиками. Дисс. канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 2007.

15. Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000, 54:49-79.
16. Wald D.S. Wound healing under pathological conditions. *Inf. Medicina propraxi.* 2002, 10:6-10.

Поступила 15.02.19

Контактная информация: Марков А.А.,  
625023, Тюмень, ул. Одесская, 54, р.т. (3452)20-21-97

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Л.И.Корзая, Д.И.Догадов, А.М.Гончаренко, Б.А.Лапин*

## **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОКОРЕВОВОГО ИММУНИТЕТА У ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ ГОРОДА СОЧИ И ОБЕЗЬЯН АДЛЕРСКОГО ПРИМАТОЛОГИЧЕСКОГО ЦЕНТРА**

НИИ медицинской приматологии, Сочи

*Цель.* Изучение уровня противокоревового иммунитета у обезьян приматологического центра, обслуживающего персонала питомника и у некоторых групп населения Адлерского региона в сравнительном аспекте. *Материалы и методы.* В работе исследовано 1077 сывороток: 354 — от людей и 723 — от обезьян. Использовали коммерческие тест-системы для определения IgG и IgM к вирусу кори методом ИФА. *Результаты.* Выявлена крайне низкая степень противокоревового иммунитета у обезьян разных видов Адлерского приматологического центра ( $10,2 \pm 1,4\%$ ) за счет особей, рожденных до 1993 года. У макак яванских, импортированных из Вьетнама и Республики Маврикий в 2015-2017 гг., частота обнаружения анти-IgG варьировала от 2,3% до 57,5%, анти-IgM не обнаруживались. Показатель противокоревового иммунитета у взрослого населения, в целом, был ниже нормы ( $86,4 \pm 1,8\%$ ), однако варьировал в различных группах (57,8 — 100%). Выявлена значительная разница ( $p \leq 0,05$ ) не только в проценте иммунных лиц к вирусу кори среди лиц в возрасте 18-35 по сравнению с лицами в возрасте 36-75 лет ( $73,6 \pm 3,5\%$  и  $96,9 \pm 1,2\%$  соответственно), но и в среднем титре антител ( $1,34 \pm 0,26$  МЕ/мл и  $2,92 \pm 0,24$  МЕ/мл соответственно). Самый низкий процент серопозитивных лиц ( $57,8 \pm 6,2\%$ ) и уровень антител ( $0,97 \pm 0,21$  МЕ/мл) был отмечен в группе студентов (18-25 лет). *Заключение.* Наличие серонегативных лиц (26,4%) к вирусу кори среди молодого населения в возрасте 18-35 лет требует проведения вакцинации против кори. Появление источника инфекции среди неиммунных обезьян (89,8%), рожденных после 1992 года, может привести к возникновению вспышки кори.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 61—67

Ключевые слова: корь, антитела, иммунитет, ИФА, человек, обезьяны

*L.I.Korzaya, D.I.Dogadov, A.M.Goncharenko, B.A.Lapin*

## **COMPARATIVE STUDY OF ANTI-MEASLES IMMUNITY IN ADULT POPULATION OF SOCHI AND LABORATORY PRIMATES OF ADLER PRIMATE CENTER**

Research Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia

*Aim.* Comparative study of the level of anti-measles immunity in monkeys of the Primate Center, colony service staff and in some groups of the population of the Adler region. *Materials and methods.* In this study 1077 sera have been investigated: 354-from humans and 723-from monkeys. Commercial test systems were used to determine IgG and IgM antibodies to measles virus by IEA (immune enzyme analysis). *Results.* An extremely low degree of anti-measles immunity among monkeys of different species of the Adler Primate Center ( $10,2 \pm 1,4\%$ ) at the expense of the individuals born before 1993 was revealed. In cynomolgus

monkeys (*Macaca fascicularis*) imported from Vietnam and the Republic of Mauritius in 2015-2017 the rate of detection of anti-IgG varied from 2.3% to 57.5%. Anti-IgM was not detected. The rate of anti-measles immunity in the adult population was generally below normal ( $86.4 \pm 1.8\%$ ), but varied in different groups (57.8-100%). A significant difference was found ( $p \leq 0.05$ ) not only in the percentage of individuals with the immunity to measles virus among persons aged 18-35 compared with persons aged 36-75 years ( $73.6 \pm 3.5\%$  and  $96.9 \pm 1.2\%$ , respectively), but also in the average antibody titers ( $1.34 \pm 0.26$  IU/ml and  $2.92 \pm 0.24$  IU/ml, respectively). The lowest percentage of seropositive individuals ( $57.8 \pm 6.2\%$ ) and antibody levels ( $0.97 \pm 0.21$  IU/ml) were observed in a group of students (18-25 years old). *Conclusion.* The presence of individuals (26.4%) seronegative to the measles virus among young people aged 18-35 years supports the necessity of vaccination against measles. The emergence of a source of infection among nonimmune monkeys (89.8%) born after 1992 may lead to an outbreak of measles.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 61–67

Key words: measles, antibodies, immunity, IEA, human, monkeys

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы связана с осложнением эпидемической ситуации по кори с 2011 года не только в мире, но и в различных регионах России [1,3, 6, 11, 13].

Поводом для настоящего исследования послужил тот факт, что обезьяны являются единственным видом животных, у которых корь зарегистрирована как спонтанное заболевание наряду с человеком. Многие виды африканских и азиатских обезьян, включая антропоидов, имеют антитела к вирусу кори [5, 10]. Коревая инфекция обезьян в естественных условиях не наблюдалась. Вместе с тем, вспышки спонтанной кори среди обезьян описывались во многих приматологических центрах мира [5, 9, 12, 14]. В 1976 году зарегистрирована вспышка кори со смертельным исходом (21 случай) среди макак резусов (*Macaca mulatta*), привезенных из Индии в научно-исследовательский центр Оксфордского университета, Лондон [12]. В 1996 году среди обезьян Старого Света (макаки резусы, яванские и лапундеры), содержащихся в питомнике Национального Института Здоровья (США), наблюдалась вспышка кори (94 случая) в течение 2-месячного периода. Вспышка была вызвана диким штаммом вируса, который был ассоциирован с регистрируемыми в данный период случаями острой кори в США. Карантин и массовая иммунизация помогли предотвратить последующее распространение инфекции [14]. В 1999 г. в зоопарке города Юнджин (Корея) наблюдалась вспышка спонтанной кори в группе 53 японских макак (*Macaca fuscata*), 12 из которых погибли [9].

Имеются данные о том, что дети и взрослые, не привитые и не имеющие в анамнезе этой инфекции, при контакте с больными обезьянами легко заражаются корью от больных животных [2,5].

Следует отметить, что серологический мониторинг за состоянием иммунитета к кори среди сотрудников Адлерского приматологического центра и обезьян проводился постоянно [2; Корзая Л.И., 2011]. Интерес к данным исследованиям значительно возрос в период подготовки и проведения Зимней Олимпиады 2014 в г. Сочи, а также в последующий период, связанный с огромной миграцией населения и возможностью заноса коревой инфекции в Адлерский район и возникновения вспышек заболевания не только среди людей, но и обезьян.

Целью данной работы являлось изучение уровня противокорьевого иммунитета у обезьян Адлерского приматологического центра, обслуживающего персонала питомника в сравнительном аспекте с некоторыми группами населения окружающего региона, а также оценка эпидемической ситуации по кори.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследование проводилось как оперативно, так и ретроспективно с использованием сывороток, собранных в период 1999-2017 гг. и хранящихся в замороженном состоянии. Всего было исследовано 1077 сывороток от человека и обезьян.

Проверено 354 сыворотки от населения г. Сочи. Исследованы 92 сыворотки сотрудников НИИ МП (2002-2016 гг.); 64 сыворотки студентов РУДН, обучающихся на базе Института (6 групп студентов, обследованных в 2005, 2006, 2010, 2013, 2014, 2016 гг.); 115 сывороток пациентов Адлерской поликлиники №2 (2007 год); 20 сывороток от пациентов онкологического диспансера г. Сочи (2008 год); 63 сыворотки сотрудников учебно-воспитательных учреждений г. Адлера (2009 год). Возраст сотрудников варьировал от 25 до 75 лет, студентов — от 20 до 25 лет.

Были исследованы сыворотки от макак резусов (*Macaca mulatta*), макак яванских (*M. fascicularis*), макак лапундеров (*M. nemestrina*), павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*), павианов анубисов (*P. anubis*), зеленых марьтышек (*Chlorocebus aethiops*), рожденных в течение двух различных периодов: 1979-1992 гг. (n=123) и 1993-2016 гг. (n=366). Возраст рожденных в питомнике обезьян варьировал от 1 до 24 лет. Также были проверены 234 сыворотки от импортных животных (2014-2017 гг.). Зеленые марьтышки прибыли из мест естественного обитания (Танзания) в 2014 г. Пять групп макак яванских прибыли из питомника (Вьетнам, Хошимин) в 2015-2017 гг. и одна группа макак яванских — из питомника Республики Маврикий в 2016 году. Возраст обезьян варьировал от 2 до 8 лет. Все импортные обезьяны по прибытию содержались в карантине в течение 45 дней и были обследованы на наличие антител класса М и G к вирусу кори через 1-3 недели после поступления.

В работе использовали иммуноферментный анализ. Для определения антител к вирусу кори (анти-ВК IgG) в сыворотках людей и обезьян использовали коммерческие тест-системы ИФА «ВектоКорь IgG» и ИФА «ВектоКорь IgM» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирская обл., п. Кольцово). Результаты учитывались на спектрофотометре лабораторном «ImmunoChem 2100» производства High Technology Inc., США с использованием фильтра с длиной волны 450 нм. Реактивность сывороток в отношении вируса кори оценивалась по значениям ОП450 (оптическая плотность исследуемых образцов сывороток при длине волны 450 нм) и в МЕ/мл. Результаты интерпретировались в соответствии с инструкциями.

Статистический анализ результатов проведен с использованием методов параметрической статистики [4] с определением средней арифметической ( $M$ ), стандартной ошибки ( $m$ ). Достоверность различий между явлениями оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента. Расчет показателей осуществляли по формулам с использованием программы Microsoft Office Excel 2007. Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. представлена частота распространения антител к вирусу кори в пяти группах населения (n=354) как в целом, так и в зависимости от возраста: молодого населения (18—35 лет), а также лиц старшей возрастной группы (36-75 лет). В сравнительном аспекте представлен также средний уровень противокоревых антител в МЕ/мл.

Согласно ВОЗ установлено минимальное значение нормы противокорьевого иммунитета у населения различных индикаторных групп населения (92,5%), которое свидетельствует о благополучной эпидемической ситуации по кори. В соответствии с этим, было выявлено (табл.), что показатель противокорьевого иммунитета, в целом, был ниже нормы ( $86,4 \pm 1,8\%$ ), но варьировал в зависимости от групп населения. Высокий процент серопозитивных сывороток (93,0-100%) был обнаружен в группах 3, 4 и 5 (сотрудники учебно-воспитательных учреждений, пациенты поликлиники и пациенты онкологического диспансера) и низкий (85,9% и 57,8%) в группах 1 и 2 (сотрудники НИИ и студенты соответственно).

Кроме того, в целом отмечалась значительная разница ( $p \leq 0,05$ ) в проценте иммунных лиц к вирусу кори среди лиц в возрасте 18-35 по сравнению с лицами старшего возраста ( $73,6 \pm 3,5\%$  и  $96,9 \pm 1,2\%$  соответственно). Такая же разница ( $p \leq 0,05$ ) в зависимости от возраста прослеживается и в группе пациентов поликлиники

**Частота распространения антител к вирусу кори (%) среди населения г. Сочи**

№№ групп	Группы обследованных лиц	Анти-корь (IgG)* в сыворотках людей						Достоверность разницы между возрастными группами	
		Всего:		в зависимости от возраста (лет)		Средний уровень антител (МЕ/мл±m)	%		
		Количество сывороток*	Средний уровень антител (МЕ/мл ±m)	Количество сывороток*	Средний уровень антител (МЕ/мл ±m)			Количество сывороток*	Средний уровень антител (МЕ/мл±m)
1	Сотрудники НИИ МП и обслуживающий персонал питомника	79/92 (85,9±3,6)	2,59±0,22	36/45 (80,0±5,9)	1,58±0,27**	43/47 (91,5±4,1)	3,47±0,27**	t=1,6 p=0,113 ≥0,05	t=4,9 p=4,12E-06 p≤0,0000005
2	Студенты ВУЗа	37/64 (57,8±6,2)	0,97±0,21	37/64 (57,8±6,2)	0,97±0,21	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
3	Сотрудники учебно-воспитательных учреждений	63/63 (100±0)	2,16±0,28	15/15 (100±0)	1,33±0,33**	48/48 (100±0)	2,4±0,22**	t=0	t=2,69 p=0,009 p≤0,05
4	Пациенты поликлиники	107/115 (93,0±2,4)	2,6±0,17	30/36 (83,3±6,2)**	1,48±0,25	77/79 (97,5±1,8)**	3,04±0,19	t=2,2 P=0,03 p≤0,05	t=4,97 p=2,58E-06 p≤0,0000005
5	Пациенты онкологического диспансера	20/20 (100±0)	2,77±0,29	н.и.	н.и.	20/20 (100±0)	2,77±0,29	н.и.	н.и.
Итого:		306/354 (86,4±1,8)	2,23±0,23	118/160 (73/6,±3,5)**	1,34±0,26**	188/194 (96,9±1,2)**	2,92±0,24**	t=6,3 p=8,9E-10 p≤0,0000005	t=4,5 p=1,13E-05 p≤0,0000005

Примечание. \* Количество позитивных сывороток/число исследованных (% ± m), \*\* p≤0,05, н.и. — не исследовали.

(83,3±6,2% и 97,5±1,8%). В группе сотрудников НИИ МП эта разница была недостоверной — 80,0±5,9% и 91,5±4,1% соответственно ( $t=1,6$ ;  $p=0,113$ ). В группе сотрудников учебно-воспитательных учреждений, которая является декретированным контингентом, процент серопозитивных лиц составил 100% независимо от возраста. Очевиден контроль со стороны соответствующих служб здравоохранения за состоянием противокорревого иммунитета в этой группе. В группе пациентов онкологического диспансера (возраст 35-75 лет) также отмечалась 100% серопозитивность к вирусу кори.

Особого внимания и детального рассмотрения заслуживают результаты, полученные в группе студентов (табл.). Обращает внимание не только низкий процент серопозитивных к вирусу кори лиц (57,8±6,2%), но и низкий средний титр антител (0,97±0,21 МЕ/мл) в этой группе (возраст от 18 до 25 лет) и достоверное отличие этих показателей от таковых в других сравниваемых группах. Следует дополнительно отметить, что значения противовирусного иммунитета среди студентов в различные годы значительно варьировали, но всегда был ниже нормы ВОЗ (в 2005 году — 71,4%, в 2006 году — 77,8%, в 2014 году — 83,3%). В 2010, 2013 и 2016 гг. были зарегистрированы самые низкие показатели иммунитета (54,5%, 41,2% и 55,0% соответственно). Несомненно, полученные данные свидетельствуют о низком уровне иммунитета и неблагоприятной ситуации по кори среди молодых лиц и опасности их инфицирования при заносе инфекции.

Несмотря на 100% серопозитивность к вирусу кори сотрудников учебно-воспитательных учреждений, отмечались достоверно различные показатели уровня антител ( $p\leq 0,05$ ), выраженные в МЕ/мл (ИФА) в двух сравниваемых возрастных группах. Так, среди молодых людей в возрасте 18-35 лет средний титр антител в МЕ/мл был в 1,8 раза ниже (1,33±0,33 МЕ/мл), чем в возрастной группе 36-75 лет (2,4±0,22 МЕ/мл). В первой группе, по-видимому, присутствовал эффект от вакцинации, а во второй группе — анамнестический эффект от перенесенной инфекции.

Значимые различия в средних титрах антител ( $p\leq 0,05$ ) к вирусу кори в возрастных группах 18-35 лет и 36-75 лет наблюдалось также и среди пациентов поликлиники (1,48±0,25 и 3,04±0,19) и сотрудников НИИ МП (1,58±0,27 и 3,47±0,27).

Представлялось также важным проанализировать показатели уровня антител к вирусу кори в МЕ/мл у обследуемых лиц в зависимости от возраста. Содержание антител расценивали как низкое (от 0,18 до 1,0 МЕ/мл), среднее (от 1,0 до 3,0 МЕ/мл), высокое (от 3,0 до 5,0 МЕ/мл) и очень высокое ( $> 5,0$  МЕ/мл).

В целом, в возрастной группе населения от 18 до 35 лет было обнаружено наибольшее количество лиц (64,4%) с низкими титрами антител. Затем наблюдалось постепенное снижение процента лиц с высокими титрами. Так, процент лиц со средними значениями титров антител был меньше в 3 раза (21,2%), с высокими титрами — меньше в 11 раз (5,9%), с очень высокими титрами — меньше в 81 раз (0,8%). В возрастной группе населения от 36 до 75 лет, наоборот, количество лиц с низкими титрами было минимальным (11,7%), а затем наблюдалось увеличение лиц с высокими титрами антител, но не постепенное, а скачкообразное. Так, число лиц со средними титрами антител было больше в 3,5 раза (40,4%), с высокими — больше в 1,9 раза (21,8%), с очень высокими — больше в 2,2 раза (26,1%).

Следует обратить внимание, что во всех четырех группах населения, в которых присутствовали лица в возрасте 18-35 лет (№№ 1,2,3,4), выявлено наибольшее число лиц с низкими титрами антител (50-83,8%). Максимальный процент таких лиц отмечался среди студентов в возрасте от 20 до 25 лет.

При изучении данных о распространении противокорревых антител у обезьян Адлерского приматологического центра ( $n=723$ ) установлено, что у разных видов обезьян 1 группы (макаки резусы, яванские и лапундеры, павианы гамадрилы и анубисы, зеленые мартышки), рожденных в питомнике в период 1979-1992 гг. ( $n=123$ ), антитела содержались в 40,7±4,4% случаев. Следует особенно отметить, что все перечисленные выше виды обезьян 2 группы, рожденные в период 1993-2016 гг. ( $n=366$ ),

были серонегативными к вирусу кори, т.е. не содержали ни анти-IgG, ни анти-IgM, свидетельствующих о «свежей» инфекции (n=127). У импортированных обезьян, прибывших в Адлерский питомник из других стран (Танзания, Вьетнам, Маврикий) в 2014-2017 гг., доля серопозитивных особей составила  $17,9 \pm 2,5\%$ . Частота распространения антител варьировала среди макаков яванских (n=198) от 2,3% до 57,5% и отсутствовала у зеленых мартышек из Танзании (n=36). Все импортированные обезьяны были серонегативными по IgM. Средний уровень антител у обезьян 1 группы составил  $1,78 \pm 0,23$  МЕ/мл, а 2 —  $1,26 \pm 0,17$  МЕ/мл ( $p \geq 0,05$ ).

Сравнительная оценка уровня антител к вирусу кори у людей (n=306) и обезьян (n=92) показала, что низкие титры встречались практически одинаково часто (32% и 37% соответственно), средние титры — в 1,4 раза чаще у человека (33%), чем у обезьян (47,8%). Что касается высоких титров антител, то у человека они встречались в 14 раз чаще (15,7%) по сравнению с обезьянами (1,1%). Максимальные титры антител ( $\geq 5,0$  МЕ/мл) обнаруживались также чаще у людей (19,3%), чем у обезьян (10,9%).

Таким образом, в настоящей работе представлены обобщенные данные по сравнительному изучению противокорревого иммунитета в нескольких группах взрослого населения, проживающих на территории Сочи за несколько лет (с 2003 года по 2017 гг.) и обезьян Адлерского приматологического центра (1979-2017 гг.). Получены также важные данные при изучении противокорревого иммунитета среди молодого населения г. Сочи (индикаторная группа в возрасте от 18 — до 35 лет).

Отсутствие иммунитета к кори у  $42,2 \pm 7,4\%$  студентов РУДН (18-25 лет) и низкий уровень антител к вирусу у подавляющего большинства остальных лиц этой группы (83 %) свидетельствует о недостаточно благополучной ситуации по кори среди восприимчивого контингента. Среди всех сотрудников Адлерского приматологического центра зарегистрировано 14,5% серонегативных к вирусу кори лиц, а в возрасте до 35 лет — 22,2%. Полученные данные свидетельствуют о недостаточном уровне противокорревого иммунитета среди молодого населения Адлерского региона, который по данным ВОЗ должен быть не менее 92,5%. Наличие серонегативных лиц требует проведения вакцинации против кори.

Проведенные нами исследования подтвердили существующие проблемы с уровнем иммунитета против кори в «индикаторной группе» молодого населения в возрасте от 18 до 35 лет в нашей стране [7, 8]. Было показано, что в 2010, 2013 и 2016 гг. были зарегистрированы самые низкие показатели иммунитета среди студентов в возрасте от 18 до 25 лет (54,5%, 41,2% и 55,0% соответственно). Следует отметить, что еще с 2008 года иммунизация против кори в этой индикаторной группе была введена в национальный календарь профилактических прививок (приказ Минздрава и социального развития России №673 от 30.10.2007 г.) [7]. Поскольку ситуация коренным образом не изменилась, были названы основные недостатки в борьбе с корью — это отказы от прививок и недостоверность сведений о вакцинации, которые представляют граждане. Было предложено продление прививочного возраста до 55 лет для взрослых россиян; повышение контроля за достоверностью сведений о вакцинации, предоставляемых в учебные заведения, а также проведение серологического обследования студентов [8].

В результате проведенных исследований была выявлена также крайне низкая степень общего противокорревого иммунитета среди обезьян Адлерского питомника ( $12,7 \pm 1,2\%$ ) за счет особей, рожденных до 1993 года.

Особый интерес и озабоченность представляют данные о наличии антител к вирусу кори у импортированных в 2015-2017 гг. макаков яванских (до 57,5% в отдельных партиях) при отсутствии циркуляции вируса среди обезьян с 1993 года (т.е. в течение последних 25 лет). Несмотря на отсутствие IgM, полученные результаты свидетельствуют о циркуляции вируса кори среди обезьян (возраст обезьян от двух до восьми лет) в питомнике страны экспорта и возможности заноса инфекции в Адлерский приматологический центр. Для исключения развития подобной

ситуации, необходим строгий контроль за содержания обезьян в карантине и соблюдение его сроков как в стране экспорта, так и в стране ввоза. В соответствии с методическими рекомендациями, действующими в Адлерском приматологическом центре [2], этот срок должен быть не менее 45 дней. Рекомендуются обязательное обследование импортированных обезьян на наличие IgM к вирусу кори. При обострении эпидемической ситуации по кори предлагается проведение вакцинации серонегативных обезьян вакцинными препаратами, используемыми для этих целей у людей [14].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алешкин В.А., Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г., Цвиркун О.В., Шульга С.И., Ежлова Е.Б., Мельников А.А. Проблемы на пути достижения элиминации кори в Российской Федерации. Журн. микробиол. 2016 (5):29-34.
2. Болезни обезьян, опасные для человека. Правила содержания и работы с обезьянами в карантине при поступлении животных из внешних источников, а также при экспериментальном инфицировании. Методические рекомендации (МР.1.30012/1-13). М., 2014.
3. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Таран Т.В., Грижебовский Г.М., Зуенко А.А., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Тешева С.Ч., Оробей В.Г., Мишина Л.И., Пархомко В.В., Рафеенко Г.К., Беланова Е.А. Мониторинг эпидемиологической обстановки в Сочи в пре-олимпийский, олимпийский и постолимпийский периоды. Здравоохранение Российской Федерации. 2015, 59(3):19-22.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., Высшая школа, 1990.
5. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И., Стасилевч З.К., Яковлева Л.А. Проблемы инфекционной патологии обезьян. М., РАМН, 2004.
6. Ноздрачева А.В., Семенов Т.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В. Оценка напряженности гуморального иммунитета к кори и краснухе у беременных женщин в Москве. Журн.микробиол. 2017, 3:91-98.
7. «О национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям». О внесении изменений и дополнений в приказ Минздрава России от 27 июня 2001 г. № 229. Минздравсоцразвития РФ: Приказ от 30.10.2007 № 673.
8. «О мероприятиях по предупреждению распространения кори в субъектах РФ». Решение коллегии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Роспотребнадзор. Приложение №1 к протоколу от 25.07.2014 №6.
9. Choi Y.K., Simon M.A., Kim D.Y. et al. Fatal Measles Virus Infection in Japanese Macaques (*Macaca fuscata*). Vet. Pathol. 1999, 36(6):594-609.
10. Kalter S.S., Heberling R.L., Cooke A. W. et al. Viral infection of nonhuman primates. Lab. Anim. Sci. 1997, 47(5):461-467.
11. Orosz L., Gaspar G., Rozsa A. et al. Epidemiological situation of measles in Romania, Italy, and Hungary: On what threats should we focus nowadays? Acta Microbiol. Immunol. Hung. 2018, Feb.28:1-8.
12. Remfry J. A. Measles epizootic with 5 deaths in newly-imported rhesus monkeys (*macaca mulatta* ). Lab. Anim. 1976, 10: 49-57.
13. Santibanez S., Hübschen J.M., Ben Mamou M.C. Molecular surveillance of measles and rubella in the WHO European Region: new challenges in the elimination phase. Clin. Microbiol. Infect. 2017 Aug; 23(8):516-523.
14. Willy M. E., Woodward R. A., Thornton V. B. et al. Management of a measles outbreak among old world nonhuman Primates. Lab. Anim. Sci. 1999, 49(1):42-48.

*Поступила 14.09.18*

Контактная информация: Корзая Лидия Ивановна, д.м.н.,  
354376, Краснодарский край, Сочи, Адлерский р-н, Весёлое, ул. Мира, 177, р.т. (862)243-20-28

## **ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АТТЕНУИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ ШТАММА А/WSN/33, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА PB2-ГЕНА**

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

*Цель.* Изучение биологических свойств аттенуированных вариантов штамма А/WSN/33(H1N1) вируса гриппа А, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза PB2-гена. *Материалы и методы.* С помощью методов обратной генетики получены сайт-специфические мутанты штамма А/WSN/33, имеющие в PB2-гене ts-мутации из генома холодоадаптированных (ХА) штаммов-доноров аттенуации: А/Энн Арбор/6/60(H2N2), А/Ленинград/134/17/57(H2N2), А/Краснодар/101/35/59 (H2N2). У полученных сайт-специфических мутантов исследован ts-фенотип, att-фенотип, иммуногенность и защитная эффективность при гомологичном и гетерологичном контрольном заражении. *Результаты.* Показано, что включение в PB2-ген вирулентного штамма А/WSN/33 как единичных ts-мутаций, так и комбинации ts-мутаций из генома известных ХА штаммов-доноров аттенуации ведет к изменению ts- и att-фенотипа полученных сайт-специфических мутантов. Наблюдалось падение способности к размножению при повышенной температуре и снижение вирулентности для мышей при интраназальном заражении. Полученные мутанты имели высокую защитную эффективность при гомологическом и гетерологическом контрольном заражении. *Заключение.* Полученные данные позволяют сделать вывод, что некоторые сайт-специфические мутанты не уступают по защитной эффективности как при гомологичном, так и гетерологичном контрольном заражении ХА реассортантным вакцинным вариантам. Результаты работы дают основания рассматривать некоторые из этих мутантов как возможные кандидаты в живые гриппозные вакцины.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 68—76

Ключевые слова: вирус гриппа, сайт-специфический мутагенез, ts-фенотип, att-фенотип, защитная эффективность, гомологичное и гетерологичное контрольное заражение, аттенуация

*V.Yu.Kost, A.A.Rtischev, R.R.Mintaev, I.I.Akopova, K.V.Lisovskaya, S.G.Markushin*

## **STUDY OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF ATTENUATED VARIANTS OF THE VIRULENT A/WSN/33 STRAIN OF INFLUENZA VIRUS, OBTAINED BY THE SITE-SPECIFIC MUTAGENESIS OF PB2-GENE**

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* Study of biological properties of attenuated variants of the virulent A/WSN/33 strain of influenza virus, obtained by the site-specific mutagenesis of PB2-gene. *Materials and methods.* Site-specific mutants of A/WSN/33 of influenza virus, having in PB2- gene ts-mutations from genome of cold-adapted (CA) master-strains: A/Ann Arbor/6/60 (H2N2); A/Leningrad/134/17/57 (H2N2); A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) were obtained with help of reverse genetics methods. The ts-phenotype, att-phenotype, immunogenicity and protective efficacy in homologous and heterologous control infections were studied in the obtained site-specific mutants. *Results.* It was shown that the inclusion in the PB2-gene of the virulent A/WSN/33 strain as single mutations and a combination of mutations from the genomes of CA donor-strains leads to a change in the ts-phenotype and att-phenotype of the mutants obtained. These mutants had high protective efficacy in homologous and heterologous control infection. *Conclusion.* The results obtained allow us to consider the site-specific mutants of influenza virus as possible candidates for live influenza vaccines.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 68—76

Key words: influenza virus, site-specific mutagenesis, ts-phenotype, att-phenotype, protective efficacy, homologous and heterologous control infections, attenuation

## ВВЕДЕНИЕ

Многолетний опыт использования живых гриппозных вакцин в России и США показал их высокую эффективность. В настоящее время они успешно используются в виде холодоадаптированных (ХА) реассортантных вакцин при массовых иммунизациях, особенно детей [1]. В отличие от инактивированных гриппозных вакцин ХА гриппозные вакцины способны защищать население от дрейфовых вариантов вируса.

Прямое включение аттенуирующих мутаций в геном актуальных эпидемических штаммов можно рассматривать как новый перспективный подход к получению живых гриппозных вакцин [4, 7, 16, 17, 20]. Основным источником аттенуирующих мутаций, согласно данным литературы, рассматривается холодоадаптированный штамм А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) [10]. Однако использование набора мутаций из генома этого штамма не позволяло полностью аттенуировать не только пандемический штамм, но также и некоторые вирулентные сезонные варианты вируса гриппа человека [20]. Для успешного решения этой проблемы целесообразно расширение арсенала аттенуирующих мутаций. В этой связи, возможно использование охарактеризованных аттенуирующих мутаций, взятых из генома других ХА штаммов вируса гриппа человека, в частности, ХА штамма А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [1] и ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) [2].

Опыты, проведенные некоторыми исследователями [12, 18], показали высокую эффективность включения сайт-специфических мутаций в PB2-ген вирулентного штамма для получения аттенуированных вариантов вируса гриппа А. Применение этой технологии в отношении PB2-гена позволило включать в этот ген несколько аттенуирующих мутаций, что дало возможность контролировать степень аттенуации вирулентного штамма. Данные, полученные этими авторами, свидетельствовали также о высокой генетической стабильности некоторых из этих вариантов, полученных с помощью данной технологии. В данной работе мы попытались исследовать аттенуационный потенциал ts-мутаций, локализованных в PB2-гене всех вышеуказанных ХА штаммов после их прямого включения в различных комбинациях в геном вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1, а также изучить иммуногенность и защитную эффективность полученных сайт-специфических мутантов при гомологичном и гетерологичном контрольном заражении. в сравнении со сходными характеристиками ХА вакцинного реассортанта, имеющего поверхностные антигены, аналогичные поверхностным антигенам штамма А/WSN/33.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные литературы свидетельствовали о том, что генетические детерминанты, ответственные за ts-фенотип и att-фенотип ХА штаммов-доноров вируса гриппа А, могут быть локализованы в PB2 —гене [11,15, 19]. Более поздние исследования выявили конкретные аминокислотные замены в PB2-белке, ответственные за аттенуацию этих штаммов-доноров [8]. Как видно из табл. 1, ХА штамм А/Энн Арбор/6/60 имел аминокислотную замену в позиции 265 PB2-белка [3, 5, 9], ХА штамм А/Ленинград/134/17/57 — в позиции 478 PB2-белка [8] и ХА штамм А/Краснодар /101/35/59 — в позиции 290 PB2-белка [2]. Все аминокислотные замены являлись следствием замены в триплексе одного нуклеотида. С помощью обратной генетики на первом этапе исследований в геном вирулентного штамма А/WSN/33 были включены одиночные мутации из PB2-гена ХА штаммов А/Энн Арбор/6/60, А/Ленинград/134/17/57 и А/Краснодар/101/35/59. Все полученные трансфектанты с единичными заменами в PB2 гене характеризовались резко выраженным снижением размножения в куриных эмбрионах при 39°C (shutoff температура). Последовательное включение дополнительных мутаций в геном вариантов с единичными мутациями приводило к получению двойных мутантов: AAL2 (265+478), AAK2 (265+290) и LAK2 (478+290). Дальнейшая работа в этом направлении позволила получить вариант с тремя ts-мутациями в PB2-гене: U2 (265+290+478).

Таблица 1. Нуклеотидные и аминокислотные замены, включенные с помощью сайт-специфического мутагенеза в PB2-ген вирулентного штамма A/WSN/33 (H1N1)

Исходный вирулентный штамм и трансфектанты	Нуклеотидные замены в указанном триплете и индуцированные аминокислотные замены					
	Позиция 265		Позиция 290		Позиция 478	
	Триплет	Аминокислота	Триплет	Аминокислота	Триплет	Аминокислота
A/WSN/33	AAC	Asn	GUA	Val	GUA	Val
<b>Единичные мутанты</b>						
Тр. №12 А/ЭннАрбор/6/60 (Asn 265 Ser)	AGC	Ser	-	-	-	-
Тр. № 10 А/Краснодар /101/35/59 (Val 290 Leu)	-	-	UUA	Leu	-	-
Тр. №11 А/Ленинград /134/17/57 (Val 478 Leu)	-	-	-	-	UUA	Leu
<b>Двойные мутанты</b>						
Тр. № 13 (LAK2) (290+478)	-	-	UUA	Leu	UUA	Leu
Тр. №14 (AAK2) (265+ 290 )	AGC	Ser	UUA	Leu	-	-
Тр № 15 (AAL2) (265+ 478)	AGC	Ser	-	-	UUA	Leu
<b>Тройной мутант</b>						
Тр. №16 (U2) (265 +290+478)	AGC	Ser	UUA	Leu	UUA	Leu

Получение ХА реассортанта между штаммом А/WSN/33(H1N1) и ХА штаммом-донором А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) проводили по ранее описанной стандартной методике [13]. Инактивацию генно-инженерного штамма А/WSN/33 проводили с помощью УФ-облучения (УФ-лампа G8W T5, Germicidal, 288 nm). В процессе инактивации титр вирусосодержащей жидкости снижался на 5,0 lg. Смешанную инфекцию штаммов А/WSN/33 и А/Краснодар/101/35/59 в куриных эмбрионах проводили при температуре 30°C в течение 18 часов. Далее проводили 2 селективных пассажа в куриных эмбрионах при 25°C в присутствии антисыворотки к штамму А/Краснодар/101/35/59. Полученный реассортант клонировали методом бляшек. Анализ генома ХА реассортанта проводили с помощью ПЦР с использованием дифференцирующих праймеров к штамму А/Краснодар/101/35/59. Были использованы следующие пары праймеров 5'—3': PB2-ген: F2-1 (CCCTGTCCATGTTAGAAACCAAGT), R2-1 (CGCTGAGTTGCCCTAGTAACGA), PB1-ген: F1-1 (AGCACAAGCAGGCAAACCAT), R2-1 (CAATCTGTGTGCTGTGG), PA-ген: F1 (AGCAAAAGCAGGTACTGATC), R2 (TGGATGTGTGTCTTCTCAGA), NP-ген: F4-1 (GCCAGTGGGTACGACTTCGA), R2 (CTGATTTGACCTGCAGAG), M-ген: F1 (AGCAAAAGCAGGTAGATATTG), R2 (TGCAAGATCCCAATGATACTC), NS-ген: F1 (AGCAAAAGCAGGGTGAC), R1 (CCCATTCTCATTACTGCTTC). РЗГА с использованием антисывороток к серотипам Н1 и Н2 показала, что НА-белок ХА реассортанта относится к серотипу Н1 (антисыворотка к Н1- 1:1024, антисыворотка к Н2- 1:20). Секвенирование NA-гена ХА реассортанта показало его принадлежность к серотипу N1.

Вирулентный генно-инженерный штамм г А/WSN/33 (H1N1) был получен с помощью трансфекции из плазмид рНW2000 со вставками генов штамма А/WSN/33

(H1N1), предоставленных доктором Вебстером (Мемфис, США). Для проведения данной работы был также получен холодоадаптированный реассортант путем скрещивания ХА штамма А/Краснодар /101/35/59 (H2N2) и вирулентного штамма вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1). Реассортант унаследовал 6 «внутренних» генов от ХА штамма-донора и 2 гена, кодирующих поверхностные HA и NA-белки от штамма А/WSN/33. При гомологичном контрольном заражении был использован вирулентный штамм А/WSN/33(H1N1). При гетерологичном контрольном заражении использовали штамм А/Утка Пенсильвания/10218/1984(H5N2) вируса гриппа птиц (H5N2), адаптированный к мышам [14].

Все использованные в работе вирусы и сайт-специфические мутанты поддерживали путем пассажей в 10 — 11-дневных куриных эмбрионах. Активность репродукции вирусов гриппа при разной температуре инкубации оценивали по результатам титрования в КЭ, инкубированным при 34°C, 37°C, 38°C, 39°C и выражали в RCT (reproductive capacity at different temperatures).  $RCT_{39} = (\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл при } 34^\circ\text{C} - \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл при } 39^\circ\text{C})$ . Вирусы считались температурочувствительными (ts-фенотип), если RCT<sub>39</sub> был более 5.0 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. Температура, при которой размножение вируса снижалось в 100 раз по сравнению с оптимальной температурой размножения считалось shutoff температурой.

В опытах по трансфекции использовали культуру клеток T293 и линию клеток MDCK, полученную из Института Пастера (Франция). Все клетки выращивались при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Клеточные культуры пассировались на среде MEM (фирма ПанЭко, Москва), содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки и гентамицин в количестве 1 мг на 450 мл среды.

Для генно-инженерных работ со штаммом А/WSN/33 (H1N1) вируса гриппа использовалась 8-плазмидная трансфекционная система на основе вектора рНW2000. Каждая из 8 плазмид содержала соответствующий ген вируса гриппа, фланкированный необходимыми регулируемыми элементами для сборки вируса в клеточной культуре при трансфекции [6]. Плаزمида рНW2000, а также плазмиды со вставками генов штамма вируса гриппа А/WSN/33 были предоставлены доктором Вебстером (Мемфис, США). Для накопления плазмид использовали штамм *Escherichia coli* DH5alpha.

Вирусы накапливали в куриных эмбрионах по стандартной методике. Для последующего выделения РНК вирусы концентрировали центрифугированием. Вначале аллантаоисную жидкость центрифугировали в центрифуге Beckman J2-21 (ротор JA-14) при 6000 об/мин в течение 30 мин для осаждения клеточного дебриса. Вирус осаждали из надосадочной жидкости на высокоскоростной центрифуге Beckman J2-21 с использованием ротора JA-14 (14000 об/мин, 2,5 часа). Осадок вирионов ресуспендировали в буфере STE (10mM Tris-HCL, 100 mM NaCL, 1mM EDTA, pH 7.4) в гомогенизаторе Даунса.

Для последующей постановки ПЦР выделяли вирусную РНК при помощи набора для выделения РНК из плазмы и сыворотки крови (ООО «Лаборатория Изоген», Москва).

Обратную транскрипцию ставили отдельно от ПЦР при помощи ревертазы M-MuLV (СибЭнзим, Новосибирск). ПЦР ставили с высокоточной полимеразой Tersus («Евроген», Москва). Очистку полученных ПЦР-продуктов из легкоплавкой агарозы осуществляли при помощи набора фирмы Fermentas (Thermo Fisher Scientific, США).

Мутагенез РВ2-гена проводился с помощью двуступенчатой ПЦР. На место введения мутации в последовательности гена подбирались прямой и обратный мутационные праймеры с необходимой заменой. Синтез олигонуклеотидов заказывался через компанию Евроген. Для контроля длины ПЦР продукта проводился аналитический фореуз в 1,5% агарозном геле с использованием трис-ацетатного буфера. Для очистки ПЦР продукта использовали Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit (кат. № 0702).

Клонирование проводили с помощью так называемой GoldenGate реакции (web-site: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone0003647>). Использовались рестриктаза Esp3 (BsmB1) (Fermentas / ThermoScientific кат. № ERO451), буфер 10x Fermentas Tango, T4 ДНК лигаза (Сибэнзим, кат. № E319) до 5 ед/мкл, дитиотреитол (ДТТ) до 1мМ, АТФ до 1мМ и линейный вектор со вставкой по 50 нг (молярное соотношение вектор/вставка — 1/3). Реакция проводилась в амплификаторе с программой 15 циклов по 5 минут при 37°C и 5 минут при 17°C.

Трансформацию проводили на рубидиевых компетентных бактериальных клетках штамма DH5a. После разморозки во льду к клеткам добавлялась 1/2 часть лигазной смеси. Далее суспензию клеток инкубировали 1 час во льду, проводили тепловой шок — 2 минуты при 42°C в водяной бане, инкубировали во льду 2 минуты, добавляли среду LB без антибиотика и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Клетки высевались на чашки Петри с 1,5% агаром и средой LB с ампициллином (200 мкг/мл). Чашки Петри инкубировали 16 часов при 37°C. Скрининг клонов проводили при помощи ПЦР с последующим электрофоретическим анализом.

Секвенирование вставок в полученных плаزمидеях проводилось фирмой «Евроген» на автоматическом секвенаторе MegaBACE-500.

Трансфекцию проводили при помощи реагента Lipofectamine LTX (Invitrogen) либо в кокультуре клеток 293Т и MDCK, либо в однодневном монослое клеток 293Т (плотность клеточного монослоя около 70%).

Изучение att-фенотипа проводили по следующей методике: группы самок мышей (по пять голов на группу) инфицировали интраназально под легким эфирным наркозом анализируемыми вирусами с инфекционным титром  $10^{4.5}$  ЭИД<sub>50</sub> (в дозе 50 мкл на мышь). Через 72 часа мышей усыпляли и извлекали легочную ткань. Из легочной ткани готовили 10% суспензию в ступках с тертым стеклом. Инфекционный титр вируса в 10 % суспензии легких определяли в куриных эмбрионах и выражали в lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. Все реассортанты были исследованы в трех независимых опытах.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием среднего квадратичного отклонения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы было проведено сравнительное исследование ts-фенотипа ХА реассортанта А/Краснодар/101/35/59 x А/WSN/33 и вариантов штамма А/WSN/33, имеющих сайт-специфические мутации в PB2-гене. Как видно из табл. 2, родительские варианты: ХА штамм—донор А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и вирулентный штамм А/WSN/33 (H1N1) значительно различались по ts-фенотипу. Штамм А/WSN/33 активно размножался в куриных эмбрионах как при 34°C, так и при 38°-39°C. При 39°C штамм А/WSN/33 крайне незначительно снижал репродуктивную активность. ХА штамм А/Краснодар/101/35/59 активно реплицировался в куриных эмбрионах при 34°C, однако резко снижал темпы репродукции при 38°C и 39°C. ХА реассортант, полученный при скрещивании этих родительских вариантов, унаследовал от ХА штамма-донора высокую репродуктивную активность и, в отличие от штамма А/WSN/33, неспособность к активному размножению при 38°C и 39°C. Все полученные сайт-специфические мутанты с единичными аминокислотными заменами в PB2-белке заметно снизили способность к размножению в куриных эмбрионах при 39°C. Включение дополнительных ts-мутаций в PB2-ген штамма А/WSN/33 приводило к получению двойных мутантов, которые характеризовались дальнейшим изменением ts-фенотипа. Все двойные мутанты утратили способность к размножению в куриных эмбрионах при 39°C, и было отмечено снижение способности двойных мутантов к размножению в куриных эмбрионах при 38° С (shutoff температура снизилась до 38°C). Наиболее выраженное изменение ts-фенотипа наблюдалось у трансфектанта U2 с тремя ts-мутациями в геноме. Shutoff температура данного вируса приблизилась к 37°C.

Таблица 2. Сравнительное изучение ts-фенотипа и att-фенотипа сайт-специфических мутантов штамма А/WSN/33(H1N1), имеющих мутации в PB2-гене и ХА реассортанта, полученного при скрещивании ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и штамма А/ WSN/33 (H1N1)

Исследуемые вирусные варианты	Титр вирусосодержащей жидкости в куриных эмбрионах (lg ЭИД <sub>50</sub> /0,2 мл)			Титр вируса в легких мышей (lg ЭИД <sub>50</sub> / 0,2 мл)
	34° С	38° С	39° С	
А/WSN/33(H1N1)	6,5±0,5	6,5±0,4	6,25±0,4	5,0±0,4
А/Краснодар/101/35/59 (H2N2)	8,0±0,4	4,0±0,5	1,5±0,4	1,5±0,5
ХА реассортант А/Краснодар /101/35/59 х А/WSN/33	8,0±0,5	4,0±1,0	1,5±0,4	1,5±0,5
Тр. № 10 PB2 А/Краснодар/101/35/59 (Val 290 Leu)	6,5±0,5	5,0±1,0	4,0±0,5	3,0±0,4
Тр. № 11 PB2 А/ Ленинград/134/17/57 (Val 478 Leu)	5,5±0,4	4,0±1,0	2,5±0,5	3,0±0,5
Тр. № 12 PB2 А/ Энн Арбор/6/60 (Asn 265 Ser )	7,0±0,6	4,5±1,0	3,5±1,0	2,5±0,5
Тр. № 13 (LAK2) PB2 А/Краснодар/101/35/59 (Val 290 Leu) + А/Ленинград /134/17/57 ( Val 478 Leu )	7,0±1,0	3,5±0,5	<1,0	< 10 <sup>1,0</sup>
Тр.№ 14 (AAK2) PB2 А/Энн Арбор/6/60 (Asn 265 Ser) + А/Краснодар /101/35/59 ( Val 290 Leu)	6,5±0,5	3,5±0,4	< 1,0	< 10 <sup>1,0</sup>
Тр. № 15 (AAL2) PB2 А/Энн Арбор/6/60 (Asn 265 Ser )+ А/Ленинград /134/17/57 ( Val 478 Leu )	6,75±0,4	3,5±1,0	< 1,0	< 10 <sup>1,0</sup>
Тр. № 16 (U2) PB2 А/Энн Арбор/6/60 (Asn 265 Ser) + А/Краснодар / 101/35/59 (Val 290 Leu ) + А/Ленинград/ 134/17/57 ( Val 478 Leu )	6,25±0,6	2,25±0,5	< 1,0	< 10 <sup>1,0</sup>

Исходный вирулентный штамм А/WSN/33 активно размножался в легких мышей при интраназальном размножении. Через 72 часа после начала инфекции титр вируса в легких равнялся lg 5,0±0,4, ЭИД<sub>50</sub>/0,2мл. ХА штамм-донор А/Краснодар/101/35/59 практически утерьял способность к размножению в легких мышей. ХА реассортант, полученный при скрещивании штамма А/WSN/33 и ХА штамма А/Краснодар/101/35/59, не отличался от ХА штамма-донора по att-фенотипу. Трансфектанты с включением единичных мутаций в PB2-гене характеризовались заметным снижением размножения вируса в легких (табл. 2), в отличие от исходного вирулентного штамма. Трансфектанты с двойными мутациями в PB2-гене (AAL2, AAK2, LAK2), а также трансфектант U2 утерьяли способность к размножению в легких мышей.

Группы мышей были интраназально иммунизированы двукратно дозой 10<sup>4,0</sup> ЭИД<sub>50</sub> трансфектантами U2, LAK2, AAL2, AAK2, трансфектантом №20 (V478L) и ХА реассортантом А/Краснодар/101/35/59 х А/WSN/33. Мышам контрольной группы двукратно интраназально вводили физраствор. Через 10 дней после второй имму-

низации у мышей брали кровь и определяли титр антител, ингибирующих гемагглютинацию. Анализируемые вирусы индуцировали у иммунизированных мышей различный уровень гуморальных антител. Наиболее высокие титры антител наблюдались в крови мышей, иммунизированных трансфектантами LAK2, AAK2, U2 и ХА реассортантом ( $\log_2$  7,61±0,87; 7,65±0,54; 7,55±0,54; 8,05±0,61). Трансфектант №11 (V478L) и AAL2 индуцировали более умеренный титр гуморальных антител ( $\log_2$  7,05±0,5; 6,85±0,44). На следующем этапе через 10 дней после второй иммунизации мыши были инфицированы интраназально 10 МЛД<sub>50</sub> (10<sup>3.0</sup> ЭИД<sub>50</sub>) штамма А/WSN/33. Через 72 часа у мышей были извлечены легкие и было исследовано размножение вируса в легких у мышей, иммунизированных анализируемыми вирусами. У неиммунизированных мышей из контрольной группы титр размножения вирулентного вируса достигал 4,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. У мышей, иммунизированных ХА реассортантом, наблюдалось полное подавление размножения вируса в легких. Аналогичный результат наблюдался во всех группах мышей, иммунизированных сайт-специфическими мутантами штамма А/WSN/33.

Представляло интерес провести сравнительное исследование защитной эффективности полученных нами сайт-специфических мутантов штамма А/WSN/33 и классического ХА реассортанта против вируса гриппа другого серотипа. С этой целью группы мышей, иммунизированных вышеупомянутыми вирусами, и мыши контрольной группы через 10 дней после второй иммунизации были интраназально инфицированы штаммом А/Утка/ Пенсильвания/ 10218/ 1984/ вируса гриппа птиц (H5N2), адаптированного к мышам [14]. Инфицирующая доза составляла 10 МЛД<sub>50</sub> (10<sup>3.0</sup> ЭИД<sub>50</sub>). У части мышей из каждой группы была исследована сыворотка крови на наличие антител к вирусу птичьего гриппа серотипа H5N2. Как видно из табл. 3, у иммунизированных мышей и мышей из контрольной группы не были обнаружены антитела к вирусу гриппа птиц H5N2. Интраназальное инфицирование мышей контрольной группы вирусом птичьего гриппа вызывала 100% летальность на 8-9 сутки после инфицирования; 50% летальность наблюдалась в группе мышей, иммунизированных трансфектантом № 11, имеющим в PB2-белке мутацию Val 478 Leu; 25% летальность была отмечена в группе мышей, иммунизированных трансфектантом AAL2, имеющим 2 мутации в PB2-белке (265+478). Остальные 4 группы мышей, иммунизированных мутантами U2, LAK2, AAK2 и ХА-реассортантом, характеризовались 100% выживаемостью. Мы исследовали интенсивность размножения вируса птичьего гриппа H5N2 в легких мышей каждой группы. Как видно из табл. 3, наибольшая интенсивность размножения наблюдалась в легких мышей контрольной группы: 10<sup>4.5</sup> ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл. Однако в легких мышей из других групп мы наблюдали довольно значительное размножение вируса (табл. 3). С учетом полного отсутствия антител к вирусу гриппа птиц в крови иммунизированных животных высокую выживаемость мышей можно было объяснить только индуцированной активностью клеточного иммунитета.

Анализ распределения мутаций в геноме ХА штаммов-доноров аттенуации вируса гриппа свидетельствовал о том, что наиболее важные мутационные замены сосредоточены в белках полимеразного комплекса: PB1, PB2, PA. Однако эффективность прямого включения аттенуирующих мутаций в гены, кодирующие белки полимеразного комплекса, различна. Это обусловлено структурно-функциональными свойствами этих белков. Белок PB2 обладает высокой пластичностью, и это позволяет включить в этот белок различное количество мутаций. Последнее обстоятельство дает возможность сохранять баланс между требуемым уровнем аттенуации и высокой иммуногенностью.

Включение в PB2-ген штамма А/WSN/33 единичных мутаций из генома ХА-штаммов доноров аттенуации приводило незначительным изменениям ts-фенотипа и att-фенотипа. Однако при увеличении количества включенных в PB2-ген ts-мутаций, полученные мутанты полностью утратили способность к репликации при повышенной температуре и размножению в легких мышей при интраназальном заражении. Интраназальная иммунизация мышей полученными сайт-специфически-

Таблица 3. Сравнительное изучение защитной эффективности ХА реассортанта и вариантов штамма А/WSN/33 вируса гриппа, содержащих сайт-специфические мутации в PB2 гене при контрольном гетерологичном заражении

Варианты штамма А/WSN/33 вируса гриппа, использованные для иммунизации	Титр антител к штамму А/Утка/Пенсильвания/10218/1984 вируса гриппа птиц (H5N2) в РЗГА	Титр штамма А/Утка/Пенсильвания/10218/1984 (H5N2) вируса гриппа птиц в легких мышей (lg ЭИД <sub>50</sub> /0,2 мл)	% гибели мышей после контрольного гетерологичного заражения
ХА реассортант А/WSN/33 х А/Краснодар/101/35/59	< 1: 20	2,74±0,70	0
Тр.№13 LAK2 (290+378)	< 1:20	1,73±0,56	0
Тр.№15 AAL 2 (265+478)	< 1:20	3,24±0,78	25
Тр.№14 AAK 2 (265+290)	< 1:20	3,21± 0,64	0
Тр.№16 U 2 (265+290+478)	< 1:20	2,24±0,48	0
Тр. № 11 PB2 А/Ленинград/134/17/57 (Val 478 Leu)	< 1: 20	2,32± 0,25	50
Неиммунные мыши	< 1: 20	4,54± 1,1	100

ми мутантами индуцировала заметный титр гуморальных антител, ингибирующих гемагглютинацию. Большинство сайт-специфических мутантов с двумя и тремя мутациями в PB2-гене не уступало по защитной эффективности ХА-реассортанту, имеющему поверхностные антигены, аналогичные поверхностным антигенам штамма А/WSN/33 как при гомологичном, так и гетерологичном контрольном заражении. Важнейшим условием дальнейшего изучения и практического использования полученных мутантов является анализ их генетической стабильности. Данные, полученные Parkin N. et al. и Subbarao E.K. et al. [12, 18] указывают на важность определенного количества мутаций в PB2-гене, гарантирующего отсутствие реверсий к дикому типу. Дальнейшие усилия нашей лаборатории будут сосредоточены на этом направлении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. Санкт-Петербург, Наука, 1994.
2. Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Цфасман Т.М. и др. Новые холодоадаптированные штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа. *Вопр. вирусол.* 2013, 58:11-17.
3. Cox N.J., Kitame F., Kendal A.P. et al. Identification of sequence changes in the cold-adapted, live attenuated influenza vaccine strain A/Ann Arbor/6/60 (H2N2). *Virology.* 1988, 167:554-567.
4. Cox A., Dewhurst S. A single mutation at PB1 residue 319 dramatically increases the safety of PR8 live attenuated influenza vaccine in a murine model without compromising vaccine efficacy. *J. Virol.* 2015, 90 (5):2702-2705.
5. Herlocher M.L., Maassab H.F., Webster R.G. Molecular and biological changes in the cold-adapted «master strain» A/ AA/6/60 (H2N2) influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993, 90:6032-6036.
6. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y. et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, 97(11):6108-6113.
7. Jin H., Zhou H., Lu B. et al. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J. Virol.* 2004, 78 (2):995-998.
8. Klimov A.I., Cox N.J., Yotov W. et al. Sequence changes in the live attenuated, cold-adapted variant of influenza A/Leningrad/134/57 (H2N2) virus. *Virology.* 1992, 186(2):795-797.
9. Lawson C.M., Subbarao E.K., Murphy B.R. Nucleotide sequences changes in the polymerase basic protein 2 gene of temperature-sensitive mutants of influenza A virus. *Virology.* 1992, 191:506-510.

10. Maassab H. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C. *Nature*. 1967, 213:612-614.
11. McCauley J.W., Penn C.R. The critical cut-off temperature of avian influenza viruses. *Virus Res*. 1990, 17:191-198.
12. Parkin N., Chiu P., Coelingh K. Genetically engineering live attenuated influenza A virus vaccine candidates. *J. Virol*. 1997, 71(4):2772-2778.
13. Polshaev F.I. The conditions of influenza virus ts-recombinants development. *Acta virologica*. 1978, 22:263-269.
14. Smirnov Y.A. et al. Characterization of adaptation of an avian influenza A (H5N2) virus to mammalian host. *Acta virologica*. 2000, 44(1):1-8.
15. Snyder M. H., Betts R.F., De Borde D. et al. Four viral genes independently contribute to attenuation of live influenza A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines. *J. Virol*. 1988, 62:488-495.
16. Solorzano A., Li Yo., Perez D.R. Alternative live —attenuated influenza vaccines based on modification in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virol*. 2010, 84(9):4587-4596.
17. Song H., Nieto G., Perez D. A new generation of modified live-attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J. Virol*. 2007, 81(17):9238-9248.
18. Subbarao E.K., Park E., Lawson C. et al. Sequential addition of temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design of a genetically engineered live influenza A virus vaccine. *J. Virol*. 1995, 69(10):59-69.
19. Yamanaka K., Ogasawara N., Ueda M. et al. Characterization of a temperature —sensitive mutant in the RNA polymerase PB2 subunit gene of influenza A/WSN/33 virus. *Arch. Virol*. 1990, 114:65-73.
20. Zhou B., Li Yo., Speer S. et al. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine*. 2012, 30(24):3691-3702.

*Поступила 20.07.18*

Контактная информация: Маркушин Станислав Георгиевич,  
109044, Москва, 1 Дубровская ул., 15, р.т. (495)674-02-47

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Д.В.Ефременко, Н.Ф.Василенко, В.И.Ефременко*

## **БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ: ОЦЕНКА ВНЕШНЕЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ УГРОЗЫ**

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

В статье обосновывается разделение инфекций на представляющие индивидуальную и популяционную опасность с учетом территориального и сезонного риска распространения при их заносе и дифференциация последних по угрозе возникновения чрезвычайной ситуации биологического характера при эпидемических проявлениях, что позволит оптимизировать алгоритмы реагирования и организации противоэпидемических мероприятий. Предложен новый относительный критерий «ориентирное число заражений от одного источника», отражающий потенциальную способность возбудителя передаваться внутри человеческой популяции. Проведена оценка риска распространения и угрозы возникновения чрезвычайной ситуации при заносе на территорию Российской Федерации некоторых представляющих популяционную опасность болезней: чумы (в легочной и бубонной форме), холеры, геморрагических лихорадок с ведущим контактным механизмом передачи возбудителя, особо опасных ортопоксвирусных и коронавирусных инфекций, Крымской геморрагической лихорадки, полиомиелита.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 76—82

Ключевые слова: эпидемиологическая угроза, занос инфекции, риск распространения инфекции, особо опасные инфекции, чрезвычайная ситуация, биологическая безопасность, массовые мероприятия

## **BIOLOGICAL SAFETY OF PUBLIC EVENTS: ASSESSMENT OF EXTERNAL EPIDEMIOLOGICAL THREAT**

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

Division of infections into the constituting individual and population danger taking into account the territorial and seasonal risks of distribution at their drift is proved in article and the differentiation of the last on threat of emergence of emergency situation of biological character at epidemic manifestations that will allow to optimize algorithms of reaction and the organization of antiepidemic actions. The new relative criterion «orient number of infections from one source» reflecting potential ability of the activator to be transferred in human population is offered. Assessment of risk of distribution and threat of emergence of emergency situation at the drift on the territory of the Russian Federation of some diseases constituting population danger is carried out: plagues (in pulmonary and bubonic forms), cholera, hemorrhagic fevers with the leading contact mechanism of transfer of the activator, especially dangerous the ortopoxvirus and the coronavirus of infections, the Crimean hemorrhagic fever, poliomyelitis.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 76–82

Key words: epidemiological threat, infection drift, risk of spread of an infection, especially dangerous infections, emergency situation, biological safety, public events

Эндемичность инфекционных болезней определяется природными и социальными условиями, характерными для местности, оказывающими непосредственное и опосредованное воздействие на развитие эпидемического процесса. Причем циркуляция возбудителей истинных (природных) эндемий в большей степени зависит от природного фактора, тогда как статистических (убиквитарных) эндемий — от социального фактора. Влиянием климатогеографических условий объясняется увеличение разнообразия живых систем и нозоформ инфекционных болезней по мере приближения к экватору. Отдельные инфекции имеют широкое распространение в соответствии с ареалом обитания их носителей и переносчиков, другие локализуются на небольших территориях, где поддерживаются благоприятные условия для обращения паразитарных систем, и редко выходят за пределы эволюционно сложившейся экологической ниши. Вариативность проявления эпидемического процесса по интенсивности и времени также велика [1 — 3, 10].

Однако существует множество примеров экспансии инфекционных болезней на новые территории, за пределы биоценотических структур, частью которых являются их возбудители, и устойчивого занятия ими новых пространственных ниш. Так, крупнейшая вспышка болезни, вызванной вирусом Эбола, произошла впервые в Западной Африке в 2014–2016 гг. До этого вспышечная и спорадическая заболеваемость регистрировалась прежде всего в отдаленных деревнях Центральной Африки, на территориях, занимаемых влажными тропическими лесами. Однако в данном случае эпидемический процесс с передачей возбудителя развивался и в сельской местности, и в крупных городах, где нет обильной растительности. Столь быстрое распространение инфекции в новых районах было связано с благоприятствующими социальными условиями, в том числе культурно-бытовыми традициями местного населения, низким уровнем санитарно-гигиенической грамотности, особенностями ухода за больными и похоронных обрядов, а также неготовностью медицинской и профилактической служб региона [8]. Самая значительная вспышка лихорадки Зика за всю историю началась в апреле 2015 г. в Бразилии, где ранее регистрировалась только спорадическая заболеваемость, однако имелись необходимые природные условия — существовал ареал обитания биологического переносчика вируса Зика комаров рода *Aedes*, а среднесуточные значения температуры воздуха и показатели влажности в течение большей части года способствовали накоплению возбудителя в слюнных железах «векторов». К 2016 г. инфекция охватила значительные территории Южной и Центральной Америки, на которых наблюдалась местная передача вируса.

Заносные случаи, связанные с посещением районов неблагополучных по лихорадке Зика, выявлялись по всему миру [9]. Таким образом, занос инфекции, в том числе экзотической для местности, с последующей передачей патогена среди населения представляет реальную эпидемиологическую угрозу. Увеличение туристских потоков, внутренних и международных, которым характеризуются, в частности, массовые мероприятия, только способствует возрастанию риска [5].

В контексте обеспечения биологической безопасности и профилактики чрезвычайных ситуаций (ЧС) биологического характера определяющее значение имеет потенциальная способность и вероятность распространения инфекции на соответствующей местности, что может приводить к спорадической, вспышечной заболеваемости, формированию множественных очагов. Региональные факторы риска существенно отличаются как в целом по всему миру, так и в Российской Федерации, при отсутствии условий для устойчивой передачи возбудителя отдельные заносные случаи, в том числе особо опасных инфекций (ООИ), не представляют угрозу для населения и не должны оцениваться как ЧС [4, 6]. Градация нозологических форм по риску распространения для определенной территории и времени года необходима, наряду с оперативной диагностикой они являются залогом организации адекватных противоэпидемических мероприятий без избыточных мер, что приобретает особое значение в период массовых мероприятий, когда любая нестандартная ситуация может привести к репутационным издержкам для страны-организатора.

Цель работы — разработать универсальный научно обоснованный подход дифференциации опасных инфекций на основе риска распространения и потенциальной угрозы возникновения ЧС биологического характера при их заносе с других территорий.

Антропонозы в большинстве своем имеют повсеместное распространение. На интенсивность проявления эпидемического процесса влияют условия, характеризующие определенный социум (санитарно-гигиенические, культурно-бытовые, уровень охвата населения вакцинацией и т.д.). Именно мероприятия по улучшению среды обитания человека находятся в основе деятельности по искоренению ряда нозологических форм болезней на отдельных территориях и в мире в целом. Так, например, благодаря успешной глобальной кампании по иммунизации населения, в 1980 г. было объявлено о ликвидации натуральной оспы. В ближайшие годы планируется полностью ликвидировать такие иммуноуправляемые инфекции как корь и полиомиелит. Высокие санитарно-гигиенические стандарты в развитых странах позволили снизить заболеваемость брюшным тифом до спорадических (обычно заносных) случаев. Но на отдельных территориях эти инфекции остаются эндемичными, а значит сохраняется риск их заноса в благополучные районы. Это же касается и истинных эндемий, к которым относятся зооантропонозы, но в отличие от антропонозных болезней потенциал к распространению в человеческой популяции (передачи возбудителя от человека к человеку) у них определяется совокупностью природных и социальных условий, а также может зависеть от формы заболевания (например, чума в легочной форме имеет гораздо больший потенциал для распространения, чем чума в бубонной форме). Для трансмиссивных инфекций в этом отношении решающее значение имеет природный фактор — наличие «векторов» и климатические условия. Больные зоонозами и сапронозами не представляют серьезной опасности для окружающих, так как исключена или крайне мала (для некоторых нозологий) вероятность передачи возбудителя от человека к человеку.

Таким образом, в соответствии с риском распространения инфекции целесообразно подразделить на представляющие индивидуальную и популяционную опасности. При этом имеющиеся региональные отличия по факторам эпидемического процесса определяют актуальность субъектного подхода на основании территориального риска, однако можно выделить и тенденции общероссийского масштаба. В частности, экзотические арбовирусные лихорадки — желтая, денге,

Зика, Чикунгунья, Рифт-Валли, как и некоторые другие трансмиссивные болезни вирусной, бактериальной и паразитарной этиологии, в настоящее время имеют практически нулевой потенциал распространения на всей территории Российской Федерации, соответственно они представляют только индивидуальную опасность, и маловероятно, что отдельные или даже множественные случаи их заноса могут привести к ЧС биологического характера. Для минимизации риска в отношении этих инфекций необходим тщательный контроль сотрудниками санитарно-карантинных пунктов пропуска транспортного судна, на котором прибыл больной, на наличие переносчиков. Здесь, безусловно, речь идет только о естественном заносе инфекций, и не рассматривается возможность злоумышленных действий террористической направленности, например, таких как применение зараженных переносчиков.

Сезонный фактор и наличие необходимых биотических элементов имеют определяющее значение для перспектив распространения не только заносных, но и местных трансмиссивных инфекций. К нозологиям, представляющим вне зависимости от территории и времени года популяционную опасность, относятся болезни, возбудители которых могут передаваться от человека к человеку посредством аэрогенного, фекально-орального, контактного и гемоконтактного механизмов. При этом более высоким эпидемическим потенциалом обладают патогены, к которым у людей имеется высокая естественная восприимчивость, с воздушно-капельным, пищевым и водным путями передачи [4]. Угроза возникновения ЧС больше при возникновении вспышек ООИ, имеющих высокую контагиозность.

Для ранжирования инфекций, представляющих популяционную опасность, по риску распространения предлагается использовать критерий «ориентирное число заражений от одного источника». Он отражает только потенциальную способность возбудителя передаваться внутри человеческой популяции, являясь величиной относительной, а не абсолютной. В таблице представлена дифференцировка по риску распространения и угрозе возникновения ЧС при заносе некоторых нозологических форм, возбудители которых обладают межтерриториальным и всесезонным эпидемическим потенциалом.

Таким образом, максимальную опасность для населения, а при организации массового мероприятия для его дальнейшего проведения вне зависимости от времени года и места представляет возможный занос натуральной оспы в случае «возвращения» этой болезни, чумы в легочной форме и ТОРС, то есть ООИ с аэрогенным механизмом передачи. Холера характеризуется высокими риском распространения при заносе и угрозой возникновения ЧС биологического характера. Полиомиелит, несмотря на высокую контагиозность инфекции, на тех территориях, где процент охвата детей профилактическими прививками не снижает нормативы ВОЗ, что в соответствии с официальной информацией характерно для всех субъектов Российской Федерации, не имеет такого потенциала для распространения. В контексте массовых мероприятий это связано также с тем, что детский контингент в возрастной группе наиболее подверженной инфицированию составляет, как правило, небольшую долю посетителей. Однако в случае снижения иммунной прослойки, а в последние годы отмечается негативный тренд необоснованного отказа от вакцинации, прибытия в регион детей из стран с низким показателем охвата прививками против полиомиелита, что наблюдается в ряде государств постсоветского пространства, эпидемиологические угрозы по инфекции для субъектов Российской Федерации возрастут. В настоящее время эндемическая передача вируса полиомиелита продолжается в Пакистане, Афганистане и Нигерии [7]. Геморрагические лихорадки с ведущим контактным механизмом передачи, возбудители которых относятся к фило- и аренавирусам, имеют средний риск распространения. Однако лихорадки Эбола и Марбург из-за тяжести клинического течения и неблагоприятного прогноза в случае заболевания представляют высокую угрозу формирования условий для возникновения ЧС. Больные оспой обезьян, БВРС, бубонной формой чумы и КГЛ опасны в основном

**Оценка угрозы возникновения ЧС биологического характера при заносе на территорию Российской Федерации некоторых опасных инфекций, представляющих популяционную опасность**

Нозологическая форма	Риск распространения инфекции	«Ориентирное число заражений от одного источника» (потенциал)	Контингенты риска	Угроза ЧС биологического характера	
Чума (легочная форма)	высокий	более 5	Лица, имевшие контакт с больным	максимальная	
Чума (бубонная форма)	низкий	1	Лица, имевшие тесный контакт с больным, его одеждой; медицинский персонал	низкая	
Холера	высокий	более 5	Лица, имевшие прямой или непрямой контакт с инфицированным; лица, не имевшие контакта с инфицированным, пользовавшиеся одним туалетом, купавшиеся в естественных водоемах поблизости от выхода сточных вод (летний сезон)	высокая	
Геморрагические лихорадки	Эбола	средний	2-5	Лица, имевшие тесный контакт с больным, его одеждой; медицинский персонал	высокая
	Марбург				
	Ласса				средняя
	Аргентинская				
	Боливийская				
	Венесуэльская				
Бразильская					
Натуральная оспа	высокий	более 5	Непривитые лица, имевшие контакт с больным	максимальная	
Оспа обезьян	низкий	1	Лица, имевшие тесный контакт с больным; медицинский персонал	низкая	
Тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС)	высокий	более 5	Лица, имевшие контакт с больным	максимальная	
Ближневосточный респираторный синдром (БВРС)	низкий	1	Лица, имевшие тесный контакт с больным; медицинский персонал	низкая	
Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ)	средний	2-5	Медицинский персонал	низкая	
Полиомиелит	средний *	более 5	Непривитые дети (в основном до 5 лет), имевшие прямой или непрямой контакт с инфицированным	средняя *	

Примечание. \* С учетом высокой иммунной прослойки населения Российской Федерации к полиомиелиту.

для членов семьи и медицинского персонала, возможность развития ЧС при заносе данных нозологий невелика. Вероятность передачи от человека к человеку не эндемичных на определенной территории ООИ, не вошедших в таблицу, отсутствует полностью, является гипотетической или минимальной. Соответствующий потенциал инфекций необходимо учитывать при организации работы санитарно-карантинных пунктов пропуска, лечебно-профилактических организаций и обеспечении противоэпидемических мероприятий, в том числе в отношении контактных лиц, в случае осложнения эпидемиологической обстановки.

Таким же образом можно провести дифференцировку представляющих популяционную опасность болезней, возбудители которых не входят в группу ООИ. При этом, даже несмотря на высокий риск распространения отдельных нозологий (как правило, в определенное время года), угроза возникновения ЧС биологического характера будет оставаться низкой (ЧС возможна только при реализации самых неблагоприятных сценариев эпидемической заболеваемости), а для большинства из них минимальной. Однако занос и дальнейшее распространение этих инфекций могут привести к общему ухудшению санитарно-эпидемиологической обстановки, способствовать эпидемиологическому неблагополучию на определенной территории.

В оценке эпидемического потенциала возбудителей эндемий (истинных и статистических) в большинстве случаев решающее значение имеет сезонный фактор, то есть в разные времена года региональный риск по эндемичным инфекциям будет различаться.

При проведении массовых международных мероприятий дифференциацию инфекций по риску распространения и потенциальной способности вызывать ЧС биологического характера целесообразно отражать в документах, регламентирующих санитарно-противоэпидемическое обеспечение. Необходимо учитывать территориальный и сезонный факторы и с целью анализа (оценки и управления) риска — качественную и количественную географию участников мероприятия. Наибольшей эпидемиологической опасностью характеризуются длительные (не менее одной недели) массовые события с равномерной географической представленностью, когда спектр возможных заносных нозоформ максимально широкий, а в эпидемический процесс способно быть вовлечено большое количество людей с реализацией вторичной и последующей передачи возбудителя инфекции. В этом случае могут быть созданы условия для формирования ЧС в области здравоохранения международного значения.

Разделение инфекций на представляющих индивидуальную и популяционную опасность на основании территориального и сезонного риска распространения и дифференциация последних по угрозе возникновения ЧС биологического характера при эпидемических проявлениях позволят оптимизировать алгоритмы реагирования и организацию противоэпидемических мероприятий, в первую очередь, в отношении экзотических опасных инфекций.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков В.Д. Эпидемический процесс (теория и метод изучения). Л., Медицина, 1964.
2. Беляков В.Д., Яфаев В.Д. Эпидемиология. М., Медицина, 1989.
3. Громашевский Л.В. Общая эпидемиология. М., Медицина, 1965.
4. Ефременко Д.В. Биологическая безопасность массовых мероприятий: особенности лабораторной диагностики. Журн. микробиол. 2018, 1:45-52.
5. Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Оробей В.Г., Ефременко А.А., Дубянский В.М., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Семенко О.В. Применение риск-ориентированного подхода при планировании и организации противоэпидемического обеспечения массовых мероприятий. Анализ риска здоровью. 2017, 1:4-12.
6. Ефременко Д.В., Малецкая О.В., Оробей В.Г., Ефременко В.И. Биологическая безопасность массовых мероприятий: актуальные вопросы и принципы. Журн. микробиол. 2017, 5:10-17.
7. Информационная бюллетень ВОЗ. Полиомиелит (14.03.2018.). URL: <http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/полиомиелит>.

8. Малеев В.В., Tolno F., Kononou K.V., Sow T.I., Ицков Я.Ю., Демина Ю.В., Левковский А.Е., Коломоец Е.В., Ковалев Г.А., Хорошилов В.Ю., Омариев З.М. Эпидемиологические и клинические особенности болезни, вызванной вирусом Эбола, в Гвинейской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2015, 3:27-32.
9. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков А.В., Викторов Д.В., Смелянский В.П., Жуков К.В., Бородай Н.В., Шпак И.М., Куличенко А.Н., Михеев В.Н., Шипулин А.Г. Лихорадка Зика: состояние проблемы на современном этапе. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2016, 1:5-12.
10. Природноочаговые болезни человека. Под ред. Е.Н. Павловского. М., Медгиз, 1960.

Поступила 22.07.18

Контактная информация: Ефременко Дмитрий Витальевич, к.м.н.,  
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Т.П.Иванюшко<sup>1</sup>, К.А.Поляков<sup>1</sup>, М.А.Кунижева<sup>1</sup>, С.Ю.Иванов<sup>1</sup>, Д.Д.Абрамов<sup>2</sup>*

## **ОЦЕНКА КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА МИКРОБИОТЫ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ У БОЛЬНЫХ С МЕДИКАМЕНТОЗНЫМ ОСТЕОНЕКРОЗОМ ЧЕЛЮСТИ**

<sup>1</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, <sup>2</sup>ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

*Цель.* Определение качественного и количественного состава микробиоты ротовой полости у больных медикаментозным остеонекрозом челюсти (МОЧ). *Материалы и методы.* Оценку микробиоты проводили у 15 больных МОЧ. Была проведена оценка 12 групп факультативно- и облигатно-анаэробных микроорганизмов. Оценку качественного и количественного состава микробиоты ротовой полости у больных проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). *Результаты.* Определены показатели состава аэробно-анаэробной микробиоты у больных МОЧ в ротовой жидкости и отделяемом из свища. Показатели общей бактериальной массы (ОБМ) и всех анаэробных микроорганизмов в ротовой жидкости у больных до лечения были выше на 1-3 порядка, чем у здоровых лиц. В зоне некроза челюсти эти показатели были выше на 2-4 порядка, чем в ротовой жидкости. До оперативного вмешательства был проведен курс антибактериальной терапии в течение 7 дней. Применение цефазолина было более эффективно, чем линкомицина. Через 1 год после хирургического лечения показатель ОБМ и показатели анаэробных микроорганизмов не отличались от показателей у здоровых лиц. *Заключение.* У больных медикаментозным остеонекрозом челюсти выявлен высокий уровень анаэробных патогенов в микробиоте полости рта. Курс антибактериальной терапии и хирургическое вмешательство являются эффективными методами лечения МОЧ, так как приводят к эффективной санации и позволяют в дальнейшем провести эндопротезирование.

*Журн. микробиол.*, 2019, № 2, С. 82—87

Ключевые слова: медикаментозный остеонекроз челюсти, условно патогенные микроорганизмы полости рта, ПЦР-РВ, хирургическое лечение

*Т.П.Ivanyushko<sup>1</sup>, К.А.Polyakov<sup>1</sup>, М.А.Kunizheva<sup>1</sup>, S.Yu.Ivanov<sup>1</sup>, D.D.Abramov<sup>2</sup>*

## **EVALUATION OF THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE COMPOSITION OF ORAL MICROBIOTA IN PATIENTS WITH MEDIAL OSTEONECROSIS OF THE JAW**

<sup>1</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, <sup>2</sup>«NPF DNK-Technologiya», Moscow, Russia

*Aim.* To determine the qualitative and quantitative composition of the oral microbiota in patients with medial osteonecrosis of the jaw (MOJ). *Materials and methods.* Microbiota was evaluated in 15 patients with

medial osteonecrosis of the jaw. An assessment was made of 12 groups of optional and obligate-anaerobic microorganisms. Evaluation of the qualitative and quantitative composition of oral microbiota in patients with MOJ was performed by real-time polymerase chain reaction (PCR-RT). *Results.* The aerobic-anaerobic microbiota composition in patients with MOJ in the oral fluid and separated from the fistula is presented. The values of the total bacterial mass (TBM) and all anaerobic microorganisms in the oral fluid in patients with MOJ before treatment were higher by 1-3 orders of magnitude than in healthy individuals. In the jaw, separated from the fistula in the zone of necrosis of the jaw, these parameters were higher by 2-4 orders than in the oral fluid. Prior to surgery, a course of antibiotic therapy was conducted for 7 days. As a result of the therapy, the parameters of anaerobic microflora in the oral fluid decreased. The use of cefazolin was more effective than lincomycin. In 1 year after surgical treatment, the index of TBM and the indices of anaerobic microorganisms did not differ from those of healthy individuals. *Conclusion.* Patients with medical osteonecrosis of the jaw have a high level of anaerobic pathogens in the oral microbiota. The course of antibiotic therapy and surgical intervention are effective methods of treatment of MOJ, as they lead to effective sanitation, and allow further endoprosthetics.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 82–87

Key words: medical osteonecrosis of the jaw, conditionally pathogenic microorganisms of the oral cavity, PCR-RT, surgical treatment

## ВВЕДЕНИЕ

Остеонекроз челюсти представляет собой патологическое состояние, связанное с побочной реакцией на определенные лекарства, такие как бисфосфонаты и деносумаб, используемые для лечения рака и остеопороза [9]. Бисфосфонаты ингибируют остеокласт-опосредованную резорбцию кости, изменяя метаболизм костей. Существует большая проблема по поводу увеличения числа пациентов с медикаментозным остеонекрозом челюсти.

Несмотря на то, что болезнь хорошо известна и было проведено много исследований по изучению этого состояния, лечение остеонекроза все еще является проблемой и остается сложным, несмотря на консервативные и хирургические вмешательства, в связи с прогрессирующим разрушением кости в челюсти. Ведется поиск инновационных способов лечения для возможности сохранения качества жизни пациентов, управления инфекцией и предотвращения развития новых участков некроза [6]. В настоящее время протокол лечения таких пациентов не установлен, и основными способами лечения остеонекроза являются антибиотикотерапия, хирургическое удаление некротической кости с последующим эндопротезированием [2]. Самые последние исследования показали преимущество хирургического лечения перед консервативным [7]. Поднимаются важные вопросы о стоматологическом лечении этих пациентов, так как основным фактором риска для развития некроза является предварительная экстракция зубов [5]. Профилактику остеонекроза связывают с регулярными стоматологическими обследованиями с трехмесячным интервалом и профилактическими методами, включая антибиотики перед удалением зубов и использование методов закрытия раны, которые предотвращают проникновение бактерий в кость [3].

Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что врачи общей практики имеют ограниченные знания, связанные с остеонекрозом челюсти, поэтому профилактические стратегии редко реализуются. Очевидна неэффективная междисциплинарная коммуникация между врачами общей практики для профилактики остеонекроза, требуются меры по уменьшению риска его развития [8]. Важное значение для развития некротических поражений играет бактериальная флора полости рта [1]. Лечение данной патологии антибиотиками требует дальнейшего изучения [4].

Целью исследования явилось определение качественного и количественного состава микробиоты ротовой полости у больных медикаментозным остеонекрозом челюсти (МОЧ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились 15 пациентов (10 мужчин и 5 женщин) в возрасте от 65 до 77 лет с диагнозом лекарственный МОЧ нижней челюсти (9 человек) и верхней челюсти (6 человек). Остеонекроз челюсти у больных стал следствием приема препарата Зомета (соль золедроновой кислоты) в течение длительного периода времени — от 1,5 до 3 лет. У всех больных был поставлен диагноз онкологического заболевания (рак молочной железы 8 женщин, рак предстательной железы 7 мужчин) с метастазами в костную ткань. Было проведено комбинированное лечение — оперативное, химио-, лучевая терапия по установленным схемам. В связи с наличием костных метастазов назначался препарат Зомета в инъекциях. При появлении боли в области зубов и обращении пациентов к стоматологу им были удалены зубы. В дальнейшем у них появились боли в области челюсти и наличие в полости рта свища с гнойным отделяемым. Пациенты были госпитализированы в клинику челюстно-лицевой хирургии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

При осмотре больных выявлено изменение конфигурации лица за счет отека. При пальпации определялся болезненный инфильтрат плотной консистенции. Имелись свищевые ходы со стороны кожных покровов. В полости рта наблюдались клинические проявления: слизистая оболочка полости рта в области удаленных зубов некротизирована, оголение костной ткани альвеолярного отростка челюсти, упорное гнойное отделяемое. По результатам КТ-исследования выявлены участки деструкции костной ткани.

Всем больным было проведено оперативное вмешательство под общей анестезией: блоковая или полная резекция челюсти, хирургическая санация полости рта. В дальнейшем было рекомендовано оперативное вмешательство в виде эндопротезирования челюсти.

Оценку качественного и количественного состава микробиоты ротовой полости у больных проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Была проведена количественная оценка содержания в образцах 12 групп факультативно- и облигатно-анаэробных микроорганизмов. Показателем общей обсемененности исследуемого образца служила общая бактериальная масса (ОБМ). Для оценки эффективности проводимого лечения показатели рассматривали в сроки до лечения, перед операцией, через 7-10 дней после операции, 1 год после операции. Взятие ротовой жидкости и мазок в области некроза челюсти проводили с помощью стерильного одноразового зонда. Зонд погружали в ротовую жидкость в подъязычной области на 1-2 секунды и опускали в транспортную среду.

ДНК микроорганизмов выделяли при помощи набора реагентов «ПРОБА—ГС—ПЛУС» (производства ООО «НПФ ДНК-Технология»). Методика выделения основана на лизисе биоматериала с последующими сорбцией ДНК на носителе, отмывке примесей, элюцией ДНК с сорбента. Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью детектирующего амплификатора «ДТ-96» (производства ООО «НПФ ДНК-Технология»). Учет результатов вели с помощью программного обеспечения, прилагающегося к детектирующему амплификатору «ДТ-96». Статистическая обработка данных проводилась с помощью статистического пакета SPSS Statistics версии 17.0. В качестве меры центральной тенденции количественных признаков выбрана медиана, а в качестве интервальной оценки — верхний и нижний процентиль, т.к. исследуемые выборки не подчиняются закону нормального распределения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении состава микробиоты ротовой жидкости и отделяемого из свища у больных МОЧ установлено, что показатель общей бактериальной массы (ОБМ) в ротовой жидкости до лечения был выше на 1-3 порядка, чем у здоровых лиц. В отделяемом из свища в зоне некроза костной ткани челюсти показатель ОБМ был выше на 2-2,5 порядка, чем в ротовой жидкости у этих же больных.

Состав микрофлоры ротовой жидкости у больных МОЧ отличался от показателей у здоровых лиц по показателям анаэробных микроорганизмов. В ротовой жидкости до начала лечения были наиболее высокими показатели *Fusobacterium* spp., *Prevotella*, *Porphyrromonas*, превышающие таковые показатели у здоровых лиц на 1-3 порядка. В раневом отделяемом до лечения у больных МОЧ показатели всех анаэробных микроорганизмов (*Fusobacterium* spp., *Prevotella*, *Porphyrromonas*, *Leptotrichia*, *Sneathia*, *Peptostreptococcus* spp.) были выше, чем у них же в ротовой жидкости на 1-2 порядка.

Показатели аэробных микроорганизмов *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. больных МОЧ до лечения в ротовой жидкости и в отделяемом из свища не отличались от показателей у здоровых лиц либо равнялись нулю. У больных МОЧ, в отличие от здоровых лиц, в ротовой жидкости и в раневом содержимом выявлены грибы рода *Candida* spp.

До оперативного вмешательства всем пациентам был проведен курс антибактериальной терапии в течение 7 дней. В результате проведенной терапии показатели анаэробной микрофлоры в ротовой жидкости понизились после применения линкомицина (табл.). Применение цефазолина было более эффективно, показатели анаэробной микрофлоры в ротовой жидкости резко понизились, некоторые виды микроорганизмов отсутствовали. В срок 7-10 дней после хирургического лечения показатели изучаемого состава анаэробной микрофлоры были на уровне показате-

#### Состав микроорганизмов в ротовой жидкости у больных МОЧ до и после лечения

Микроорганизмы (Медиана lg ГЭ/образец/ 5-95 процентиль)	Больные с остеонекрозом челюсти				
	До лечения (n=15)	Перед операцией, 7 дней линкомицин (n=7)	Перед операцией, 7 дней цефазолин (n=8)	7-10 сутки после операции (n=15)	1 год после опе- рации (n=10)
ОБМ	6,7 5,8-7,8	5,8 5,2-6,0	4,7* 4,2-5,3	5,8 5,0-6,5	5,1* 4,0-6,2
Enterobacteriaceae	4,7 3,0-5,6	0	3,0* 2,4-4,3	3,1* 2,8-4,2	3,6* 2,8-4,4
Streptococcus spp.	5,4 3,9-6,1	3,0* 3,9-4,1	0	5,1 4,8-5,5	4,2 2,5-4,9
Fusobacterium spp.	6,1 4,2-7,5	5,4 4,2-5,6	5,4 4,6-6,6	0	3,8* 3,0-4,3
Staphylococcus spp.	0	0	0	0	0
Prevotella и Porphyrromonas spp.	6,1 5,8-7,7	5,1* 4,8-5,7	3,1** 2,4-3,8	3,4* 3,0-4,1	3,3*
Megasphaera, Veilonella, Dialister	6,1 4,3-7,2	4,4* 4,0-5,4	0	4,4 3,1-4,6	3,1* 2,2-3,7
Corynebacterium, Mobiluncus	4,8 3,4-5,5	0	0	0	3,3* 2,5-4,0
Leptotrichia, Sneathia	6,1 4,8-7,3	5,4 4,4-6,0	5,4 5,0-6,1	0	0
Lachnobacterium, Clostridium	5,3 3,5-6,5	3,6* 3,4-4,9	3,6* 3,2-5,0	0	0
Peptostreptococcus spp.	4,9 3,5-6,0	4,0* 3,1-4,9	3,7* 2,8-4,2	0	0
Eubacterium spp.	5,0 3,8-6,6	4,3* 3,3-4,7	3,0* 2,1-3,8	3,1* 2,2-3,3	0
Candidas spp.	3,7 0-6,0	0	0	0	0

П р и м е ч а н и е. \* Различия между показателями до и после лечения;  $p < 0,05$ .

лей у здоровых лиц либо отсутствовали. Через 1 год после хирургического лечения показатель ОБМ и показатели анаэробных микроорганизмов не отличались от показателей у здоровых лиц.

Ранняя диагностика медикаментозного остеонекроза челюсти имеет решающее значение для предотвращения осложнений. Анаэробная условно патогенная микрофлора, отрицательно влияет на процесс заживления костной раны после удаления зубов. При остеонекрозе челюсти были выявлены высокие показатели анаэробных патогенов в ротовой жидкости и в отделяемом из свища, а также грибы рода *Candida*. Необходимо проведение молекулярных методов тестирования популяции бактерий и определения их чувствительности к антибиотикам. Курсы тщательно подобранной антибиотикотерапии следует проводить с учетом динамического наблюдения в отношении уровня обсемененности ротовой полости у данной группы пациентов. Учитывая риск возможных тяжелых осложнений, курс антибактериальной терапии и хирургическое вмешательство являются более эффективным методом лечения остеонекроза, так как приводят к эффективной санации, что позволяет в дальнейшем провести эндопротезирование.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Иванюшко Т.П., Поляков К.А., Медведев Ю.А., Шаманаев С.В., Трофимов Д.Ю., Абрамов Д.Д., Балькин Р.А. Исследование условно-патогенных микроорганизмов у больных с бисфосфонатным остеонекрозом челюстей. *Стоматология*. 2016, 95(1):44-48. doi: 10.17116/stomat201695144-48.
2. Поляков К.А., Медведев Ю.А., Омельченко А.С. Бисфосфонатные остеонекрозы челюстей: аспекты патогенеза и клинические проявления. *Голова и шея. Российское издание. Журнал Общероссийской общественной организации «Федерация специалистов по лечению заболеваний головы и шеи»*. 2013, 2:20-23.
3. Beth-Tasdogan N.H., Mayer B., Hussein H., Zolk O. Interventions for managing medication-related osteonecrosis of the jaw. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Oct. 6; 10:CD012432. doi: 10.1002/14651858.CD012432.pub2.
4. De Bruyn L., Coropciuc R., Coucke W., Politis C. Microbial population changes in patients with medication-related osteonecrosis of the jaw treated with systemic antibiotics. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol.* 2018 Mar; 125(3):268-275. doi: 10.1016/j.oooo.2017.11.022.
5. Egloff-Juras C., Gallois A., Salleron J. et al. Denosumab-related osteonecrosis of the jaw: A retrospective study. *J. Oral. Pathol. Med.* 2018. Jan; 47(1):66-70. doi: 10.1111/jop.12646.
6. Inchingolo F., Cantore S., Dipalma G. et al. Platelet rich fibrin in the management of medication-related osteonecrosis of the jaw: a clinical and histopathological evaluation. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2017 Jul-Sep; 31(3):811-816.
7. Kagami H., Inoue M., Kobayashi A. et al. Issues with the surgical treatment of antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaws. *Oral. Dis.* 2018 Mar; 24(1-2):52-56. doi: 10.1111/odi.12783.
8. Sturrock A., Preshaw P.M., Hayes C., Wilkes S. Attitudes and perceptions of GPs and community pharmacists towards their role in the prevention of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a qualitative study in the North East of England. *BMJ Open*. 2017, Sep 29; 7(9):e016047. doi: 10.1136/bmjopen-2017-016047.
9. Viviano M., Addamo A., Cocca S. A case of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with a particularly unfavourable course: a case report. *J. Korean Assoc. Oral. Maxillofac Surg.* 2017 Aug; 43(4): 272-275. doi: 10.5125/jkaoms.2017.43.4.272.

*Поступила 19.08.18*

Контактная информация: Иванюшко Татьяна Петровна, д.м.н.,  
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, каф. ЧЛХ

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Е.А.Березняк, А.В.Тришина, Н.А.Селянская, И.В.Архангельская, И.Р.Симонова, М.И.Ежова*

### **АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* NONO1/NONO139, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ГИДРОЭКОСИСТЕМ В 2016-2017 ГГ. В РОСТОВЕ-НА-ДОНУ**

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Оценить распространение антимикробной резистентности штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 в водных объектах г. Ростова-на-Дону. *Материалы и методы.* Отбор проб проводили в стационарных точках открытых водоемов Ростова-на-Дону с мая по сентябрь 2016 г. и 2017 г. Чувствительность/устойчивость *V. cholerae* nonO1/nonO139 определяли к антибактериальным препаратам (АБП), рекомендованным для экстренной профилактики и лечения холеры, методом серийных разведений на агаре Мюллера-Хинтона. *Результаты.* Всего выделено в 2016 г. 196 штаммов, в 2017 г. — 75 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139. При серотипировании установлено, что все штаммы были отнесены к 17 серогруппам, преобладали представители O16 и O76 серогрупп. Анализ распределения штаммов по устойчивости к антибактериальным препаратам (АБП) показал, что чувствительных штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 не выявлено. Все микроорганизмы обладали устойчивостью к фуразолидону. Доли устойчивых к ко-тримоксазолу и ампициллину изолятов составили 35,2% и 40% в 2016 г. и 33,6% и 28,3 % в 2017 г. соответственно. Все микроорганизмы распределились по десяти фенотипам и характеризовались наличием от 1 до 4 детерминант резистентности. *Заключение.* По сравнению с данными за 2011-2014 гг. в 2016-2017 гг. в Ростове-на-Дону среди штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 резистентность к фуразолидону выросла с 47% до 100%. К ко-тримаксазолу резистентность возросла с 7,8% до 35,2 — 40%. В 2016 г. Были выявлены штаммы, устойчивые к гентамицину (1,5%), которые отсутствовали ранее.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 87—91

Ключевые слова: мониторинг, *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 серогрупп, антибиотикорезистентность

*Е.А.Bereznyak, A.V.Trishina, N.A.Selyanskaya, I.V.Arkhangelskaya, I.R.Simonova, M.I.Ezhova*

### **ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF *VIBRIO CHOLERAE* NONO1/NONO139 STRAINS ISOLATED FROM HYDROECOSYSTEMS IN 2016-2017 IN ROSTOV-ON-DON**

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

*Aim.* To assess the prevalence of antimicrobial resistance of *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains in water bodies in Rostov-on-Don. *Materials and methods.* Sampling was carried out at fixed points of open reservoirs in Rostov-on-Don from May to September in 2016 and 2017. Sensitivity/resistance of *V. cholerae* nonO1/nonO139 to antibacterial drugs (ABP) recommended for emergency prevention and treatment of cholera was determined by serial dilution on Müller-Hinton agar. *Results.* 196 strains of *V. cholerae* nonO1/nonO139 were isolated in 2016, 75 — in 2017. When serotyping it was found that all strains were assigned to 17 serogroups, representatives of O16 and O76 serogroups prevailed. Analysis of the distribution of strains on resistance to ABP showed that sensitive strains of *V. cholerae* nonO1/nonO139 were not detected. All microorganisms were resistant to furazolidone. The proportions of isolates resistant to co-trimoxazole and ampicillin were 35.2% and 40% in 2016, and 33.6% and 28.3% in 2017 respectively. All microorganisms were

distributed over ten phenotypes and were characterized by the presence of 1 to 4 determinants of resistance. *Conclusion.* The resistance of *V. cholerae* nonO1/nonO139 strains isolated in Rostov-on-Don water bodies to furazolidone increased from 47% in 2011 — 2014 to 100% in 2016 — 2017. Resistance to co-trimazole increased from 7.8% to 35.2 — 40%. Strains resistant to gentamicin (1.5%) earlier absent were detected in 2016.

Zh. Mikrobiol. (Moscow). 2019, No. 2, P. 87—91

Key words: monitoring, *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 serogroups, antibiotic resistance

Распространение резистентности к антибактериальным препаратам (АБП) является одной из самых острых проблем современности, несущей биологические и экономические угрозы для всех стран. Проблема устойчивости микроорганизмов к антибиотикам приобрела особую актуальность в странах с развитой системой здравоохранения и ведением интенсивного сельского хозяйства за последние 20 лет, снижая эффективность мероприятий по профилактике и лечению инфекционных болезней человека и животных [8, 10].

В последние годы появилось множество доказательств того, что микроорганизмы, обнаруживаемые в окружающей среде, имеют огромное количество разнообразных генов антибиотикорезистентности, а экологические места обитания, особенно водоемы, реки и озера, являются идеальной средой для передачи этих генов среди бактерий, способствуя селекции антибиотикорезистентных штаммов и глобальному распространению устойчивости к АБП [2].

Холерные вибрионы неO1/неO139 широко известны и как естественные обитатели открытых водоемов, и как возбудители острых кишечных инфекций различной степени тяжести, вызывая пристальное внимание исследователей. Эти штаммы являются по сути природными резервуарами ранее не встречавшихся комбинаций генов устойчивости к АБП, способных передаваться штаммам *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, расширяя их патогенный и эпидемический потенциал [14].

Обращает на себя внимание частая встречаемость антибиотикорезистентных штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 в водных объектах. В последние годы такие микроорганизмы были зарегистрированы в Индии, Китае, Вьетнаме, Индонезии, Марокко, бассейне Карибского моря, Мексике, России [4,11,12,15]. Среди выделенных в 2011-2014 гг. в Ростовской области штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп были как чувствительные, так и штаммы с множественной устойчивостью (от 1 до 6 маркеров) [6].

В геноме холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп обнаружены специализированные мобильные структуры, содержащие гены антибиотикорезистентности, способные передаваться между штаммами. Наличие мобильных генетических элементов и мегаинтегрона создает благоприятные условия для успешного горизонтального переноса генов от штамма к штамму и не исключает дальнейшего нарастания числа резистентных микроорганизмов [9, 13, 16].

Широкое распространение штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, устойчивых к антимикробным соединениям, вариабельность и непредсказуемость спектра антибиотикоустойчивости позволили ученым рассматривать эту группу микроорганизмов как источник ранее не встречавшихся комбинаций генов резистентности для эпидемически значимых серогрупп вибрионов [7].

Цель исследования — оценить распространение антимикробной резистентности штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 в водных объектах Ростова-на-Дону.

Отбор проб проводили ежемесячно с мая по сентябрь 2016-2017 гг. в водоемах Ростова-на-Дону. Выделение и идентификацию штаммов проводили в соответствии с МУК 4.2.2218-07.

Серологическую идентификацию изолированных штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 осуществляли с помощью набора сывороток диагностических холерных неO1/неO139 серогрупп моноспецифических кроличьих против типовых штаммов холерных вибрионов O2-O84 серогрупп в реакции слайд-агглютинации [1].

Чувствительность к АБП определяли методом серийных разведений на агаре Мюллера-Хинтона рН  $7,3 \pm 0,2$  (HiMEDIA, Индия). Интерпретацию результатов определения чувствительности культур вибрионов проводили в соответствии с МУК 4.2.2495-09. Для определения чувствительности/устойчивости *V.cholerae nonO1/nonO139* использовали препараты, рекомендованные для экстренной профилактики и лечения холеры. Препараты первого ряда: доксицилин, ципрофлоксацин, ко-тримоксазол, фуразолидон, гентамицин, налидиксовая кислота. Препараты второго ряда: левомецетин, ампициллин, цефтриаксон.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных средств программы «Microsoft Office Excel».

Из стационарных точек открытых водоемов Ростова-на-Дону было выделено в 2016 г. 196 штаммов, в 2017 г. — 75 штаммов *V. cholerae nonO1/nonO139*. Все культуры не содержали генов холерного токсина *ctxA* и токсин-корегулируемых пилей *tcpA*, были типичны по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам.

При серотипировании установлено, что в изучаемый период в водоемах Ростова-на-Дону циркулировали *V.cholerae nonO1/nonO139*, которые были отнесены к 17 серогруппам, преобладали представители O16 и O76 серогрупп.

Все выделенные штаммы были протестированы на чувствительность/устойчивость к противомикробным препаратам. Анализ распределения штаммов по устойчивости к антибактериальным препаратам показал, что чувствительных ко всем АБП штаммов *V. cholerae nonO1/nonO139* не выявлено. Все микроорганизмы обладали устойчивостью к фуразолидону. Доля устойчивых к ко-тримоксазолу и ампициллину штаммов, выделенных в 2016 г. и в 2017 г. составила 35,2% и 40% и 33,6% и 28,3% соответственно.

Устойчивость холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп к левомецетину и гентамицину в 2016 г. составила 0,5 и 1,5% соответственно при отсутствии выделения таких штаммов в следующем году. В 2017 г. возросло число холерных вибрионов, устойчивых к налидиксовой кислоте (2,6% против 1% в 2016 г.). Все изолированные из водоемов города штаммы *V.cholerae nonO1/nonO139* показали чувствительность к доксицилину, ципрофлоксацину, цефтриаксону.

При анализе фенотипов антибиотикорезистентности исследуемых штаммов *V.cholerae nonO1/nonO139* было отмечено, что все микроорганизмы распределились на 10 фенотипов и характеризовались наличием от 1 до 4 детерминант резистентности при отсутствии культур, чувствительных ко всем тестируемым АБП.

Резистентность к двум АБП зафиксирована у 34,6% в 2016 г. и 52,0% в 2017 г. Чаще всего в 2016 г. встречались фенотипы: ко-тримоксазол/фуразолидон — 18,8% и фуразолидон/ампициллин — 15,8%. В 2017 г. доля таких фенотипов возросла до 24,0% и 28% соответственно. Множественной антибиотикорезистентностью (к трем и более препаратам) обладало в 2016 г. — 18,4%, а в 2017 г. — 17,3% штаммов *V.cholerae nonO1/nonO139*. К трем АБП часто встречающимся был фенотип ко-тримоксазол/ампициллин/фуразолидон. Такие штаммы в 2016 г. обнаружены в 16,4%, в 2017 г. в 13,4% случаев. В 2016 и 2017 гг. зарегистрированы единичные случаи выделения штаммов *V. cholerae nonO1/nonO139* с маркерами устойчивости к четырем АБП.

Таким образом установлено, что в изучаемый период циркулировали штаммы *V.cholerae nonO1/nonO139*, которые были отнесены к 17 серогруппам, доминировали представители O16 и O76 серогрупп. Сравнительный анализ серотипирования штаммов 2016 — 2017 гг. с предыдущими исследованиями (2003-2008 гг., 2009-2011 гг.) не выявил значительных изменений в составе доминирующих серогрупп вибрионов [3]. У штаммов *V.cholerae nonO1/nonO139*, выделенных из водных объектов окружающей среды на территории Ростова-на-Дону в 2016-2017 гг., не обнаружены гены холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии.

Проведенные в 2011 — 2014 гг. в Ростовской области исследования по изучению чувствительность к АБП штаммов *V.cholerae* nonO1/nonO139 показали [6], что доля штаммов чувствительных ко всем антибиотикам, составила 17,6%, в 2016-2017 гг. таких изолятов не выделено. Резистентностью к фуразолидону в 2011-2014 гг. обладали 47% штаммов, в 2016-2017 гг. их доля увеличилась до 100%. К ко-тримаказолу резистентность возросла с 7,8% до 35,2 — 40% в 2016-2017 гг. В 2016 г. появились штаммы, устойчивые к гентамицину (1,5%), которые отсутствовали в 2011-2014 гг. В то же время, устойчивость холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп к тетрациклинам и левомицетину составила в 2011-2014 гг. 13,7% и 43%, а в 2016-2017 гг. — 0 и 0,5%, соответственно. Резистентность к этим антибактериальным препаратам носит индуцибельный характер, в связи с чем фенотипически может не проявляться [5].

По результатам исследований зарегистрирована база данных «Фенотипы антибиотикорезистентности холерных вибрионов различных серогрупп, выделенных на территории Ростовской области». Свидетельство о государственной регистрации №2018620078 от 12 января 2018 г.

Мониторинг резистентности к АБП представителей семейства *Vibrionaceae* дает возможность прогнозировать, в каком направлении идут изменения антимикробной резистентности, что позволит своевременно принять меры по обеспечению биологической безопасности региона.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Е.П. Совершенствование метода серологической идентификации холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп: Автореф. дисс. канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 2006.
2. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н. и др. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объём, разнообразие и развитие. Антибиотики и химиотерапия. 2013, 5-6:38-48.
3. Григоренко Л.В., Кругликов В.Д., Мазрухо А.Б. и др. Холерные вибрионы неO1/неO139, выделенные в ходе мониторинга водоемов и стоков Ростова-на-Дону с 2009 по 2011 год. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 4:48-50.
4. Монахова Е.В., Архангельская И.В. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире. Пробл. особо опасных инф. 2016, 2:14-23.
5. Селянская Н.А., Рыжко И.В., Веркина Л.М. Индукция *in vitro* трансмиссивной устойчивости к тетрациклину, левомицетину и ампициллину у культур *Vibrio cholerae* неO1/ неO139 серогрупп, выделенных в 1990-2005 гг. Антибиотики и химиотерапия. 2011, (56) 7-8: 16-21.
6. Селянская Н.А., Веркина Л.М., Архангельская И.В. и др. Мониторинг антибиотикорезистентности штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп, выделенных из объектов окружающей среды в Ростовской области в 2011—2014 гг. Здоровье населения и среда обитания. 2015, 7:33-6.
7. Baron S., Larvor E., Chevalier S. et al. Antimicrobial Susceptibility among Urban Wastewater and Wild Shellfish Isolates of Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* from La Rance Estuary (Brittany, France). *Front. Microbiol.* 2017, 8:1637.
8. Bassetti M., Pecori D., Peghi M. Multidrug-resistant Gram-negative Bacteria-Resistant Infections: Epidemiology, Clinical Issues and Therapeutic Options. *Italian Journal of Medicine.* 2016, 10(4):364-375.
9. Carraro N., Rivard N., Ceccarelli D. et al. IncA/C Conjugative Plasmids Mobilize a New Family of Multidrug Resistance Islands in Clinical *Vibrio cholerae* Non-O1/Non-O139 Isolates from Haiti. *mBio.* 2016, 7(4): 00509-16 doi: 10.1128
10. Curcio D. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections: Are you Ready for the Challenge? *Current Clinical Pharmacology.* 2014, 9(1):27-38. DOI: 10.2174/15748847113089990062.
11. Diep T.T., Nguyen N.T., Nguyen T.N. et al. Isolation of New Delhi metallo-β-lactamase 1 (NDM-1)-producing non-O1, non-O139 strain carrying *ctxA*, *st*, and *hly* genes in southern Vietnam. *Microbiol Immunol.* 2015, 59(5):262-267. doi: 10.1111/1348-0421.122482015.
12. Li F., Du P., Li B. et al. Distribution of virulence-associated genes and genetic relationships in non-O1/O139 aquatic isolates from China. *Appl Environ Microbiol.* 2014, 80(16): 4987-4992. doi: 10.1128/AEM.01021-14.

13. Mala W., Faksri K., Samerpitak K. et al. Antimicrobial resistance and genetic diversity of the SXT element in *Vibrio cholerae* from clinical and environmental water samples in northeastern Thailand. *Infect. Genet. Evol.* 2017, 52: 89-95.
14. Rodriguez-Blanco A., Lemos M., Osorio C. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56(5): 2619-26.
15. Shrestha U. T., Adhikari N., Maharjan R. et al. Multidrug resistant *Vibrio cholera* O1 from clinical and environmental samples in Kathmandu city. *BMC Infect. Dis.* 2015, 15 (1): 104.
16. Spagnoletta M., Ceccarelli D., Rieux A. et al. Acquisition and evolution of SXT-R391 integrative conjugative elements in the seventh pandemic *Vibrio cholerae* lineage. *mBio.* 2014, 5 (4): 1356-14.

*Поступила 06.08.18*

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

## ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*А.Ю.Антипова, М.А.Бичурина, И.Н.Лаврентьева, Арег А. Тотолян*

### **ПРОГРАММА ЭЛИМИНАЦИИ КОРИ В АФРИКАНСКОМ РЕГИОНЕ ВОЗ: СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ**

Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Корь в Африканском регионе ВОЗ (АРВ), который объединяет 47 стран, характеризуется тяжелой течением с высоким риском смерти из-за недоедания, недостатка витамина А, сопутствующих инфекций. Эндемичными для АРВ являются вирусы кори генетической линии В (В1, В2, В3). Стратегия элиминации кори в АРВ была основана на сочетании программ дополнительной иммунизации (ПДИ) детей до 14 лет и плановой вакцинации не менее 90% детей 9-15 мес. Было рекомендовано повторять ПДИ каждые 3-5 лет для вакцинации детей, не привитых или неудачно привитых в календарные сроки. В ряде стран АРВ количество случаев кори снизилось на 83-97% в течение первого года реализации этой стратегии. Рекомендуемый возраст плановой вакцинации в АРВ составляет 9 месяцев — это мера снижения детской смертности от кори. Однако уровень сероконверсий при этом не достаточный (85%). Для элиминации кори в АРВ к 2020 г. в настоящее время рекомендовано использование двухдозовой схемы — вакцинация и ревакцинация. Охват вакцинацией одной дозой коревой вакцины в Африканском регионе увеличился до 74% в 2015 г. Но высокая заболеваемость корью в регионе сохраняется. В 2013—2016 гг. в АРВ зарегистрировано 103 161 случаев кори среди детей до 6 лет; из них 79% не вакцинированы (или прививочный статус не известен). В 2013 году программа вакцинопрофилактики кори в ряде стран АРВ была нарушена из-за эпидемии лихорадки Эбола. В странах, где закончилась эпидемия, рекомендовано возобновить вакцинацию лицам, которые могли пропустить плановую иммунизацию. Проблемы реализации элиминации кори в АРВ: недостаточная оснащенность медицинских центров оборудованием и квалифицированными кадрами, слабая информированность населения, плохо развитая система сообщения, вооруженные конфликты.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 91—99

Ключевые слова: Африканский регион ВОЗ, корь, программа элиминации, заболеваемость, вакцинация, охват прививками

## **THE PROGRAMME OF MEASLES ELIMINATION IN THE WHO AFRICAN REGION: CURRENT STATE OF THE PROBLEM**

Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

In the WHO African region (AFR), measles is characterized by severe complications with a high risk of death due to malnutrition, vitamin A deficiency, concomitant infections. Measles viruses of genotype B (B1, B2, B3) are the endemic viruses in the African region (47 countries). The strategy for the elimination of measles in AFR was based on the combination of supplementary immunization programmes (SIAs) for children under 14 years of age and routine vaccination of at least 90% of children 9-15 months of age. It was recommended to repeat the SIAs every 3-5 years. The number of measles cases decreased by 83-97% during the first year due to the strategy. The recommended age of routine vaccination in AFR is 9 months — this is a way to reduce measles-caused infant mortality. However, the level of seroconversion is not sufficient (85%). To eliminate measles completely by 2020, it's recommended the use of two-dose regimens — vaccination and revaccination. Vaccination coverage with a single dose of measles vaccine in the African region increased to 74% in 2015, but the high incidence of measles in the region persists. In 2013-2016 there are 103,161 cases of measles among children under 6 years of age in AFR; 79% of which were not vaccinated (or had unknown vaccination status). In 2013, the measles vaccine program in several AFR countries was disrupted by the epidemic of Ebola. In countries where the epidemic has ended, the vaccination was recommended to be resumed for persons who may have missed routine immunization. There are problems in the implementation of measles elimination in AFR: insufficient equipment of medical centers and lack of qualified personnel, poor population awareness, poorly developed communication system, military conflicts.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 91—99

Key words: WHO African region, measles, elimination programme, incidence, vaccination, vaccination coverage

*Совершенствование стратегии ВОЗ в борьбе с корью.* По данным ВОЗ до введения вакцинации ежегодно в мире заболевали корью от 135 до 140 млн человек и умирали от 5 до 7 млн детей [2]. Корь называли «детской чумой» (контагиозность достигает 96-98%).

ВОЗ в 1989 г. и Совещание глав государств по детскому здравоохранению в 1990 г. поставили задачу снижения заболеваемости корью и смертности на 90% и 95%, соответственно. По заключению Консультативной группы ВОЗ (1996 г.), наличие единственного хозяина (человека), типичной клинической картины, стойкого иммунитета после заболевания, единого антигенного варианта вируса кори и отсутствие вирусоносительства делает возможным элиминацию кори во всем мире [2]. Элиминация — это прекращение циркуляции вируса (эндемичных штаммов) на значительной географической территории вследствие высокого уровня популяционного иммунитета. Могут регистрироваться импортированные случаи и ограниченные вспышки [14]. Способ достижения элиминации — вакцинация.

В 2012 г. 194 государства — члены Всемирной ассамблеи здравоохранения, утвердили Глобальный план действий в отношении вакцин (ГПДВ), задачей которого стало улучшение здоровья благодаря распространению всесторонних преимуществ от иммунизации на всех людей, независимо от этнических, социальных, религиозных и других различий [4]. Стратегия ВОЗ по борьбе с корью включала проведение одной прививки при охвате не менее 90% индикаторных групп населения, однако при однократной вакцинации в 9-месячном возрасте, применяемой во многих странах Африки, уровень сероконверсий составлял всего 85%, то есть 15% детей оставались незащищенными от кори. Двухдозовая схема иммунизации (вакцинация и ревакцинация) позволяет обеспечить элиминацию кори на национальном уровне [2]. Для осуществления надзора за корью и доказательства элиминации инфекции была создана Глобальная лабораторная сеть по диагностике кори и краснухе [10].

Стратегический план по элиминации кори к 2020 г. (ВОЗ, 2012 г.) предусматривал снижение смертности от кори на 95% по сравнению с показателем 2000 г. и достижение элиминации, по крайней мере, в пяти регионах ВОЗ, в том числе в Африканском [42].

Африканский регион ВОЗ (АРВ) объединяет 47 стран. Численность населения Африки составляет около 1 миллиарда человек и, согласно прогнозу банка HSBC (Банковская корпорация Гонконга и Шанхая), к 2050 г. удвоится [6].

*Клиническая характеристика кори в странах Африканского региона ВОЗ.* Корь, системное заболевание, в Африке характеризуется тяжелым течением, чему способствуют недоедание, недостаток витамина А, а также ко-инфицирование возбудителями бактериальных, вирусных, паразитарных заболеваний [22]. В типичном случае (среднетяжелая форма) у неиммунных лиц после инкубационного периода наблюдаются продромальные симптомы: лихорадка, слабость, кашель, насморк и конъюнктивит. Патогномоничный признак, пятна Бельского—Филатова—Коплика, на слизистой оболочке щек и губ обнаруживаются у 80% заболевших за 2 дня до появления сыпи. Макуло-папулезная сыпь распространяется с лица на конечности и туловище в течение 3-7 дней и сопровождается высокой температурой. Далее происходит изменение цвета элементов сыпи и их шелушение (период пигментации). Больные заразны весь продромальный период и до 4 дней от начала высыпаний [5,41].

В Африканском регионе ВОЗ приблизительно одна треть случаев кори сопровождается осложнениями. Наблюдаются изъязвление слизистой рта, ларинготрахеобронхит (круп), пневмония, инфекция уха и пазух носа, стойкая диарея. В ЮАР наиболее частой причиной госпитализации больных корью детей была пневмония и/или диарея [22]. В Уганде из 171 заболевшего корью ребенка у 136 развилась бронхопневмония [15]. Реже наблюдается высушивание и изъязвление роговицы у 1-4% заболевших корью детей, при этом корь вызывает около половины случаев детской слепоты в Африке [19, 22, 41]. Риск заражения другими инфекциями или смерти сохраняется в течение нескольких месяцев после выздоровления от острой кори [48]. Среди привитых количество случаев кори с осложнениями значительно меньше по сравнению с непривитыми [18].

Корь на Африканском континенте — одна из главных причин детской смертности, особенно у детей в возрасте до 5 лет, что составляет до 10% от всех случаев смерти детей в регионе [32, 41]. До 2000-х гг. в Уганде летальность составляла 20-23%; среди умерших 55% были дети в возрасте от 6 до 18 месяцев. Причиной смерти в большинстве случаев было поражение легких вирусом кори, а не вторичная инфекция [15]. В 2009-2010 гг. в одной из больниц Кейптауна 15 из 18 умерших от кори детей (3% от числа госпитализированных) были младше одного года [22]. В целом, с 2013 года корь в АРВ является причиной около 40 000 смертей ежегодно.

*Заболеваемость корью в странах Африканского региона ВОЗ.* В АРВ большие вспышки кори наблюдались в 1992 г. (ЮАР) [22], в 1996 г. (Ботсвана, Лесото, Малави, Намибия, ЮАР, Свазиленд, Зимбабве) [49]. После начала иммунизации заболеваемость корью снизилась, число регистрируемых случаев сократилось с 520 102 случаев в 2000 г. до 37 012 в 2008 г. (исторический минимум). В 7 странах Южной Африки количество ежегодно сообщаемых случаев кори в период с 2006 г. по 2008 г. было менее 1 на 1 млн населения [35]. Однако достигнутый уровень охвата вакцинацией не смог предотвратить крупные вспышки кори в последующие годы.

В 2010 — 2011 гг. в Африканском регионе ежегодно отмечалось около 200 000 случаев кори [24]. В 2012 г. число подозрительных на корь случаев в АРВ составило 106 052, показатель заболеваемости был 118,8 на 1 млн населения. Количество подтвержденных случаев кори в регионе снизилось с 43 800 в 2011г. до 25 905 в 2012 г.; заболеваемость с учетом подтвержденных случаев составила 50,4 и 29,0 на 1 млн населения соответственно. Большие вспышки кори были в Анголе, Демократической Республике Конго (ДРК), Нигерии, Эфиопии [11, 24, 26]. В 2013 г. в АРВ было под-

тверждено 71 529 случаев кори. В 2015 г. в Африканском регионе ВОЗ было выявлено 105 256 случаев кори, большинство случаев зарегистрировано среди детей в возрасте до 5 лет, из них 79% были не вакцинированы или не имели сведений о прививках. В 2016 г. выявлено 62 293 подозрительных на корь случаев, самая высокая заболеваемость корью была в Экваториальной Гвинее (1938 на 1 млн населения). Вместе с тем, в 15 странах АРВ показатель заболеваемости оказался меньше 1 случая на 1 млн населения [25].

Программа вакцинопрофилактики кори в ряде стран Африканского региона была нарушена в результате гуманитарного кризиса, связанного с эпидемией лихорадки Эбола [37]. Наиболее пострадали страны Западной Африки — Гвинея, Либерия и Сьерра-Леоне. Вакцинация против кори в этих странах проводится однократно в 9 месяцев.

В Гвинейской Республике охват прививкой снизился с 90,5% в 2012 г. до 52% в 2015 г. [25]. По нашим данным, в целом 12,3% обследованных лиц в Гвинейской Республике были серонегативны к вирусу кори. Антитела к вирусу кори отсутствовали или определялись в низких титрах у 76,2% обследованных в возрасте до 22 лет, вероятно, как следствие нарушения плановой вакцинации [1, 7—9]. Вместе с тем, все обследованные в возрасте 23 года и старше были серопозитивны к вирусу кори, причем 60% из них имели высокие титры антител, что свидетельствовало о недавно перенесенной кори. В 2016 г. в Гвинейской Республике было зарегистрировано 289 подтвержденных случаев кори, в январе-марте 2017 г. произошла вспышка кори (3991 случай); зарегистрировано 4 летальных исхода у больных с диагнозом корь [47].

В Либерии охват прививкой составил 74% в 2013 г., 58% в 2014 г. и 64% в 2015 г. В период эпидемии Эбола не было зарегистрировано ни одного случая кори; но в 2015 г. и 2016 г. зарегистрировано 433 и 400 подтвержденных случаев соответственно. Министерство здравоохранения страны официально признало, что эпидемия кори явилась следствием отсутствия ее вакцинопрофилактики в результате эпидемии лихорадки Эбола [12]. В странах, где закончилась эпидемия Эбола, ВОЗ было рекомендовано возобновить плановую вакцинацию и особое внимание уделить детям, которые могли пропустить иммунизацию.

Одна из самых благополучных по кори стран АРВ является Демократическая Республика Конго — одна из самых бедных стран мира. Против кори однократно вакцинируют детей 9–11 месяцев [20, 42]. Дополнительная вакцинация детей в возрасте 6–59 месяцев каждые три года проводилась в 2002–2004 гг. и 2006–2007 гг. В 2010–2013 гг. в ДРК отмечалась политическая нестабильность. Вспышка кори началась на юго-востоке страны в провинции Катанга, граничащей с Замбией. С 1 недели 2010 г. по 45 неделю 2013 г. сообщалось о 294 455 случаях кори и 5045 случаях смерти от этой инфекции. Летальность составила 1,7% среди зарегистрированных случаев. В период с 2011 по 2014 гг. доля заболевших в Демократической Республике Конго составила от 45 до 69% от всех зарегистрированных в АРВ случаев кори [23, 46]. В ответ на вспышки в 2013–2014 гг. были привиты более 18,5 млн детей. Уровень охвата прививкой увеличился до 79% в 2015 г. [20, 25, 28 — 30], что недостаточно для прекращения эпидемии. В 2016 г. сообщалось о 13 817 подозрительных на корь случаев, 178 со смертельным исходом. Показатель заболеваемости, учитывая только подтвержденные случаи кори, составил 61,7 на 1 млн населения. В 2017 г. подтверждены 2150 случаев кори.

В 2013 г. во время вспышки в Нигерии было зарегистрировано 57892 случаев, что составило 30% от всех случаев кори в АРВ. Нигерия является крупнейшим по численности населения государством Африки. В 2013 г. власти Нигерии объявили военное положение в трех северных штатах в связи с деятельностью террористической исламистской группировки «Боко Харам». Гуманитарный кризис привел к переселению людей в другие штаты Нигерии и в соседние страны: более 1,4 млн переселенцев проживали более чем в 100 лагерях. Уровень охвата одной дозой вак-

цины против кори был ниже 55% в течение длительного периода времени. В 2015 г. сообщалось о 24 421 подозрительном на корь случае, из которых 127 с летальным исходом [13, 25, 34]. Более 77% детей младше 5 лет не были вакцинированы, и в этой группе наблюдалось наибольшее число заболевших. Для предотвращения распространения вспышек с 12 января 2017 г. были проведены кампании массовой вакцинации детей в возрасте старше 6 месяцев, привиты 4 766 214 детей, сначала среди живущих в лагерях для переселенцев, затем всех детей в затронутых конфликтом штатах северо-восточной Нигерии [45].

Как отмечалось ранее, в Африке корью заболевают преимущественно дети младшего возраста [11, 30, 31]. Не обнаружено статистически значимых различий в заболеваемости корью среди лиц мужского и женского пола [18]. Пик заболеваемости обычно отмечается во время сухого сезона [16].

*Система надзора за корью в Африканском регионе ВОЗ.* Система здравоохранения АРВ построена по региональному принципу: медицинские центры обслуживают определенные территории.

Первой большой попыткой надзора за корью в Африканском регионе ВОЗ была программа с участием 20 африканских стран в 1966 году. Расширенная программа иммунизации (РПИ), инициированная ВОЗ в 1978 г., включала оперативные исследования, техническую помощь, сотрудничество с другими группами и развитие национальных программ иммунизации [32]. В 1986 г., наряду с РПИ, был введен вирусологический надзор за корью. Целью РПИ для Африканского региона было сделать иммунизацию против кори доступной для всех детей к 1990 г. и обеспечить, по крайней мере, 75% охват вакцинацией. В 1991 г. охват вакцинацией против кори детей в возрасте от 12 до 23 месяцев в Африке составлял только 54 % [17].

В 2000 г. Африканский региональный офис ВОЗ предложил план снижения смертности от кори более чем на 50% к 2005 г. Стратегия включала проведение кампаний массовой иммунизации детей от 1 до 14 лет, плановой иммунизации не менее 90% детей в возрасте 9-15 мес. и последующие кампании массовой иммунизации всех детей в возрасте 9 мес. — 4 года каждые 3-5 лет с целью охвата детей, не привитых в календарные сроки или не ответивших на плановую прививку. Кампании массовой иммунизации должны были включать большие популяции населения (всю страну или большой регион) и охватывать более 90% восприимчивых контингентов [2]. В 2002 г. во всех странах Африканского региона ВОЗ была внедрена система надзора за корью на основе расследования каждого подозрительного на корь случая с лабораторным подтверждением диагноза [38]. В надзор за корью была включена работа по сбору данных о случаях экзантемных заболеваний с лихорадкой и сыпью (два или более на 100 000 населения), исследованию образцов крови в одном (или более) подозрительном на корь случае на 80% территорий и 100% заполнение отчетности на всех территориях [40]. Африканский регион достиг цели сокращения смертности от кори на 90% по сравнению с оценками 2000 г. к концу 2006 г. [3].

В 2008 г. 46 государств-членов ВОЗ Африканского региона утвердили цель преэлиминации кори к концу 2012 года. Цель достигнута не была [39]. В 2009 г. Региональный комитет для стран Африки поставил и в 2011 г. утвердил цель элиминации кори к 2020 г. [40, 43]. К плану присоединились все 47 стран Африканского региона ВОЗ [42].

Глобальная лабораторная сеть по надзору за корью и краснухой ВОЗ в 2012 г. поддержала стандартизированные методы и средства обеспечения качества в 44 лабораториях 42 государств — членов Африканского региона ВОЗ; 43 страны сообщали данные по надзору за корью на основании расследования каждого случая, и все государства представляли ежегодные отчеты через Единую форму отчетности о количестве случаев кори. В 2012 г. 19 стран проводили расследование 2 или более случаев экзантемного заболевания с лихорадкой на 100 000 населения и исследование образцов крови от 1 или более подозрительных на корь случаев на 80% территорий [26].

В настоящее время в Африканском регионе ВОЗ надзор за корью интегрирован в эпидемиологический надзор за другими болезнями, предотвращаемыми с помощью вакцин (острый вялый паралич, желтая лихорадка, столбняк новорожденных). Для АРВ предполагаемая вспышка кори определяется как 5 или более подозрительных на корь случаев, зарегистрированных в течение одного месяца в медицинском учреждении или округе с известными путями передачи. В этом случае должно проводиться эпидемиологическое расследование [41]. Подозрительным на корь является любой случай заболевания с сыпью, лихорадкой, кашлем, насморком или конъюнктивитом. Подозрительные случаи подтверждаются на основании лабораторных исследований, эпидемиологической связи и клинических критериев. Лабораторное подтверждение диагноза кори при всех спорадических случаях и, по меньшей мере, одного случая в эпидемиологической цепочке является обязательным условием элиминации инфекции [16, 41, 48].

*Эндемичная трансмиссия вируса кори в Африканском регионе ВОЗ.* Молекулярные исследования, основанные на анализе варибельного участка гена нуклеопротеина (450 нт) вируса кори по единому протоколу (ВОЗ, 1998 г.), являются обязательной частью надзора за корью. Согласно принципам номенклатуры и наименования выделенных вирусов кори, описаны 22 определенных генотипа и 1 возможный новый (g3). Генетически родственные генотипы объединяются в генетические линии (А, В, С, D, E, F, G, H) [44].

В Африканском регионе ВОЗ с начала 2000-х гг. выявлялись вирусы кори линии D: D2, D4, D8 и D10. Однако чаще всего определяются вирусы кори генетической линии В. Генотип В2 постоянно циркулирует в Западной Африке. Генотип В3, включающий три суб-генотипа (В3.1, В3.2 и В3.3), широко распространен в странах Африканского региона ВОЗ, и был выявлен в разные годы во многих государствах Африки [16, 21, 31, 33, 35, 44].

В 2013 — 2016 гг. по данным ВОЗ все выделенные 249 изолятов вируса кори из 14 стран Африканского региона ВОЗ относились к генотипу В3 [25]. Вирусы генетической линии В являются эндемичными для Африканского региона, их трансмиссия продолжается.

*Вакцинопрофилактика кори в странах Африканского региона ВОЗ.* С 2001 г. в АРВ начали проводить программы дополнительной иммунизации (ПДИ) с охватом детей в возрасте 9 месяцев — 14 лет. В странах Центральной Африки большие кампании иммунизации проводились в 2002-2004 гг., затем в 2006-2007 гг. Однако охват прививкой был ниже 95%. В 2008 г. в общей сложности 7,7 миллиона детей грудного возраста (27% детей, родившихся в этом году) не получили одной дозы вакцины против кори [24].

В настоящее время применяются одно- и двух-дозовая стратегии вакцинации [38]. Рутинная вакцинация одной дозой во всех государствах проводится преимущественно в возрасте 9 месяцев. Двукратная иммунизация против кори введена в национальный календарь прививок в 25 странах АРВ, запланировано введение второй дозы корь-содержащей вакцины в Камеруне, Каморах, Уганде, рассматривается подобная возможность в Мали и Мавритании [25, 26]. Ревакцинация осуществляется в большинстве стран в возрасте 15-18 месяцев. Иммунизация выполняется также путем реализации программ (кампаний) дополнительной иммунизации. Для некоторых стран ПДИ — это единственный способ вакцинации населения [24, 32]. Поддержка выполнения ПДИ осуществляется за счет национальных бюджетов и коалиции партнеров: Американского Красного Креста, Фонда Объединенных Наций, ЮНИСЕФ, ВОЗ и СиДиСи [27].

В целом, к 2010 г. уровень охвата вакцинацией одной дозой коревой вакцины в Африканском регионе увеличился до 75%. В течение 2011—2012 гг. приблизительно 133 млн детей были вакцинированы при выполнении 35 дополнительных кампаний вакцинации по кори.

В 2013-2016 гг. было реализовано 52 ПДИ в 42 странах АРВ, в ходе которых были привиты около 300 млн детей. Охват прививкой во время кампании дополнительной

иммунизации составил не менее 95%. В 2015 г. высокие показатели охвата вакцинацией были в Мавритании (99%), Танзании (99%) и Сейшелах (98%); низкие — в Южном Судане (20%), Экваториальной Гвинее (27%) и Центральной Африканской Республике (49%) [25]. В 2016 г. охват МСV1 в АРВ составил 72%, МСV2 — 24%. Запланированы ПДИ в 28 странах Африканского региона ВОЗ, в том числе в Кот-д'Ивуар, Гвинее, Нигерии и Сьера-Леоне в 2017 г., в Чаде, Экваториальной Гвинее, Гвинее Бисау и Южном Судане в 2018 г. [24].

Таким образом, уровень охвата одной дозой вакцины против кори в АРВ не превышает 75% в течение длительного периода времени, что недостаточно для предотвращения распространения кори в регионе.

Достижению высокого уровня охвата вакцинацией в Африканском регионе ВОЗ препятствуют труднодоступность территорий и групп населения, плохо развитая система сообщения, отсутствие автомобильных дорог, проблема соблюдения холодной цепи при транспортировке вакцин, нехватка медицинских кадров, активное передвижение населения, вооруженные конфликты [29, 33].

Требуется улучшение медицинского обслуживания. Не все больные корью получают медицинскую помощь, и не обо всех случаях кори сообщается [29]. Некоторые медицинские центры и лаборатории недостаточно оснащены. Население недостаточно информировано о преимуществах вакцинации. Для выполнения ПДИ только в Нигерии потребовалось создание более чем 4000 команд по вакцинации [45]. Многие страны Африки начали обучать национальные кадры для осуществления иммунизации.

В развивающихся странах рекомендуемый ВОЗ возраст введения первой дозы коревой вакцины — от 7 до 9 месяцев. Однократная иммунизация детей в возрасте до года недостаточна для предотвращения вспышек кори. В Нигерии среди больных детей с лабораторно подтвержденной корью 54% было вакцинировано [18].

ВОЗ отмечает, что ошибки классификации, учета случаев кори при больших вспышках, представление неполных списков, нехватка персонала для заполнения баз данных и ошибки при обобщении сводной отчетности могут привести к искажению истинного уровня заболеваемости.

Цель надзора за корью в странах АРВ с низкой заболеваемостью корью — увеличение охвата второй дозой вакцины, надзор за корью по стандартам элиминации, широкий охват ПДИ. В странах с высокой заболеваемостью требуется решение комплекса проблем, в том числе юридических, политических, укрепления системы здравоохранения и др. [26, 36].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антипова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Тотолян А.А. Корь в странах Африканского региона ВОЗ на этапе элиминации инфекции. Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет. Под ред. А.Ю. Поповой. СПб, НИИЭМ имени Пастера, 2017.
2. Бектимиров Т.А. Стратегия ВОЗ по глобальной ликвидации кори. Проблема ликвидации кори 2002; 4 (22). URL: <http://www.adventus.info/doc/15b2301.php> (03.02.2018).
3. ВОЗ. Глобальная ликвидация кори. Доклад Секретариата. Пункт 11.15 предварительной повестки дня. Шестьдесят третья сессия Всемирной Ассамблеи Здравоохранения, А63/18, 25 марта 2010 г. URL: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/4854/1/A63\\_18-ru.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/4854/1/A63_18-ru.pdf?ua=1) (05.03.2018).
4. ВОЗ. Десятилетие вакцин — Глобальный план действий в отношении вакцин на 2011–2020 гг. URL: [http://www.who.int/immunization/global\\_vaccine\\_action\\_plan/DoV\\_GVAP\\_2012\\_2020/ru/](http://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/DoV_GVAP_2012_2020/ru/) (05.03.2018).
5. Корь. Под ред. В.Ф. Попова. М., Медицина, 1985.
6. Мир в 2050 году. Количественная оценка сдвигов в глобальной экономике (доклад банка HSBC). URL: [http://demographia.ru/articles\\_N/index.html?idArt=2019](http://demographia.ru/articles_N/index.html?idArt=2019) (05.03.2018).
7. Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Тотолян Арег А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках глобальной программы элиминации ко-

- ри. Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет. Под ред. А.Ю. Поповой. СПб, ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2017.
8. Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Тоголян Арег А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках глобальной программы элиминации кори. Сообщение 1. Инфекция и иммунитет. 2016, 6 (4): 353-358. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-353-358.
  9. Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Тоголян Арег А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках глобальной программы элиминации кори. Сообщение 2. Инфекция и иммунитет. 2017, 7 (1):79-84. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-353-358
  10. Accelerating Progress towards Measles/Rubella Control and Elimination Goals. The 14th Global Measles and Rubella Laboratory Network Meeting, Geneva, 21-23 June 2016. Laboratory Recommendations. URL: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/laboratory/MR\\_labnet\\_Recommendations\\_2016.pdf?ua=1](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/laboratory/MR_labnet_Recommendations_2016.pdf?ua=1) (03.01.2018).
  11. Akalu H.B. Review on Measles Situation in Ethiopia; Past and Present. J. Trop. Dis. 2015, 4: 193.
  12. Andrews N. M. Liberia, Chad Top Measles Deaths. ALLAFRICA. URL: <http://allafrica.com/stories/201603290762.html> (03.03.2018).
  13. Basse V. E., Gasasira A., Weldegabriel G. et al. Impact of a Nationwide Measles Immunization Campaign and Routine Immunization in Nigeria, 2006-2010: A Critical Review of South-South, Nigeria. Sci. J. Public Health. 2015, 3(5): 693-698.
  14. Center for Disease Control and Prevention. Measles eradication: Recommendations from a meeting cosponsored by the WHO, the PAHO and CDC. MMWR. 1997, 46 (RR-II): 1-20.
  15. Debuse P. J., Lewis M. G., Mugerwa J. W. Pulmonary complications of measles in Uganda. J. Trop. Pediatr. 1970, 16 (4 ): 197-203.
  16. Dia N., Fall A., Ka R. et al. Epidemiology and Genetic Characterization of Measles Strains in Senegal, 2004-2013. PLoS ONE. 2015, 10(5): e0121704. doi:10.1371/journal.pone.0121704.
  17. Effects of Health Programs on Child Mortality in Sub-Saharan Africa. Ed.: Ewbank D.C., Gribble J.N. Washington, DC: The National Academies Press. 1993:208. doi: 10.17226/2208.
  18. Faneye A.O., Adeniji J. A., Olusola B. A. et al. Measles virus infection among vaccinated and unvaccinated children in Nigeria. Viral Immunology. 2015, 28(6):304-308.
  19. Foster A., Johnson G.J. Measles corneal ulceration and childhood blindness: Prevention and treatment. Tropical Doctor. 1988, 18 (2): 74-78.
  20. Gil Cuesta J., Mukembe N., Valentiner-Branth P. et al. Measles Vaccination Coverage Survey in Moba, Katanga, Democratic Republic of Congo, 2013: Need to Adapt Routine and Mass Vaccination Campaigns to Reach the Unreached. PLOS Currents Outbreaks. 2015; 1. doi: 10.1371/currents.outbreaks.8a1b00760dfd81481eb42234bd18ced3.
  21. Global distribution of measles and rubella genotypes — update. Wkly Epidemiol. Rec. 2006; 81 (51/52): 474-480.
  22. le Roux D.M., le Roux S.M., Nuttall J.J. et al. South African measles outbreak 2009-2010 as experienced by a paediatric hospital. S.Afr. Med. J. 2012, 102(9):760-764. doi:10.7196/SAMJ.5984.
  23. Mancini S., Coldiron M.E., Ronsse A. et al. Description of a large measles epidemic in Democratic Republic of Congo, 2010-2013. Conf. Health. 2014, 8:9. doi: 10.1186/1752-1505-8-9.
  24. Masresha B.G. Measles pre-elimination and resurgence in the African region. Global Measles Management Meeting Geneva 15-17 March 2011. Outline. Regional goal Routine immunization Second opportunity immunization through SIAs Measles case-based surveillance. URL: <http://www.slideserve.com/magar/measles-pre-elimination-and-resurgence-in-the-african-region> (03.01.2018).
  25. Masresha B. G., Dixon M.G., Kriss J.L. et al. Progress Toward Measles Elimination — African Region, 2013—2016. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 2017, 66(17): 436-443.
  26. Masresha B.G., Kaiser R., Eshetu M. et al. Progress toward measles preelimination — African region, 2011-2012 MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 2014, 63(13): 285-291.
  27. Measles Mortality Reduction — West Africa, 1996—2002. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 2004, 53(02): 28-30.
  28. Médecins Sans Frontières: Children who survived measles are now suffering from malnutrition and malaria. 24 Februar 2016. URL: [http://www.ecoi.net/local\\_link/320406/459656\\_de.html](http://www.ecoi.net/local_link/320406/459656_de.html) (05.03.2018).

29. Médecins Sans Frontieres. Democratic Republic of Congo: Fighting measles in South Kivu. 8 February 2017. URL: <http://www.msf.org/en/article/democratic-republic-congo-fighting-measles-south-kivu> (05.03.2018).
30. Médecins Sans Frontieres. Measles: mass vaccination in Katanga, DR Congo. 2008. URL: <http://www.msf.org.uk/article/measles-mass-vaccination-katanga-dr-congo> Accessed on february 2014 (05.03.2018).
31. Ntshoe G.M., McAnerney J.M., Archer B.N. et al. Measles Outbreak in South Africa: Epidemiology of Laboratory-Confirmed Measles Cases and Assessment of Intervention, 2009-2011. PLoS ONE. 2013; 8 (2): e55682. doi: 10.1371/journal.pone.0055682.
32. Ofori-Amaah S. The Control of Measles in Tropical Africa: A Review of Past and Present Efforts. Rev. Infect. Dis. 1983; 5 (3): 546-553.
33. Pan American Health Organization. Global Measles Eradication: Target 2010? EPI Newsletter. 1996, 18 (4): 1-3.
34. Saleh J.E.A. Trends of measles in Nigeria: A systematic review. Sahel Med. J. 2016;19:5-11. URL: [http://www.smjonline.org/temp/SahelMedJ1915-3978077\\_110300.pdf](http://www.smjonline.org/temp/SahelMedJ1915-3978077_110300.pdf) (02.02.2018).
35. Shibeshi M.E., Masresha B.G., Smit S.B. et al. Measles resurgence in southern Africa: challenges to measles elimination. Vaccine. 2014, 32(16):1798-807.
36. Strebel P. WHO, IVB/EPI. Status of Measles and Rubella Elimination — Regions and Global. Closing immunity gaps in older children and adults towards measles and rubella elimination: lessons learned and challenges. 10 May 2016. URL: [http://www.sabin.org/sites/sabin.org/files/status\\_of\\_measles\\_and\\_rubella\\_elimination\\_strebel.pdf](http://www.sabin.org/sites/sabin.org/files/status_of_measles_and_rubella_elimination_strebel.pdf) (05.03.2018).
37. Takahashi S., Metcalf S.J. E., Ferrari M. J. et al. Reduced vaccination and the risk of measles and other childhood infections post-Ebola. Science. 2015, 347( 6227): 1240-1242.
38. Uzicanin A., Eggers R., Webb E. et al. Impact of the 1996-1997 supplementary measles vaccination campaigns in South Africa. Int. J. Epidemiol. 2002, 31(5): 968-976.
39. WHO. African Region. Measles outbreaks and progress towards meeting measles pre-elimination goals. Wkly Epidemiol. Rec. 2012, 13(14): 129-136.
40. WHO. African regional guidelines for measles surveillance. Brazzaville, Congo: World Health Organization. 2011. URL: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/4854/1/A63\\_18-ru.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/4854/1/A63_18-ru.pdf?ua=1) (05.03.2018).
41. WHO. African regional guidelines for measles and rubella surveillance. 2015. URL: [http://www.afro.who.int/sites/default/files/2017-06/who-african-regional-measles-and-rubella-surveillance-guidelines\\_updated-draft-version-april-2015.pdf](http://www.afro.who.int/sites/default/files/2017-06/who-african-regional-measles-and-rubella-surveillance-guidelines_updated-draft-version-april-2015.pdf) (05.03.2018).
42. WHO. Global measles and rubella strategic plan: 2012—2020. Geneva, Switzerland: World Health Organ. 2012. URL: [http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2016/october/1\\_MTR\\_Report\\_Final\\_Color\\_Sept\\_20\\_v2.pdf](http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2016/october/1_MTR_Report_Final_Color_Sept_20_v2.pdf) (05.03.2018).
43. WHO. Measles elimination by 2020—a strategy for the African Region. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Regional Office for Africa. 2011. URL: [http://www.afro.who.int/en/downloads/doc\\_download/7189-afr-rc61-r1-measles-elimination-by-2020-a-strategy-for-the-african-region.html](http://www.afro.who.int/en/downloads/doc_download/7189-afr-rc61-r1-measles-elimination-by-2020-a-strategy-for-the-african-region.html) (03/11/2017).
44. WHO. Measles virus nomenclature update: 2012. Wkly Epidemiol. Rec. 2012, 87 (9): 73-80.
45. WHO. Millions of children to receive measles vaccine in north-eastern Nigeria. URL: <http://www.who.int/features/2017/measles-vaccination-nigeria/en> (05.03.2018).
46. WHO. Progress towards measles pre-elimination, African Region, 2011-2012. Wkly Epidemiol. Rec. 2014,13(89):141-152.
47. WHO. Reported measles cases and incidence rates by WHO Member States 2016, 2017 as of 11 April 2017. URL: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/surveillance\\_type/active/measles\\_monthlydata/en/index1.html](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/active/measles_monthlydata/en/index1.html) (05.03.2018).
48. WHO. Treating measles in children. WHO/EPI/TRAM/97.02. 2004: 64. URL: [http://www.who.int/immunization/programmes\\_systems/interventions/TreatingMeaslesENG300.pdf](http://www.who.int/immunization/programmes_systems/interventions/TreatingMeaslesENG300.pdf) (05.03.2018).
49. Yishay A.B., Kranker K. All-Cause Mortality Reductions from Measles Catchup Campaigns in Africa J. Hum. Res. 2015, 50(2): 516-547.

*Поступила 30.03.18*

Контактная информация: Антипова Анастасия Юрьевна, к.б.н.,  
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812)232-94-11

## **ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ И ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ИНФЕКЦИОННОЙ ЭТИОЛОГИЕЙ ЭТИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, И ПУТИ ВОЗМОЖНОЙ ИММУНОКОРРЕКЦИИ**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, <sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

В настоящее время наблюдается рост числа иммунозависимых заболеваний, в основе развития которых лежат нарушения нормального функционирования иммунной системы. В последние годы возрастает значимость условно патогенной микрофлоры в развитии патологии, ассоциированной с инфекцией. Внебольничная пневмония (ВП) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) характеризуются высокой заболеваемостью и смертностью. Включение в традиционную терапию иммуномодулирующих препаратов позволяет усилить ответ на уже проводимое лечение. Одним из отечественных иммуномодуляторов является препарат азоксимера бромид, назначение которого помогает сократить продолжительность и тяжесть заболевания, а также снизить частоту развития затяжных форм заболевания. Также в последние годы среди иммуномодулирующих препаратов особый интерес вызывают иммуномодуляторы бактериального происхождения, на основе которых конструируются антибактериальные терапевтические вакцины. Все перечисленное указывает на необходимость дальнейшей разработки патогенетической, в том числе и иммунокорригирующей терапии, особенно при тяжелом течении заболевания.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 100—109

Ключевые слова: внебольничная пневмония, ХОБЛ, адаптивный иммунитет, врожденный иммунитет, иммунотерапия, иммуномодуляторы, антибактериальные терапевтические вакцины

*Е.С.Korovkina<sup>1</sup>, М.П.Kostinov<sup>1,2</sup>*

## **IMMUNE MECHANISMS OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA AND COPD DUE TO INFECTIOUS ETIOLOGY AND METHODS OF IMMUNOTHERAPY**

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Novadays a growing number of immunodependent diseases observed. There are 3 main groups of diseases of the immune system: immunodeficiency, allergic and autoimmune diseases. Also at the foundation of the broken functions of the immune system could be the age of the patients, the chronic diseases, the localization of the inflammatory process, etiological characterization of the pathogen and various disorders of the immune system, especially in the case of existing genetic defects. In recent years, the increasing significance of conditionally pathogenic microflora in the development of pathology associated with the infection. Community-acquired pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are characterized by high morbidity and mortality. The inclusion in the traditional therapy drugs with immunomodulatory effects helps enhance the action the treatment. Azoximer bromide could helps to reduce the duration and severity of the disease and reduce the incidence of severe forms of the disease. Also in recent years, the immunomodulatory drugs are of special interest immunomodulators of bacterial origin on the basis of which are constructed of antibacterial therapeutic vaccine. All of the above indicates the need to further develop pathogenetic, including immunocorrecting therapy, especially in severe disease.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 100—109

Key words: community-acquired pneumonia, COPD, adaptive immunity, innate immunity, immunotherapy, immunomodulators, antimicrobial therapeutic vaccines

В настоящее время существует ряд проблем медицины, а именно рост числа иммунозависимых заболеваний. Как известно, существуют 3 основные группы заболеваний иммунной системы: иммунодефициты, аллергические и аутоиммунные заболевания. Также в основе нарушенных функций иммунной системы могут лежать возраст пациентов, наличие сопутствующих хронических заболеваний, локализация воспалительного процесса, этиологическая характеристика возбудителя и различные нарушения в работе иммунной системы, особенно в случае имеющих генетически обусловленных дефектов. В последние годы возросла роль условно патогенной микрофлоры в патологии человека, в частности, прослеживается существенный рост числа заболеваний, при которых ее значимость уже была доказана (внутрибольничные инфекции, аллергические заболевания, ряд онкологических заболеваний и др.) [4, 14]. Немаловажное значение играет и формирование резистентности к антибактериальным препаратам у бактериальных патогенов, поскольку этот процесс неоднозначен и оказывает разное влияние на исход воспалительного процесса [23]. Все перечисленное указывает на необходимость дальнейшей разработки патогенетической, в том числе и иммунокорректирующей терапии, особенно при тяжелом течении заболевания.

**Этиологическая характеристика внебольничных пневмоний.** Внебольничная пневмония (ВП) была и остается одной из актуальных проблем здравоохранения в связи с сохраняющейся высокой заболеваемостью и смертностью. В последние годы обращает на себя внимание возрастание числа больных с тяжелым и осложненным течением внебольничной пневмонии [8, 40]. Одной из главных причин тяжелого течения пневмонии является недооценка тяжести состояния пациента при поступлении в стационар, обусловленная скудной клинико-лабораторной и рентгенологической картиной в начальный период развития заболевания. В 14 — 40% случаев воспалительные заболевания легких на ранних этапах остаются нераспознанными, и лишь у 14% больных ВП правильный диагноз устанавливается в первые трое суток заболевания и назначается терапия, соответствующая клинической картине. От всех случаев заболевания пневмонией затяжные ее формы составляют от 12 до 40% [23]. Факторами риска неблагоприятного и затяжного течения ВП являются возраст пациентов, наличие сопутствующих заболеваний, обширность поражения легочной ткани, этиологическая характеристика возбудителя и различные нарушения в работе иммунной системы. К числу наиболее актуальных типичных бактериальных возбудителей пневмоний относятся *Streptococcus pneumoniae* (30 — 50% случаев), реже в роли этиологического фактора выступают *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*. У некоторых категорий пациентов в этиологии ВП возрастает роль *Pseudomonas aeruginosa*. Частота встречаемости других бактериальных возбудителей (*Chlamydia psittaci*, *Streptococcus pyogenes*, *Bordetella pertussis*) не превышает 3%; поражения легких, вызванные эндемичными микромицетами (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* и другие) в РФ встречаются крайне редко. Тяжелые внебольничные пневмонии могут также вызывать респираторные вирусы, наиболее часто вирусы гриппа, коронавирусы, риносинцитиальный вирус, метапневмовирус, бокавирус. Кроме того, при внебольничных пневмониях возможно выявление коинфекции более чем 2 возбудителями, которая может быть вызвана как ассоциацией различных бактериальных возбудителей, так и их сочетанием с респираторными вирусами, что приводит к более тяжелому течению и худшему прогнозу [12, 26, 35]. Необходимо отметить, что частота встречаемости различных возбудителей тяжелой ВП может существенно варьировать в зависимости от географической локализации, времени года и состояния иммунной системы пациентов.

Глобализация приводит к возникновению и распространению новых инфекций, которые не отвечают на традиционную терапию, в частности, это касается участия в развитии заболевания представителей условно патогенной микрофлоры. Кроме того, в настоящее время активно изучается природа формирования резистентности к антибактериальным препаратам у бактериальных патогенов, поскольку этот про-

цесс неоднозначен и оказывает разное влияние на исход воспалительного процесса при ВП [19].

**Особенности иммунного реагирования у взрослых с внебольничными пневмониями.** При анализе литературных данных выявляются схожие тенденции в характере иммунного ответа пациентов с внебольничными пневмониями (ВП). Так, у пациентов с легким и среднетяжелым течением заболевания отмечено увеличение числа зрелых Т-лимфоцитов (CD3+), цитотоксических (CD8+) и натуральных киллерных клеток (CD56+). Напротив, тяжелое течение ВП сопровождается снижением числа зрелых Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD4+), индекса CD4/CD8, при одновременном снижении уровня В-лимфоцитов (CD19+), на фоне повышения числа натуральных киллерных клеток (CD56+). Подобные изменения в группе пациентов с тяжелой формой ВП являются характерными для системных воспалительных процессов, но в то же время могут свидетельствовать о неадекватности иммунного ответа [15, 20]. Наибольший интерес представляют результаты проведенных исследований системы сывороточных цитокинов. Согласно данным той же группы авторов, у больных с легким и очаговым течением заболевания отмечалась равноценная активация оппозиционных пулов цитокинов в начале заболевания (IL-2, 4, 6, 8, TNF $\alpha$ ) с повышением IL-2, 4 и снижением содержания IL-6, 8 и TNF $\alpha$  в динамике. Напротив, тяжелое течение и долевое поражение легочной ткани сопровождалось дисбалансом цитокинового звена в виде увеличения содержания IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  и снижения IL-2, IL-4 (в сравнении с показателями больных с легким течением). Учитывая важнейшую регуляторную роль IL-2, IL-4 (синтезируемых соответственно Th1, Th2 лимфоцитами), можно предположить недостаточную межклеточную активацию специфических факторов клеточного звена иммунитета у больных с тяжелым течением, приводящую к усугублению инфекционного процесса. Ведущим цитокином, регулирующим функции фагоцитов, является IL-8, который выступает в роли хемотактического фактора, способствующего активации нейтрофилов. При этом, содержание IL-8 в сыворотке крови прямо зависят от объема поражения легочной ткани. У пациентов с адекватным ответом на проводимую терапию определялось повышение содержание IL-8, что характерно для системных воспалительных процессов, в то время, как в группе пациентов с затяжной пневмонией определялись пониженные значения IL-8. Показатели основных классов иммуноглобулинов в начальном периоде ВП также характеризовались более низкими значениями, что позволяет предположить наличие иммунокомплексного и аутоиммунного компонентов в патогенезе осложненного течения пневмоний [18, 34]. Недостаточность клеточного и гуморального механизмов иммунитета и дисбаланс цитокинового звена у больных внебольничной пневмонией определяет тяжесть течения данного заболевания.

**Этиология обострений ХОБЛ.** Важнейшим фактором, определяющим темпы прогрессирования бронхиальной обструкции, а также качество жизни пациентов с ХОБЛ, является частота обострений заболевания. В патогенезе обострений ХОБЛ выделяют инфекционные и неинфекционные факторы, причем до 80% обострений ХОБЛ имеют инфекционную природу. Доминирующими микроорганизмами при бактериологическом исследовании образцов мокроты (бронхиального секрета) у больных, переносящих обострение ХОБЛ, являются *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis*; реже выделяют *Haemophilus parainfluenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Удельный вес атипичных возбудителей (*Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae*) в развитии обострений не превышает 5%, однако точная распространенность данных инфекций неизвестна ввиду трудностей диагностики. Результаты исследований свидетельствуют, что степень тяжести ХОБЛ коррелирует с типом возбудителя. Так, у пациентов с ХОБЛ легкого/среднетяжелого течения обострение чаще всего обусловлено *S.pneumoniae*, по мере прогрессирования болезни выявляют *H. influenzae*, *M.catarrhalis*, *Enterobacteriaceae*. В случае тяжелого обострения нередко обнаруживают *P. aeruginosa* [5, 7].

До 30% случаев обострений ХОБЛ имеют вирусную природу, в частности, вирус гриппа и риновирус. Также следует учитывать, что в ряде случаев вирусная инфекция осложняется присоединением бактериальной флоры ХОБЛ [6].

**Состояние иммунного ответа у взрослых больных с ХОБЛ.** В основе патоморфологических изменений при хронической обструктивной болезни легких лежит хроническое воспаление в дыхательных путях, одновременно с которым развивается системное воспаление, приводящее к формированию внелегочных проявлений заболевания (дисфункция скелетной мускулатуры, депрессия, остеопороз, сердечно-сосудистая патология и др.). Механизмы развития и прогрессирования системного воспалительного процесса на протяжении многих лет являются предметом пристального изучения. В частности, отечественными учеными было показано, что нарушение соотношения уровня про- и противовоспалительных цитокинов в бронхолегочной ткани и сыворотке крови отражает формирование очагового и системного воспаления [17]. Установлено, что у больных ХОБЛ в сыворотке отмечается повышение уровня острофазных белков, прежде всего С-реактивного белка, что может быть следствием активации синтеза таких цитокинов, как TNF- $\beta$ , IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, усиления транскрипции нуклеарного фактора NF- $\kappa$ B. Однако при этом не происходит адекватного увеличения концентрации системных противовоспалительных медиаторов, таких как IL-1Ra [17, 29]. Высокий уровень трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ) в очаге воспаления приводит к качественным изменениям структуры легочной ткани, что способствует прогрессированию необратимой обструкции [32]. В ряде работ было проанализировано состояние клеточного иммунитета. Для ХОБЛ (особенно тяжелых форм) было характерно резкое подавление эффекторной функции клеточного звена иммунитета (дефицит активных Т-лимфоцитов с фенотипом CD3+, CD4+, CD25+, HLADR+) с одновременным нарушением регуляторного потенциала, отраженным низким (< 1,0) соотношением CD4/CD8. Повышенная готовность лимфоцитов периферической крови к апоптозу при ХОБЛ объясняется дефицитом зрелых форм [13]. Показатели клеточного иммунитета могут быть использованы для прогнозирования течения ХОБЛ и оценки эффективности терапии.

**Взаимосвязь врожденного и адаптивного иммунитета.** Первичная локализация инфекционного процесса определяется путем иммунизации. В подавляющем большинстве случаев инфекционный агент попадает в организм через слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта, дыхательной и мочеполовой систем, в связи с чем, ранние иммунологические события связаны с иммунной системой слизистых оболочек; дальнейшие инфекционные процессы ограничиваются органами, куда поступил патоген. В тех случаях, когда инфекционный агент находится во внеклеточном пространстве и не ограничен специфическим клеточными взаимоотношениями, он приобретает способность к распространению.

Известно, что основными функциями врожденного иммунитета являются идентификация чужеродных структур и их уничтожение при помощи фагоцитоза или эндогенно синтезируемых антибактериальных пептидов. Если это не приводит к элиминации патогена, то врожденные механизмы защиты подготавливают чужеродные клетки к взаимодействию с Т-лимфоцитами для последующего развития адаптивного иммунного ответа [24]. Ключевыми эффекторами врожденного иммунитета являются дендритные клетки, выполняющие роль связующего звена между врожденным и адаптивным иммунитетом, и естественные киллеры (NK). Реализация их функций осуществляется за счет захвата, процессинга антигенов и представления процессированных антигенных пептидов в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости Т-лимфоцитам. При этом в зависимости от природы антигена, его количества и других факторов поляризация иммунного ответа может быть направлена по Th1 или Th2 пути [2].

Для объяснения механизмов действия врожденного иммунитета сформулирована стратегия распознавания микроорганизмов на основе наличия у них общих патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs) при участии рецепто-

ров основных эффекторных клеток [2, 3]. Распознавание PAMPs осуществляется с помощью патоген-распознающих рецепторов (PRRs). У человека среди представителей PRRs выделяют Toll-подобные рецепторы (TLRs), NOD-подобные рецепторы (NLRs), RIG-I-подобные рецепторы (RIG-I-LRs) и C-тип лектиновые рецепторы (CLRs) [28].

В последнее десятилетие интенсивно исследуются функции и экспрессия в норме и при патологии TLRs, которые являются важными представителями семейства сигнальных PRRs [9, 27]. В настоящее время у человека описано около 23 членов семейства TLRs; наиболее охарактеризованными являются TLR1 — TLR9 [39]. В зависимости от локализации TLRs в клетке выделяют рецепторы, расположенные на цитоплазматической мембране и на мембранах внутриклеточных органелл клеток врожденного иммунитета (эозинофилов, макрофагов, нейтрофилов). Кроме того, имеются доказательства присутствия TLRs на Т- и В-лимфоцитах [31, 38].

Врожденные PRRs распознают микробные компоненты и продукты, отсутствующие в организме хозяина (липополисахариды бактериальной стенки, зимозан грибов, ДНК и РНК бактерий и вирусов и др.), эндогенные соединения (белки теплового шока, фибронектин, damage associated molecular patterns, DAMPs). В результате происходит активация тканевых макрофагов, которые начинают усиленно продуцировать PG, PAF и ряд цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), фагоцитоз и запуск продукции и секреции клетками молекул, непосредственно или опосредованно способствующих элиминации патогена [30].

**Особенности иммунного ответа при воспалительных заболеваниях бронхолегочной системы.** Органы иммунной системы распределены в организме таким образом, что наибольшее количество иммунокомпетентных клеток располагается в местах, контактирующих с внешней средой и являющихся анатомическими входными воротами для инфекции. Совокупность лимфоидной ткани, расположенной в слизистых оболочках, обозначается термином MALT (mucosal-associated lymphoid tissue). MALT представляет собой субэпителиальные скопления лимфоидной ткани, не ограниченные капсулой. Среди них наибольшее значение имеет бронхо-ассоциированная лимфоидная ткань, являющаяся первым звеном защиты от проникновения патогенов. В норме иммунные механизмы бронхоальвеолярного дерева представлены врожденными и адаптивными звеньями иммунной системы. К гуморальному звену мукозального иммунитета относятся иммуноглобулины различных классов (G, A, M). Еще одним фактором неспецифической защиты является система комплемента; особое значение отводится С3-компоненту комплемента, при нарушении активности которого наблюдаются частые инфекционные осложнения. Также к гуморальным факторам защиты относятся лизоцим, лактоферрин, фибронектин, интерферон, ингибиторы протеаз. Клеточное звено мукозального иммунитета включает альвеолярные макрофаги, нейтрофильные и эозинофильные гранулоциты, а также Т ( $\gamma$  и  $\delta$ ) и В-лимфоциты [24].

**Клинико-иммунологические особенности бронхолегочных заболеваний на фоне применения иммуномодуляторов.** В арсенале практикующего врача имеется достаточное количество иммунотропных препаратов, каждый из которых обладает собственным иммуномодулирующим действием на различные звенья иммунной системы. При грамотном назначении иммуномодуляторы позволяют значительно повысить эффективность терапии, особенно при недостаточном ответе на проводимое лечение. Отдельно следует обратить внимание на то, что иммуномодуляторы не оказывают непосредственного воздействия на инфекционный фактор. У препаратов группы иммуномодуляторов есть четко определенные показания к применению, которые необходимо соблюдать. К ним относятся: повышение эффективности этиотропной противoinфекционной терапии и предупреждение развития инфекционных осложнений у лиц из групп риска; увеличение длительности ремиссии и снижения частоты обострений при хронических рецидивирующих инфекционно-воспалительных заболеваниях [10, 11, 22]. Согласно литературным данным лишь незначительное

число препаратов прошли необходимые лабораторные и клинические исследования, подтверждающие их эффективность и безопасность. Сведения об эффективности иммуномодуляторов являются крайне противоречивыми.

**Эффективность применения азоксимера бромид.** Одним из отечественных иммуномодуляторов является оригинальная молекула азоксимера бромид (полиоксидоний). Азоксимер бромид относится к высокомолекулярным химически чистым иммуномодуляторам, чья активность обусловлена его прямым воздействием на фагоцитирующие клетки и НК-клетки за счет чего препарат способен опосредованно стимулировать антителообразование. Антиоксидантные свойства азоксимера бромид связаны с его способностью к перехвату в водной среде активных форм кислорода, супероксидного аниона, перекиси водорода, гидроксильного радикала. Он способен снижать концентрацию каталитически активного двухвалентного железа, ингибируя перекисное окисление липидов, подавлять спонтанную и индуцированную хемилюминесценцию. Мембранопротекторные свойства препарата защищают клетки от повреждающего воздействия ряда токсических веществ. В настоящее время накоплен большой клинический опыт применения полиоксидония в комплексной терапии ряда тяжелых хронических инфекционно-воспалительных процессов (внебольничных пневмоний, туберкулеза, хронического лимфолейкоза, гепатитов, псориаза [22].

В исследование (2005—2010 гг., г. Уфа) были включены 105 больных в возрасте от 16 до 65 лет с внебольничной пневмонией различной степени тяжести, из них выделено 45 пациентов с тяжелым течением внебольничной пневмонии. Данная группа была разделена на две подгруппы: 25 больных, получавших в комплексном лечении азоксимера бромид 6 мг в/м через день, в течение 10 дней с 3-4 дня пребывания в стационаре, и подгруппа сравнения (20 пациентов), получавших стандартную терапию (без применения иммунокоррекции), сопоставимая с основными группами по полу, возрасту и степени тяжести. Иммунологическое обследование больных обеих подгрупп по окончании курса терапии установило однонаправленные изменения, характеризующиеся нормализацией показателей естественной резистентности, более выраженными на фоне применения полиоксидония (основная подгруппа). Статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличились показатели фагоцитоза, содержание натуральных киллеров ( $p < 0,01$ ), по результатам НСТ-теста отмечалась нормализация функциональных показателей фагоцитов. Однако при этом не отмечено достоверных изменений в системе комплемента. Наряду с перечисленными эффектами, установленными в ходе исследования, существенным результатом комплексной терапии больных с включением полиоксидония явилось статистически значимое ( $p < 0,05$ ) повышение относительного показателя CD3+, CD4+ в основной подгруппе. Следует отметить, что у большинства больных ВП тяжелой степени, получавших стандартную терапию, без иммунокоррекции сохранялись нарушения Т-лимфоцитарного звена. Одним из патогенетически значимых моментов в формировании осложнений при пневмонии является подавление гуморальных факторов защиты (В-лимфопения, снижение иммуноглобулинов М, G), поэтому нормализация уровня CD19+ стала положительным эффектом терапии, хотя достоверных различий в подгруппах по этим показателям не отмечалось. В целом комплексная базисная терапия больных ВП оказала определенное влияние на восстановление содержания иммуноглобулинов: уровень IgG повысился в обеих подгруппах без достоверных различий между ними; подобная динамика наблюдалась и в значениях IgM, однако на фоне применения полиоксидония уровень IgA стал достоверно выше, чем в подгруппе сравнения [16]

Во всех случаях установлен высокий клинический эффект, проявляющийся в снижении числа и тяжести рецидивов, уменьшении объема принимаемых лекарственных средств, сокращении времени пребывания на стационарном лечении. Таким образом, использование полиоксидония в острый период болезни должно проводиться одновременно с назначением антибактериальной терапии, в то

время как на реабилитационном этапе возможно его использование в качестве монотерапии.

Хотя на практике имеет место применение и других иммуномодуляторов, в доступной литературе не удалось найти данных по их клиническому использованию при ВП. Не существует четких показаний и рекомендаций к применению, в частности, азоксимера бромид при тяжелых и затяжных формах ВП, а также использование его в качестве профилактического средства в группе больных после перенесенной внебольничной пневмонии. Изложенное определяет необходимость дальнейшего изучения иммунопатологических изменений, развивающихся при ВП различной степени тяжести, а также определение места химически чистых иммуномодуляторов, к которым относится полиоксидоний, в терапии и иммунореабилитации данного заболевания.

**Антибактериальные терапевтические вакцины.** Поскольку PAMPs бактерий, вирусов и грибов являются мощными активаторами врожденного иммунного ответа, очевидно, что на их основе возможно создание высокоэффективных иммуноотропных лекарственных препаратов. По направленности препараты этого ряда могут быть двух типов: агонисты TLRs — иммуностимулирующие препараты для лечения различных видов иммунодефицитов, и антагонисты TLRs — иммуносупрессанты для терапии хронических иммуновоспалительных заболеваний. В настоящее время работы по созданию таких препаратов активно ведутся за рубежом. Например, минимальные биологически активные фрагменты, выделенные из бактериальной ДНК — CpG олигонуклеотиды (агонисты TLR9) или из ЛПС — монофосфориллипид А (агонист TLR4) уже используются в качестве адъювантов, включаемых в состав вакцин с целью усиления их иммуногенных свойств. Синтетические агонисты TLR7/8 (квимоды) имеют длительную историю применения в качестве противовирусных лекарственных препаратов. Новая генерация синтетических агонистов TLR7/TLR8 (R-848 и 3M-002) демонстрирует мощные иммуностимулирующие свойства: инициируют продукцию цитокинов типа Th1 (ФНО $\alpha$ , ИЛ12) на достаточно высоком уровне [19].

В последние годы среди иммуномодулирующих препаратов особый интерес вызывают иммуномодуляторы бактериального происхождения, на основе которых конструируются так называемые терапевтические вакцины, обладающие наряду с неспецифическим действием способностью стимулировать антигенспецифический ответ [38]. Эффект препаратов указанной группы связан со способностью активировать систему врожденного иммунитета за счет наличия в своем составе патоген-ассоциированных молекулярных структур [3, 14].

**Эффективность препарата Иммуновак-ВП4.** Антибактериальная терапевтическая вакцина Иммуновак-ВП4 представляет собой лизат-антигены условно патогенных микроорганизмов *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *E. coli*. Клинико-иммунологический эффект действия Иммуновак-ВП-4 исследован при разных методах введения у взрослых и детей. Иммунотерапию проводили при аллергических заболеваниях (бронхиальная астма, атопический дерматит, латексная аллергия), при гнойно-воспалительных заболеваниях органов дыхания (хронический бронхит, абсцесс легких, внебольничная пневмония), герпесвирусной инфекции, пиодермиях и др., что позволяло модифицировать течение заболевания с тяжелых форм в более легкие [1, 3, 21]. Полученные в клинике данные подтверждаются экспериментальными исследованиями, в которых на молекулярно-клеточном уровне выявлен механизм действия иммуномодуляторов микробного происхождения. В частности, было показано, что вакцина является мощным индуктором созревания дендритных клеток, что проявляется экспрессией маркера терминальной дифференцировки (CD83), костимуляторных молекул (CD40, CD80, CD86), молекул антигенного представления (МНС I и МНС II), синтезом цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ ) и усилением способности дендритных клеток предъявлять антигены (бактериальные, опухолевые) T-лимфоцитам. В этих же исследованиях *in vivo* при однократной им-

мунизации мышей также установлено, что Иммуновак-ВП-4 вызывает продукцию цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 и IFN $\gamma$ ), усиливает пролиферативную и цитотоксическую активность НК-клеток. Такой механизм действия обеспечивает высокую протективную активность Иммуновак-ВП-4 в отношении различных этиологически значимых представителей условно патогенной микрофлоры. Активированные Иммуновак-ВП-4 дендритные клетки синтезируют IL-12, который является ведущим цитокином, программирующим дифференцировку Т-лимфоцитов по Th1-пути. Важную роль в реализации защиты от различных патогенов играют и другие цитокины, уровень которых существенно повышался при введении данного препарата. Выявленные особенности действия при назначении данной антибактериальной терапевтической вакцины подтверждают первичность изменений иммунной системы в этиопатогенезе заболеваний, вызываемых условно патогенной микрофлорой, и значительную их роль в развитии аллергопатологии.

**Эффект препарата ОМ-85.** Препарат ОМ-85 представлен стандартизованным лиофилизатом лизатов бактерий — Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus viridans, Streptococcus pyogenes, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella ozaenae, Staphylococcus aureus, Moraxella catarrhalis. В основе действия лекарственного средства лежит активирующее воздействие на иммунокомпетентные клетки, расположенные в лимфоидной ткани кишечника (пейеровы бляшки). В-лимфоциты, стимулированные PAMPs, мигрируют в респираторный тракт через кровеносные и лимфатические пути, где созревают в плазматические клетки, продуцирующие антиген-специфичные антитела [25].

Эффективность и безопасность ОМ-85 хорошо изучены и доказаны в рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях во всех возрастных группах. При этом большинство клинических исследований эффективности и безопасности препарата было проведено у взрослых пациентов. В исследовании Soler M. et al. было показано, что ОМ-85 статистически значимо уменьшает частоту обострений у пациентов с хроническим бронхитом или ХОБЛ, в особенности у бывших курильщиков [36]. В рандомизированном двойном слепом исследовании Otsel V. et al. было показано, что назначение препарата на 40% уменьшил частоту инфекционных обострений у пациентов пожилого возраста с ХОБЛ и на 28% снизил общее количество инфекций нижних дыхательных путей в данной группе больных [33]. Применение ОМ-85 в целях профилактики обострений заболевания в двойном слепом исследовании плацебо контролируемом исследовании у 428 пациентов с ХОБЛ обеспечило уменьшение риска госпитализации больных и, следовательно, стоимости лечения пациентов [37]. Таким образом, во всех проведенных исследованиях было показано, что применение данного препарата снижает потребность в дополнительном назначении других лекарственных препаратов, в частности антибиотиков, что позволяет избежать иммуносупрессивного действия последних, появления устойчивых штаммов микроорганизмов и развития других осложнений антибиотикотерапии, а также сократить общие затраты на лечение пациентов. Тем не менее, влияние препарата на механизмы активации параметров врожденного и адаптивного иммунитета на ранних стадиях воспалительного процесса изучено недостаточно. Изучение каскада иммунопатологических реакций может способствовать расширению спектра показаний к назначению антибактериальных терапевтических вакцин.

Таким образом, данные, полученные в ходе проведенных исследований, свидетельствуют о необходимости использования иммунотерапии, в том числе и при заболеваниях, вызываемых условно патогенной микрофлорой. Иммуномодулирующая терапия, назначенная по строго конкретным показаниям, позволит не только добиться контроля над симптомами заболевания, но и значительно сократить частоту и длительность обострений, увеличить период ремиссии и снизить потребность в антибактериальной терапии. Предпочтение при этом имеют препараты с широким спектром действия на систему врожденного и адаптивного иммунитета. Следует об-

ратить внимание на то, что иммуномодуляторы не обладают самостоятельной антибактериальной и противовирусной активностью, недопустимо их бесконтрольное и необдуманное назначение. Именно поэтому использование иммуномодулирующих препаратов в качестве дополнения к базисной терапии, является необходимым и требует дальнейшего изучения с целью разработки оптимальных схем лечения и иммунореабилитации пациентов с воспалительными заболеваниями бронхолегочной системы, в частности, при внебольничных пневмониях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Афиногенова В.П., Лукачев И.В., Костинов М.П. Иммуноterapia: механизм действия и клиническое применение иммунокорректирующих препаратов. *Лечащий врач*. 2010,4:9.
2. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет противоопухолевый и противои-  
фекционный. М., Практическая медицина, 2008.
3. Ахматов Э.А., Уткина Н.П., Ильиных Е.А., Сорокина Е.А., Маракасова Е.С., Курбатова Е.А.,  
Лебединская О.В., Ахматова Н.К. Влияние разных способов аппликации бактериальных лигандов на экспрессию цитокинов. *Журн.микробиол.* 2014, 1:24-30.
4. Данилов Л.А., Абабий И.И., Манюк М.К., Абабий П.И., Уцика И.Ю. Значение микробной  
флоры ротоглотки в развитии острых и хронических заболеваний верхних дыхательных путей.  
*Оториноларингология. Восточная Европа*. 2014, 14:121-130.
5. Зайцев А.А., Нерсисян М.Ю., Тюрина И.В. Обострение хронической обструктивной болезни  
легких. *Практические рекомендации. Фарматека*. 2014, 15:51-57.
6. Зайцев А.А., Овчинников Ю.В., Безлепко А.В. Клинические рекомендации по ведению боль-  
ных с обострением хронической обструктивной болезни легких. *Военно-медицинский журнал*.  
2015, 3:31-37.
7. Зайцев А.А., Синопальников А.И. Антибактериальная терапия и профилактика обострений  
хронической обструктивной болезни легких. *Consilium Medicum*. 2014,11:51-54.
8. Иванова Е.В., Биличенко Т.Н., Чучалин А.Г. Заболеваемость и смертность населения трудоспо-  
собного возраста России по причине болезни органов дыхания в 2010-2012 гг. *Пульмонология*.  
2015, 3:291-297.
9. Коровкина Е.С., Кажарова С.В. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе воспалительных  
заболеваний бронхолегочной системы. *Инфекция и иммунитет*. 2016, 2(6):109-116.
10. Коровкина Е.С., Костинов М.П., Кажарова С.В. Возможности использования иммуномодуля-  
торов в комплексной терапии внебольничных пневмоний. *Журн. микробиол.* 2017, 4:101-111.
11. Костинов М.П. Руководство по клинической иммунологии в респираторной медицине. М.,  
2016.
12. Костинов М.П., Чучалин А.Г., Коровкина Е.С. Инновационная вакцина против пневмококковой  
инфекции в профилактике обострений хронических заболеваний у взрослых. *Здравоохранение  
Российской Федерации*. 2015, 5:49-53.
13. Кострова Т.О., Лисаченко Г.В., Шабалдин А.В. Клинико-иммунологические аспекты хроничес-  
кой обструктивной болезни легких. *Медицинская иммунология*. 2010, 3:207-212.
14. Краснопрошина Л.И., Серова Т.А., Фошина Е.П., Бишева И.В., Сходова С.А. Особенности  
иммунного ответа при различных схемах применения бактериальной терапевтической вакцины  
Иммуновак ВП-4. *Журн. микробиол.* 2017, 4:24-30.
15. Мавзютова Г.А., Мухамадиева Л.Р., Фазлыева Р.М. Клинический подход к иммунокоррекции  
при внебольничных пневмониях. *Медицинский совет*. 2017, 11:58-63.
16. Мавзютова Г.А., Мухамадиева Л.Р., Фазлыева Р.М., Мирсаева Г.Х., Тюрина Е.Б. Рациональная  
иммунокоррекция в комплексной терапии внебольничной пневмонии. *Медицинский совет*.  
2015, 16: 68-73.
17. Мамаева М.Г., Демко И.В., Вериго Я.И., Крапошина А.Ю., Соловьева И.А., Хендогина В.Т.  
Маркеры системного воспаления и эндотелиальной дисфункции у больных хронической об-  
структивной болезнью легких. *Сибирское медицинское обозрение*. 2014,[https://elibrary.ru/  
contents.asp?issueid=1263868&selid=21487034](https://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1263868&selid=21487034) :12-19.
18. Маркелова Е.В., Гельцер Б.И., Корявченкова И.В., Костюшко А.В. Состояние системы цито-  
кинов при нозокомиальных пневмониях. *Цитокины и воспаление*. 2003, 1:14-19.
19. Маркушин С.Г. Особенности врожденного иммунитета при вирусных инфекциях.  
*Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012, 62(1):72-81.

20. Мухамадиева Л.Р., Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Амирова Г.Ф., Камаева Э.Р. Иммунологические аспекты патогенетической терапии внебольничной пневмонии. *Российский иммунологический журнал*. 2015, 2(1):28-30.
21. Татевосов В.Р., Шубин И.В., Костинов М.П., Чучалин А.Г. Оценка результатов вакцинотерапии в комплексном лечении внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста в организованных коллективах. *Медицинский вестник МВД*. 2013, 67(6):60-63.
22. Хайтов Р.М., Атауллаханов Р.И. Иммунотерапия. Руководство для врачей. М., ГЭОТАР-Медиа, 2011.
23. Чучалин А.Г. Затяжная пневмония. *Пульмонология*. 2014, 3:5-14.
24. Ярилин А.А. Иммунология. М., ГЭОТАР-Медиа, 2010.
25. Braido F., Melioli G., Cazzola M. et al. AIACE Study Group. Sub-lingual administration of a polyvalent mechanical bacterial lysate (PMBL) in patients with moderate, severe, or very severe chronic obstructive pulmonary disease (COPD) according to the GOLD spirometric classification: A multicentre, double-blind, randomised, controlled, phase IV study (AIACE study: Advanced Immunological Approach in COPD Exacerbation). *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2015, 33:75-80.
26. Ishiguro T., Yamaguchi Sh. et al. Etiology and factors contributing to the severity and mortality of community-acquired pneumonia. *Internal. Medicin.* 2013, 52(3):317-324.
27. Jimenez-Dalmaroni M.J., Gerswhin M.E., Adamopoulos I.E. The critical role of toll-like receptors — from microbial recognition to autoimmunity: a comprehensive review. *Autoimmunity Reviews*. 2016, 15(1):1-8.
28. Kumar S., Ingle H., Prasad D.V., Kumar H. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit. Rev. Microbiol.* 2013, 39(3):229-246.
29. Lin X., Fan Y., Wang X. et al. Correlation Between Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$  in Exhaled Breath Condensate and Pulmonary Function. *Am. J. Med. Sci.* 2017, 354(4):388-394.
30. Lundberg K., Rydnert F., Greiff L., Lindstedt M. Human blood dendritic cell subsets exhibit discriminative pattern recognition receptor profiles. *Immunology*. 2014, 142(2):279-288.
31. Mohammadi A., Mehrzad J., Mahmoudi M., Schneider M. Environmentally Relevant Level of Aflatoxin B1 Dysregulates Human Dendritic Cells Through Signaling on Key Toll-Like Receptors. *Int. J. Toxicol.* 2014, 33(3):175-186.
32. O'Neal W., DeMeo D.L., Li X. et al. The value of blood cytokines and chemokines in assessing COPD. *Respir. Res.* 2017, 18(1):180.
33. Orceel B., Delclaux B., Baud M., Derenne J.P. Oral immunization with bacterial extracts for protection against acute bronchitis in elderly institutionalized patients with chronic bronchitis. *Eur. Respir. J.* 1994, 7(3):446-452.
34. Rendon A., Rendon-Ramirez E.J., Rosas-Taraco A.G. Relevant cytokines in the management of community-acquired pneumonia. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2016, 18(3):10.
35. Rynda-Apple A., Robinson K.M., Alcorn J.F. Influenza and bacterial superinfection: illuminating the immunologic mechanisms of disease. *Infect. Immun.* 2015, 83(10):3764-3770.
36. Solér M., Mütterlein R., Cozma G. Double-blind study of OM-85 in patients with chronic bronchitis or mild chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*. 2007, 74(1):26-32.
37. Tang H., Fang Z., Sabogno G.P., Xiu Q. Efficacy and Safety of OM-85 in Patients with Chronic Bronchitis and/or Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Lung*. 2015, 193(4):513-519.
38. Trembl L.S., Carlesso G., Hoek K.L. et al. TLR stimulation modifies BlyS receptor expression in follicular and marginal zone B cells. *J. Immunol*, 2007, 178(12):7531-7539.
39. Vashishta M., Khan N., Mehto S. et al. Pneumococcal Surface Protein A (PspA) Regulates Programmed Death Ligand 1 Expression on Dendritic Cells in a Toll-Like Receptor 2 and Calcium Dependent Manner. *PLoS One*. 2015, 10(7):e0133601.
40. WHO Media Center 2014. The top 10 causes of death. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.

*Поступила 13.03.18*

Контактная информация: Коровкина Елена Сергеевна, к.м.н.,  
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

## **ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗ КАК ПЕРСИСТЕНТНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ЭТИОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ**

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, Владивосток

В обзоре обсуждаются патогенетические особенности псевдотуберкулеза, предопределяющие возможность рецидивирования болезни и развитие персистентной инфекции. Среди них заслуживают внимания повреждение лимфоидных органов с развитием вторичного иммунодефицита, гранулематозное воспаление, эффероцитоз, связанный с поглощением инфицированных *Yersinia* апоптических, фосфатидил-позитивных нейтрофилов. Эффероцитоз как одна из антимикробных стратегий полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ) уменьшает повреждение окружающей ткани и увеличивает выработку противовоспалительных молекул, при этом инфицированные иерсиниями ПЯЛ могут действовать как промежуточный хозяин для последующей невоспалительной инфекции макрофагов. Предрасположенность *Yersinia*, включая *Y. pseudotuberculosis*, к персистенции ассоциирована с генетически детерминированными факторами патогенности бактерий, главным образом с их антифагоцитарными свойствами и способностью продуцировать цитотоксический некротизирующий фактор (CNFY).

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 110—119

Ключевые слова: псевдотуберкулез, *Yersinia pseudotuberculosis*, рецидивирование, персистентная инфекция, этиопатогенетические предпосылки, цитотоксический некротизирующий фактор (CNFY)

*L.M.Somova, B.G.Andryukov, N.F.Timchenko, E.K.Psareva*

## **PSEUDOTUBERCULOSIS AS PERSISTENT INFECTION: ETIOPATHOGENETIC PRECONDITIONS**

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

The review discusses the pathogenetic features of pseudotuberculosis, which predetermine the possibility of recurrence of the disease and persistent infection. Among them deserve attention the damage of lymphoid organs with the development of secondary immunodeficiency, granulomatous inflammation, efferocytosis, associated with the absorption of apoptotic, phosphatidyl-positive neutrophils. Efferocytosis as one of the antimicrobial strategies of polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) reduces the damage to surrounding tissue and increases the production of anti-inflammatory molecules, while the *Yersinia* infected PMNLs can act as an intermediate host for the subsequent non-inflammatory infection of macrophages. The predisposition of *Yersinia*, including *Y. pseudotuberculosis*, to persistence is associated with genetically determined bacterial pathogenicity factors, mainly with their antiphagocytic properties and the ability to produce a cytotoxic necrotic factor (CNFY).

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019. No. 2, P. 110—119

Key words: pseudotuberculosis, *Yersinia pseudotuberculosis*, recurrence, persistent infection, etiopathogenetic preconditions, cytotoxic necrotizing factor (CNFY)

Представления о патогенезе псевдотуберкулеза у человека трансформировались вплоть до конца XX столетия. К началу 1990-х годов на основании интегральной оценки патологического процесса была установлена многозвенность патогенетической цепи инфекции, определяющей чрезвычайный полиморфизм клинических проявлений болезни [3]. Систематизация данных отечественной и зарубежной ли-

температуры о развитии инфекционного процесса, а также результаты собственных экспериментальных исследований на пероральной модели *Yersinia pseudotuberculosis*-инфекции позволили авторам обосновать современную концепцию о пато- и морфогенезе псевдотуберкулеза и выделить следующие фазы патогенеза болезни: 1) фаза заражения через слизистые оболочки пищеварительного тракта; 2) фаза размножения возбудителя во входных воротах с развитием первично-очаговых изменений (фарингит, ангина, гастроэнтерит, энтерит); 3) фаза первичной бактериемии, гематогенной и лимфогенной генерализации возбудителя; 4) фаза вторично-очаговых изменений (терминальный илеит, аппендицит, илеотифлит, гепатит и др.) и алергизации организма; 5) фаза повторной бактериемии с рецидивами и обострениями инфекции; 6) фаза санации организма и репарации. При септических осложнениях возможны летальные исходы заболевания.

Рецидивирующее течение псевдотуберкулеза взаимосвязано с особенностями противoinфекционной защиты организма при этой инфекции. Частота возникновения рецидивов колеблется от 13,4% до 69,5% [2, 6], когда преимущественно возникают артралгии до 89,2% случаев и абдоминальные боли до 85,3% случаев, связанные с поражением илео-цекального отдела кишечника и печени [2, 5].

В ответ на заражение *Y. pseudotuberculosis* в местном очаге первоначально возникает защитная реакция макрофагов, которые захватывают, но не переваривают бактерии, и сами погибают. Бактерии продолжают размножаться вне клеток, образуя микроколонии. Вокруг них возникает лейкоцитарная реакция, однако лейкоциты, не фагоцитируя бактерии, подвергаются распаду. При благоприятном течении инфекции наряду с подавлением роста бактерий и продолжающимся притоком лейкоцитов вокруг очагов воспаления накапливаются макрофаги и лимфоциты, происходит формирование псевдотуберкулезных гранулем, отграниченных соединительнотканной капсулой от окружающей ткани. При этом выявлен неизвестный ранее механизм взаимодействия возбудителя псевдотуберкулеза с нейтрофилами, названный нефагоцитарным типом резистентности [4]. Суть его заключается в том, что выздоровлению от псевдотуберкулеза способствует не фагоцитарная реакция, легко подавляемая возбудителем, а гибель нейтрофилов в результате кариорексиса с накоплением в очагах воспаления продуктов распада их ядер, в результате чего обезвреживание возбудителя обеспечивает богатая аргинином фракция ядерного гистона, обладающая антимикробным действием.

Анализ собственных и литературных данных позволил нам сделать вывод о нарушениях во всех звеньях иммунофагоцитарной системы при псевдотуберкулезе с нередким развитием вторичного иммунодефицита вследствие специфического повреждения лимфоидной ткани и дефектности функционирования фагоцитов [3, 10]. С развитием относительного иммунодефицита тесно связана склонность заболевания к обострениям и рецидивам, являющимся одним из важных звеньев патогенеза псевдотуберкулеза. Следует отметить, что гранулематозное воспаление при псевдотуберкулезе считается наиболее типичной тканевой реакцией, создающей условия для персистенции возбудителя.

В первое десятилетие XXI столетия, с внедрением современных технологий молекулярно-иммунологических исследований кардинально изменились представления о патогенетическом значении клеток врожденной иммунной системы при *Yersinia*-обусловленных инфекциях. Появились доказательства того, что патогенные для человека виды *Yersinia* (включая *Y. pseudotuberculosis*) преимущественно инактивируют клетки врожденного иммунитета, что считается важной стратегией, с помощью которой эти бактерии избегают элиминации и вызывают заболевание. Установлено, что в ответ на заражение иерсиниями фундаментальную роль в первичной иммунной защите и в ограничении диссеминации бактерий в организме играют полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ), которые используют несколько механизмов для ликвидации бактерий: фагоцитоз, оксидативный стресс, секреторную дегрануляцию, образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) и эффе-

роцитоз [1, 11, 34]. Именно эффероцитоз посредством поглощения апоптических, фосфатидил-позитивных ПЯЛ уменьшает повреждение окружающей ткани, предотвращая высвобождение ПЯЛ-микробицидных агентов, увеличивает выработку противовоспалительных молекул и подавляет воспалительные молекулы, при этом инфицированные ПЯЛ могут действовать как промежуточный хозяин для последующей невоспалительной инфекции макрофагов [44]. По нашему мнению, эффероцитоз может быть одним из механизмов, обеспечивающих персистенцию возбудителя псевдотуберкулеза.

В настоящее время доказано, что ПЯЛ играют фундаментальную роль в ограничении первоначального распространения бактерий в кишечной ткани, и *Y. pseudotuberculosis* демонстрирует способность избегания противомикробного действия этих в норме очень эффективных иммунных клеток [33]. Инфекция у ПЯЛ-истощенных мышей, вызванная «диким» типом *Y. pseudotuberculosis*, была лишь легкой при отсутствии ПЯЛ, в то время как уорН, уорЕ и уорК мутанты возбудителя с аттенуированной вирулентностью имели более высокий инфекционный потенциал при отсутствии ПЯЛ [46]. Более быстрая диссеминация в мезентериальные лимфатические узлы также отражалась в симптомах болезни ПЯЛ—истощенных мышей, инфицированных уорЕ или уорК мутантами, у которых симптомы заболевания развивались раньше, чем у ПЯЛ-неистощенных мышей. L. Westermarck et al. (2014) подтвердили, что нейтрофилы играют важную роль в иммунной защите против *Y. pseudotuberculosis* и несут ответственность за ограничение способности уорН и уорЕ мутантов вызывать системное заболевание. Аттенуированные мутанты могут достичь мезентериальных лимфатических узлов в отсутствие ПЯЛ, что обосновывает патогенетическое значение этих клеток в ограничении бактериальной диссеминации и генерализации псевдотуберкулезной инфекции.

Особенности патоморфологии псевдотуберкулеза указывают на то, что чем медленнее происходит формирование иммунологической защиты против инфекции, тем чаще могут возникать рецидивы и обострения патологического процесса, опосредованные нефагоцитарным типом резистентности организма и антифагоцитарной устойчивостью возбудителя [10]. Фаза рецидивов и обострений инфекции — одно из закономерных звеньев в патогенезе псевдотуберкулеза. Наличие очагов воспаления и гранулем в органах и тканях на различных стадиях формирования подтверждает рецидивирующий характер инфекции. Рецидивирующий псевдотуберкулез расценивают как заболевание с аутоиммунным (узловатая эритема) и иммунодефицитным компонентами [3, 6, 11, 18].

У большинства больных псевдотуберкулезом и у животных, зараженных сублетальными дозами возбудителя, на 2-4-й нед. заболевания наступает иммунологическая перестройка с преобладанием реакций клеточного иммунитета (гиперчувствительности замедленного типа). Это обеспечивает постепенное освобождение организма от возбудителя в период реконвалесценции, санацию очагов инфекции, репаративные изменения в них и выздоровление больного или животного. Сейчас общепризнано, что *Yersinia* размножаются в основном внеклеточно и основное патогенное действие оказывают за счет секретируемых веществ, в том числе через систему III типа секреции (Т3SS). *Y. pseudotuberculosis* резистентны к фагоцитозу нейтрофилами и макрофагами, и стратегия их выживания в организме основана на способности преодолевать механизмы неспецифического иммунного ответа хозяина.

Это согласуется с данными Simonet M. и Berche P. [41] о депрессивном действии вирулентных штаммов *Y. pseudotuberculosis* на иммунную систему. Установлено, что при псевдотуберкулезе О-антигенемия и повышенный уровень специфических IgM, IgG, IgA выявляются уже на 1-2 нед., а IgM сохраняются до 1-2 мес. от начала заболевания [9]. Более длительно (от 3 до 12 мес.) персистируют IgG и IgA. Затяжное и рецидивирующее течение характеризуется более продолжительной О-антигенемией, более поздним появлением антител и длительной продукцией специфического IgA,

обусловленной, по-видимому, персистенцией иерсиний и постоянным антигенным раздражением иммунной системы. Цитопатическое действие возбудителя и длительная персистенция в лимфатических узлах и селезенке определяют повторные волны бактериемии, сопровождающиеся генерализацией инфекции с рецидивами и обострениями [3].

Поскольку возбудитель псевдотуберкулеза в различные периоды болезни неоднократно поступает в лимфатические узлы через кровь и лимфу, возникает резкая сенсibilизация лимфоидной ткани. Вследствие этого в светлых центрах лимфатических узлов значительно усиливаются имеющиеся в норме деструктивные изменения и кариорексис клеток. Раннее появление деструктивных изменений в В-зависимых зонах лимфатических узлов (в светлых центрах фолликулов), являющихся местом фильтрации патогенов, нарушает процессы пролиферации и бласттрансформации лимфоцитов в ответ на антигенное раздражение, что может быть одной из причин развития иммунодефицита и, как следствие последнего, септического течения псевдотуберкулеза.

В 2000-х годах с развитием научных исследований о некультивируемом состоянии патогенных бактерий стали формироваться представления об иерсиниозах как персистентных инфекциях, включая псевдотуберкулез. Преобладающими формами иерсиниозных инфекций у людей обычно являются самоограничивающиеся желудочно-кишечные расстройства (энтерит, диарея и брыжеечный лимфаденит), которые благополучно разрешаются у иммунокомпетентных лиц, тогда как системное распространение инфекции, с поражением печени и селезенки, в основном наблюдается у лиц с ослабленным иммунитетом [20]. У человека в течение нескольких лет *Yersinia* могут персистировать латентно в слизистой оболочке кишечника и лимфоидной ткани подслизистой основы, вызывая хронический илеит, рецидивирующий энтерит и реактивный артрит [26]. Но почему и как энтеропатогенные иерсинии могут персистировать у некоторых пациентов, было непонятно.

Хотя многие патогены успешно устраняются иммунной системой хозяина, однако некоторые бактериальные патогены, в том числе кишечные иерсинии, выработали стратегии для эффективного уклонения от иммунного надзора. Это позволяет патогену колонизировать специфические ниши в организме хозяина, в которых они могут сохраняться в течение многих лет [38]. Некоторые персистентные инфекции приводят к клинически выраженным хроническим симптомам, например, хроническому воспалению и аутоиммунитету [19, 21]. В ряде случаев персистентные инфекции могут быть бессимптомными в течение десятилетий, прежде чем они подвергаются реактивации с тяжелыми клиническими симптомами [23].

На экспериментальной модели FVB/N и BALB мышей при использовании метода биолюминесцентной визуализации обнаружено [19], что заражение сублетальными дозами *Y. pseudotuberculosis* приводит у 10-15% животных к длительным периодам бессимптомной инфекции, когда неполное очищение (клиренс) организма от возбудителя может вызвать хроническое заболевание. При этом, значительно меньше известно о роли иммунного ответа, а также о бактериальных механизмах, связанных с хронической, по сравнению с острой, псевдотуберкулезной инфекцией. Авторами установлено, что при бессимптомной инфекции у большинства животных бактерии локализовались в слепой кишке и, более конкретно, в одном или нескольких цекальных лимфатических агрегатах. Независимо от штамма, у мышей, получивших низкую заражающую дозу *Y. pseudotuberculosis*, слепая кишка была первоначально предпочтительным местом для колонизации бактерий и оставалась таковым до клиренса возбудителя, тогда как вовлечение пейеровых бляшек тонкой кишки становилось следствием более высокой дозы инфекции. Эти результаты свидетельствуют о том, что слепая кишка играет ключевую роль в патогенезе персистентной псевдотуберкулезной инфекции. Локализация бактерий в слепой кишке и пейеровых бляшках тонкой кишки на ранней стадии после зара-

жения мышей обнаружена также при инфицировании аттенуированными штаммами *Y. pseudotuberculosis* в высоких дозах [32, 35]. Авторы отмечают, что илеоцекальная область является особо выгодным местом обитания для этого патогена у людей.

На мышинной модели [19] обнаружено, что при заражении *Y. pseudotuberculosis* эпителий слепой кишки был поврежден, и как бактерии, так и ПЯЛ выявлены в экссудатах, взятых из просвета кишки. Это выделение (так называемое «пролитие») бактерий служит признаком продолжающегося воспалительного процесса и, вероятно, принимает участие в развитии персистентной инфекции. Поскольку инфекция в тканях слепой кишки была достоверной, можно было ожидать эффекта экспрессии цитокинов. Используя мультиплексный подход для измерения цитокинов в крови инфицированных мышей, авторы обнаружили, что IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-17 и TNF- $\alpha$  были повышены на 21-36 дни после заражения в сыворотках персистентно инфицированных мышей.

Вызывало удивление, что проявления персистентной инфекции наблюдались в крови у бессимптомных мышей, учитывая очень низкое количество бактерий, присутствующих в слепой кишке (от 10<sup>6</sup> до 10<sup>7</sup> КОЕ). Системный эффект цитокиновых ответов может указывать на циркулирующие антигены во время персистентной инфекции, что представляет интерес в связи с гипотезой о том, что развитие связанного с *Yersinia* реактивного артрита является следствием циркулирующих антигенов.

Асимптомное состояние носительства бактерий, находящихся в слепой кишке [19], может иметь важные последствия. Используемая авторами модель мышинной инфекции имеет большой потенциал для раскрытия новых знаний о бактериальной адаптации и механизмах иммунной защиты хозяев во время персистентной инфекции. Существуют сообщения о бессимптомном кишечном носительстве *Yersinia* у свиней [15] и грызунов [13], у которых бактерии локализуются в слепой кишке и через фекалии могут распространяться в природе.

Хотя получены данные о длительном хроническом носительстве патогенных иерсиний у людей [39], но надежные доказательства этого состояния отсутствуют, за исключением связи между *Y. pseudotuberculosis* и реактивным артритом.

С учетом открытий последних лет в области генетики микроорганизмов, молекулярной биологии и экспериментальной патофизиологии И.А. Шурыгина и др. привели схему затяжного течения псевдотуберкулеза, указывая, что возникновение обострений и рецидивов с развитием вторично-очаговых поражений обусловлено генетически детерминированной иммунологической недостаточностью (маркеры HLA-B27 и его сплиты) [12]. Среди факторов, приводящих к затяжному течению, авторами отмечены: недостаточность гуморального иммунитета к белкам наружной клеточной мембраны иерсиний, длительная циркуляция антител к P26 (белковый компонент наружной клеточной мембраны с молекулярной массой 26 kDa) до 12 мес. от начала заболевания, низкая avidность антител, нарушение элиминации ЦИК, отложение иммунных комплексов в тканях. Наряду с секретируемыми возбудителем Yops, блокадой фагоцитоза, угнетением синтеза TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , эти факторы могут привести к персистенции инфекции, сопровождающейся поликлональной активацией лимфоцитов, синтезом аутоантител, экспрессией ЛПС и суперантигена *Y. pseudotuberculosis* YP<sub>Ma</sub>, гиперпродукцией провоспалительных цитокинов [12].

Итак, инфекции, вызванные кишечными иерсиниями, могут становиться персистентными, осложненными рецидивирующим энтеритом и тяжелыми аутоиммунными расстройствами. Для установления персистентной инфекции бактерии должны справляться с враждебным окружением, когда они проходят через кишечный эпителий и колонизируют основные, связанные с кишечником лимфатические ткани. Как бактерии получают плацдарм перед иммунными реакциями хозяина, до сих пор плохо понимается. Тем не менее, важным достижением последних лет

стало установление значения одного из факторов патогенности возбудителя псевдотуберкулеза — токсического некротизирующего фактора, CNF<sub>γ</sub> токсина в переходе *Y. pseudotuberculosis* в персистенцию за счет уменьшения индуцированного им воспаления [25]. Подавление функции CNF<sub>γ</sub> увеличивает IFN- $\gamma$  опосредованные ответы, включающие невоспалительную противомикробную активность и толерогенез. Этот процесс сопровождается преждевременным перепрограммированием транскрипционного ответа патогена на персистенцию, что дает бактериям преимущество в преодолении механизмов защиты хозяина и облегчает выживание в условиях комменсализма. Авторами доказано, что персистенция *Y. pseudotuberculosis* в слепой кишке характеризуется подавлением индуцированных патогенами воспаления и разрушения ткани, а удаление CNF<sub>γ</sub> токсина может спровоцировать этот процесс и перевести *cnfY*-мутант в персистенцию.

Недавно установлено, что ген цитотоксического некротизирующего фактора (*cnfY*) присутствует у всех 104 исследованных штаммах *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территории Российской Федерации за период 1966-2015 годов от больных людей с диагнозом псевдотуберкулез, грызунов и объектов окружающей среды [7, 8]. Большинство изолятов (99,04 %) имели 1 аллель гена *cnfY*, содержащий делеции; полноразмерный ген *cnfY* — аллель 2 — обнаружен у 0,96 % штаммов, выделенных в Приморском крае. Впервые авторами показана корреляция между аллелем *cnfY* и принадлежностью штамма к группе возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (ДСЛ) — особого клинико-эпидемического проявления псевдотуберкулеза [9]. При изучении биологической активности CNF<sub>γ</sub> на эукариотические клетки Нер-2 установлено, что токсин вызывал репликацию клеточного ядра без сопутствующего клеточного деления, в результате чего в культуре появились крупные многоядерные клетки, как показано ранее [31]. В наших исследованиях [8] впервые получены данные о биологическом действии токсина CNF<sub>γ</sub> на эукариотические клетки линии Vero E6 с формированием выраженных филоподий и ламеллоподий, что свидетельствует об активации ГТФ-белков Cdc42 и Rac и может приводить к апоптозу клеток.

Таким образом, российские штаммы *Y. pseudotuberculosis*, возбудителя ДСЛ, также как и европейские штаммы, содержат ген *cnfY*, детерминирующий продукцию цитотоксического некротизирующего фактора. Полученный продукт клонированного гена вызывал многоядерность в эукариотических клетках линии Нер-2 и Vero E6. Однако по данным Псаревой Е.К. и др. [8], продукция CNF<sub>γ</sub> у бактерий, ассоциированных с ДСЛ, может приводить к апоптозу клеток хозяина и невозможности патогена использовать их резерв для собственной жизнедеятельности и размножения. По нашему мнению, это косвенно предполагает способность возбудителя ДСЛ к персистенции.

Процесс, инициированный CNF<sub>γ</sub>, двусторонен [25]. С одной стороны, присутствие CNF<sub>γ</sub> увеличивает уровень воспаления и IL-6 / IL-33, что способствует острой фазовой реакции, индуцирует коагулирование и обеспечивает рекрутирование нейтрофилов, приводящее к более высокому продуцированию активных форм кислорода и протеаз [27]. Этот процесс может значительно усиливать воспалительную реакцию, вызванную *Y. pseudotuberculosis*, приводить к массивному повреждению тканей и дисбактериозу, что приводит к быстрой смерти или устранению инфекции у большинства инфицированных животных. С другой стороны, вызванное CNF<sub>γ</sub> воспаление может способствовать системному распространению инфекции.

Присутствие *cnfY*-мутанта почти не имеет аналогов, и только слабый ответ хозяина обнаруживается против бактерий «дикого» типа, который включает механизмы иммунного подавления, такие как аргинин-истошающий фермент Arg1. Arg1 контролирует активацию и пролиферацию Т-клеток, подавляет воспаление и повреждение тканей во время персистентной стадии ряда внутриклеточных вирусных и бактериальных патогенов, например, микобактерий туберкулеза [22].

Кроме того, известно, что воспалительные медиаторы, такие как IL-6 и TGF- $\beta$ , индуцируют развитие клеток TH17 и ингибируют дифференцировку регуляторных Т-клеток (Treg) [27], что также может способствовать защите от внеклеточных бактериальных инфекций. Чтобы проверить, играет ли снижение воспаления, вызванного IL-6, важную роль в установлении персистенции *Yersinia*, W. Heine et al. попытались истощить IL-6 с помощью антител [25]. Во всех предыдущих исследованиях антитело успешно использовалось для истощения IL-6 у неинфицированных мышей, но истощение IL-6 у инфицированных *Yersinia* мышей не удавалось.

Острая инфекция, вызванная *cnfY*-мутантом, характеризуется индукцией нескольких зависимых от интерферона генов (например, представления антигена, *Nos2* и *GBP*), которые дестабилизируют бактериосодержащие вакуоли и способствуют выделению цитозольного ЛПС [30]. Цитозольный липополисахарид запускает фагоцитарный пироптоз через активацию каспазы-11 и инициирует высвобождение IL-1 $\alpha$  [36, 40], провоспалительного цитокина, экспрессия которого была сильнее выражена при инфекции *cnfY*-мутантом по сравнению с мышами, инфицированными *Y. pseudotuberculosis* «дикого» типа. Это сопровождалось увеличением экспрессии многочисленных бактерицидных факторов, которые предотвращают системное воспаление, изменение симбиотической микробиоты и уменьшают тяжесть заболевания. Выявлен также значительно более высокий уровень транскрипции индуцируемого IFN- $\gamma$  *Ido1*, многогранного фермента катаболизма триптофана, и иммунная толерантность организма к бактериальной инфекции [42]. Это говорит о том, что индуцированный *Ido1* толерогенез может быть полезен в защите *cnfY*-мутанта от вредных атак иммунной системы, что поддержит его сдвиг в персистенцию. Истощение триптофана через *Ido1* впервые было описано как механизм ингибирования роста внутриклеточных патогенов, но также индуцирует стойкость внутриклеточного патогена (например, *Chlamydia pneumoniae*) и способствует хроническому заболеванию [24, 28].

Наличие CNF $\gamma$  токсина резко усиливает активацию Rho GTPases и доставку про-фагоцитарных и апоптотических эффекторных белков *Yop* в иммунные клетки, поэтому можно предположить, что уменьшение этих процессов в отсутствие CNF $\gamma$  ослабляет воспаление и усиливает установление персистентной инфекции [43]. Rho GTPases и их непосредственные нисходящие эффекты становятся ключевыми регуляторами динамики клеточного актиномиозина и, как таковые, важны для подвижности лейкоцитов [14, 15]. Следовательно, отсутствие CNF $\gamma$  будет уменьшать инфильтрацию тканей лейкоцитами и воспаление, как показано в слепой кишке мышей, инфицированных *cnfY*-мутантом.

До сих пор остается неясно, как CNF $\gamma$ -опосредованные изменения (i) отдельных Rho GTPases в целевых иммунных клетках, (ii) эффективность транслокации *Yop* и (iii) экспрессия отдельных компонентов T3SS/*Yop* влияют на воспаление и развитие персистентной инфекции. Поскольку различные компоненты являются частью сложной сети, более подробный анализ их взаимоотношения и результата их действий на стадии острой и персистентной инфекции необходим для определения вклада отдельных факторов.

Многие клинические изоляты *Y. pseudotuberculosis* скрывают делецию в *cnfY* гене [31]. Основываясь на полученных результатах Heine W. et al. [25] установили, что эта потеря не только повышает долговременную персистенцию, но также обеспечивает непрерывное поступление патогена в окружающую среду, что облегчает передачу его в другие резервуары-хозяева. Гомологический токсин CNF-1 *Escherichia coli* также присутствует только в менее чем 36-48% уросептических изолятах человека [37, 45]. Роль CNF-1 для вирулентности *E. coli* до сих пор не ясна, но недавнее исследование показало, что активность CNF-1 уменьшает нагрузку на патоген, потенцируя ЛПС-инициированные IL-1 $\beta$ -опосредованные антимикробные реакции хозяина, что способствует его выживанию во время бактериемии [17]. Одна из причин такого разнообразия может заключаться в том, что индивидуальный арсенал факторов

вирулентности может облегчить сохранение CNF токсина, например, достаточная экспрессия Yop/T3SS в *Yersinia*. В противоположность этому, CNF-ассоциированное повреждение ткани ускоряет доступ патогенов к более глубоким тканям и облегчает установление системных инфекций, что благоприятно для штаммов со сниженными свойствами инвазии тканей.

В целом, в настоящее время постулируется тесное равновесие, во-первых, между механизмом воспаления, вызванным *Yersinia*, и механизмами смерти / клиренса и, во-вторых, между индуцированным *Yersinia* иммунным подавлением и толерантностью, что способствует долгосрочной персистенции возбудителя псевдотуберкулеза. Модуляция секретируемого CNF $\gamma$  токсина достаточна для смещения этого баланса и изменения исхода *Y. pseudotuberculosis* инфекции. Более подробный анализ отдельных идентифицированных ответов хозяина на протяжении всей инфекции будет давать ценную информацию для улучшения способов оценки, лечения и профилактики персистентных инфекций.

Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что эволюция представлений о патогенезе псевдотуберкулеза способствует углубленному пониманию сложности и многообразия взаимодействия возбудителя инфекции и макроорганизма, а также стимулирует разработку нового аспекта псевдотуберкулеза как персистентной инфекции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Матосова Е.В. Антимикробная стратегия нейтрофилов при инфекционной патологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2016, 61 (12): 825-833.
2. Борисова М.А. Клиника иерсиниозом. Владивосток, 1990.
3. Исачкова (Сомова) Л.М., Жаворонков А.А., Антоненко Ф.Ф. Патология псевдотуберкулеза. Владивосток, Дальнаука, 1994.
4. Мазинг Ю.А. Гистологическая и цитохимическая характеристика экспериментальной и спонтанной псевдотуберкулезной инфекции. Дисс. канд. мед. наук. Л., 1982.
5. Малый В.П. Клинико-иммунологические, алергологические и иммуногенетические особенности безрецидивных, рецидивирующих, затяжных и микст-форм псевдотуберкулеза: Автореф. дисс. д-ра мед. наук. М., 1987.
6. Мотавкина Н.С., Малый В.П., Туркутюков В.Б. Рецидивирующий псевдотуберкулез (иммуногенетика, клиника, иммунология). М., Голос, 1999.
7. Персиянова Е.В., Адгамов Р.Р., Сурин А.К., Псарева Е.К., Ермолаева С.А., Тимченко Н.Ф. Цитотоксический некротизирующий фактор *Yersinia pseudotuberculosis*, возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки. Бюллетень СО РАМН. 2013, 33 (2): 16-20.
8. Псарева Е.К., Тимченко Н.Ф., Ермолаева С.А. Цитотоксический некротизирующий фактор *Yersinia pseudotuberculosis* как агент псевдотуберкулезной инфекции. Инфекционные болезни. 2017, 15(S1): 228.
9. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М., Медицина, 2001.
10. Сомова Л.М. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка: формирование представлений о патоморфогенезе «новой» болезни. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2017, 70 (3): 12-16.
11. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Дробот Е.И., Ляпун И.Н. Псевдотуберкулез: патогенетическое значение клеток врожденного иммунитета. Журн. микробиол. 2017, 5: 78-90.
12. Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Малов И.В., Марамович А.С. Псевдотуберкулез. Новосибирск, Наука, 2003.
13. Backhans A., Fellstrom C., Lambertz S.T. Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in small wild rodents. Epidemiol. Infect. 2011, 139: 1230-238.
14. Baker M.J., Pan D., Welch H.C. Small GTPases and their guanine-nucleotide exchange factors and GTPase-activating proteins in neutrophil recruitment. Curr. Opin. Hematol. 2016, 23(1): 44-54.
15. Biro M., Munoz M.A., W€eninger W. Targeting Rho-GTPases in immune cell migration and inflammation. Br. J. Pharmacol. 2014, 171(24): 5491-5506.

16. Bonardi S., Paris A., Bassi L. et al. Detection, semiquantitative enumeration and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in pork and chicken meats in Italy. *J. Food Prot.* 2010, 73: 1785-1792.
17. Diabate M., Munro P., Garcia E. et al. *Escherichia coli* alpha-hemolysin counteracts the anti-virulence innate immune response triggered by the Rho GTPase activating toxin CNF1 during bacteremia. *PLoS Pathog.* 2015, 11(3): e1004732.
18. Dube P. Interaction of *Yersinia* with the gut: mechanisms of pathogenesis and immune evasion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009, 337: 61-91.
19. Fahlgren A., Avican K., Westermark L. et al. Colonization of cecum is important for development of persistent infection by *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 2014, 82(8): 3471-3482.
20. Galindo C.L., Rosenzweig J.A., Kirtley M.L., Chopra A.K. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in human yersiniosis. *J. Pathog.* 2011.
21. Girschick H.J., Guilherme L., Inman R.D. et al. Bacterial triggers and autoimmune rheumatic diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2008, 26 (1 Suppl 48): S12-S17.
22. Gogoi M., Datey A., Wilson K.T., Chakravorty D. Dual role of arginine metabolism in establishing pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016, 29: 43-48.
23. Grant S.S., Hung D.T. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence.* 2013, 4 (4): 273-283.
24. Grohmann U., Fallarino F., Bianchi R. et al. IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 alpha+ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Immunol.* 2001, 167(2): 708-714.
25. Heine W., Beckstette M., Heroven K. et al. Loss of CNF<sub>Y</sub> toxin-induced inflammation drives *Yersinia pseudotuberculosis* into persistency. *PLOS Pathogens.* 2018, February 1.
26. Hoogkamp-Korstanje J.A., de Koning J., Heesemann J. Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man. *Infection.* 1988, 16 (2): 81-85.
27. Hunter C.A., Jones S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* 2015, 16 (5): 448-457.
28. Huston W.M., Barker C.J., Chacko A., Timms P. Evolution to a chronic disease niche correlates with increased sensitivity to tryptophan availability for the obligate intracellular bacterium *Chlamydia pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 2014, 196 (11): 1915-1924.
29. Karin M., Lawrence T., Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell.* 2006, 124 (4): 823-835.
30. Kim B.H., Shenoy A.R., Kumar P. et al. IFN-inducible GTPases in host cell defense. *Cell Host Microbe.* 2012, 12 (4): 432-444.
31. Lockman H.A., Gillespie R.A., Baker B.D., Shakhnovich E. *Yersinia pseudotuberculosis* produces a cytotoxic necrotizing factor. *Infect. Immun.* 2002, 70 (5): 2708714.
32. Logsdon L.K., Mecsas J. Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. *Infect. Immun.* 2003, 71: 4595-4607.
33. Logsdon L.K., Mecsas J. The proinflammatory response induced by wild-type *Yersinia pseudotuberculosis* infection inhibits survival of yop mutants in the gastrointestinal tract and Peyer's patches. *Infect. Immun.* 2006, 74: 1516-1527.
34. Martin C.J., Booty M.G., Rosebrock T.R. et al. Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell Host Microbe.* 2012, 12: 289-300.
35. Mecsas J., Bilis I., Falkow S. Identification of attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains and characterization of an orogastric infection in BALB/c mice on day 5 postinfection by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* 2001, 69: 2779-2787.
36. Meunier E., Dick M.S., Dreier R.F. et al. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature.* 2014, 509 (7500): 366-370.
37. Michaud J.E., Kim K.S., Harty W. et al. Cytotoxic Necrotizing Factor-1 (CNF1) does not promote *E. coli* infection in a murine model of ascending pyelonephritis. *BMC Microbiol.* 2017, 17 (1):127.
38. Monack D.M., Mueller A., Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, 2 (9): 747-765.
39. Netea M.G., van der Leij F., Drenth J.P. et al. Chronic yersiniosis due to defects in the TLR5 and NOD2 recognition pathways. *Neth. J. Med.* 2010, 68: 310-315.
40. Shin S., Brodsky I.E. The inflammasome: Learning from bacterial evasion strategies. *Semin Immunol.* 2015, 27 (2): 102-110.

41. Simonet M., Berche P. In vivo immunosuppression induced by a virulent strain of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 1986, 137 (2): 207-210.
42. Schmidt S.V., Schultze J.L. New Insights into IDO Biology in Bacterial and Viral Infections. *Front Immunol.* 2014, 5: 384.
43. Schweer J., Kulkarni D., Kochut A. et al. The cytotoxic necrotizing factor of *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY) enhances inflammation and Yop delivery during infection by activation of Rho GTPases. *PLoS Pathog.* 2013, 9 (11): e1003746.
44. Spinner J.L., Winfree S., Shannon J.G. et al. *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophils phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages. *J. Leukocyte Biology.* 2014, 95 (3). Doi: 10.1189/jlb.1112551.
45. Tarchouna M., Ferjani A., Ben-Selma W., Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Int. J. Infect. Dis.* 2013, 17(6): e450-3.
46. Thorslund S.E., Ermert D., Fahlgren A. et al. Role of YopK in *Yersinia pseudotuberculosis* resistance against polymorphonuclear leukocyte defense. *Infect. Immun.* 2013, 81: 11-22.

*Поступила 08.05.18*

Контактная информация: Сомова Л.М., д.м.н., проф.,  
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1, р.т. (423)244-24-44

## ИСТОРИЯ НАУКИ

© Л.П.БЛИНКОВА, 2019

*Л.П.Блинкова*

### **З.В. ЕРМОЛЬЕВА — ВЫДАЮЩИЙСЯ МИКРОБИОЛОГ, СОЗДАТЕЛЬ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПЕНИЦИЛЛИНА И ДРУГИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

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

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 119—124

*К 120-летию со дня рождения  
З.В. Ермольевой и 90-летию открытия  
пенициллина*

З.В. Ермольева родилась 2(15) октября 1897 г. (по неточным данным в 1898 г.) на территории Польши, в то время входившей в состав Российской империи, где ее отец — казак из дворянского сословия служил в пограничных войсках. Детство прошло в местечке Фролово Волгоградской обл. [4].

Целеустремленность Зинаиды, одаренность и организационный талант помогли ей окончить в 1921 г. медицинский факультет Северо-Кавказского университета, поработать там ассистентом и зав. отделением в Северокавказском Бактериологическом институте. Ее учителя — В.А. Барыкин и П.Ф. Здродовский. Она твердо решила стать микробиологом и еще студенткой начала проводить эксперименты. Заинтересовалась холерой, которая была темой научных изысканий В.А. Барыкина [4].

В 1922 г. в Ростове-на-Дону началась эпидемия холеры. В связи с этим, З.В. Ермольева провела исследования холероподобного вибриона для установления его возможной роли в этиологии холеры [1, 4]. Потрясает мужество и решительность 24-летней З.В. Ермольевой, которая приняла 1,5 млрд культуры холероподобного вибриона. Через 24 часа у нее была классическая холера, которую она все-таки победила. Кроме того, выделила от больного светящийся вибрион, впоследствии названный в ее честь. На основании совокупных данных, Зинаида Виссарионовна предложила метод дифференциальной диагностики холерных и холероподобных вибрионов [1, 4].

В 20-х годах ею были опубликованы результаты о диастатическом ферменте холерных и холероподобных микробов, о желчи, влияющей на биохимическую и биологическую изменчивость вибрионов, об уровне их хлороустойчивости (это явилось основой санитарных норм по всей стране для инактивации возбудителей холеры в водопроводной воде) [1, 4]. Все эти данные свидетельствовали, что в нашей науке появился талантливый ученый с огромным творческим потенциалом.

Профессор В.А. Барыкин настойчиво предлагал З.В. Ермольевой переехать в Москву, где возможность заниматься наукой была больше. В Москве с 1925 г. она возглавила отдел биохимии микробов в Биохимическом институте Наркомздрава РСФСР. В 1934 г. ее отдел вошел в состав Всесоюзного института экспериментальной медицины (ВИЭМ).

Известность З.В. Ермольевой стала международной после публикации ее статей в авторитетных научных журналах Европы.

В этот период З.В. Ермольева заинтересовалась новым, малоисследованным направлением в микробиологии и биохимии — токсинами микробов. Ею изучалось влияние аминокислот на образование столбнячного токсина, токсигенность дифтерийной палочки, взаимное воздействие микробов при их совместном выращивании, свойства аминов как антигенов. Она хотела получить эффективные вакцины против кишечных инфекций. Для получения новой информации по этому вопросу и представления своих данных З.В. Ермольева ездила в заграничные командировки (во Францию, Германию). В 1927 г. Ермольева побывала на конгрессе в Берлине вместе с Л.А. Зильбером и биохимиком В.А. Энгельгардтом.

В 1928 она стала женой Льва Зильбера. В течение нескольких месяцев они поработали вместе в Парижском Институте им. Л. Пастера, а также с немецкими учеными в Институте им. Р. Коха.

К 1930 г. их семья распалась. Несмотря на огромную опасность для себя, З.В. Ермольева со 2 мужем, сотрудником Института им. И.И. Мечникова эпидемиологом главным санитарным инспектором СССР А.А. Захаровым, а также с другими известными в стране деятелями науки и культуры, неоднократно добивалась освобождения из заключения Л.А. Зильбера. Благодаря З.В. Ермольевой вирусная теория рака Л.А. Зильбера уцелела: из тюрьмы она вынесла её на скомканном клочке папиросной бумаги. После ареста А.А. Захарова в 1938 г. и его смерти в тюремной больнице в 1940 г. З.В. Ермольева в брак не вступала. Смыслом ее жизни оставалась только наука и создание антибактериальных препаратов.

Поскольку холера оставалась грозным заболеванием в 30—40 гг., З.В. Ермольева разработала промышленный препарат на основе холерных фагов. В 1939-1941 гг. в Афганистане и Иране около наших пограничных районов распространилась холера. В Среднюю Азию в г. Термез направили З.В. Ермольеву и врачей для предотвращения эпидемии в СССР. Они поили фагами пограничников и местное население, защитив их от холеры. Разработку поливалентного бактериофагового препарата З.В. Ермольева продолжила в Ташкентском ИВС. В препарат она включила 19 видов фагов, активных в отношении возбудителей холеры, брюшного тифа и дифтерии — инфекций, наиболее значимых в то время.

Яркий талант ученого, врача, организатора у З.В. Ермольевой особенно проявился в годы Великой Отечественной войны [2, 4, 6]. В 1942 г. в осажденный Сталинград были направлены ведущие ученые и эпидемиологи, т.к. начавшаяся в

июле в немецких войсках холера могла перейти на жителей Сталинграда и на наши войска. З.В. Ермольеву наделили чрезвычайными полномочиями. В Сталинград повезли все имевшиеся запасы холерного фага. Но во время бомбежки эшелона препарат был уничтожен. Единственным выходом было организовать выпуск фага в обороняющемся Сталинграде.

В подвале полуразрушенного дома развернулось производство фага. Трудно представить, какие усилия должны были приложить З.В. Ермольева и ее помощники, чтобы иметь стерильный фаг. Для получения максимально специфичных фагов наши разведчики приносили умерших от холеры немцев, от которых микробиологи выделяли холерные штаммы.

Даже в этих условиях З.В. Ермольева создала новый метод экспресс-диагностики холеры с групповым посевом и предварительным ответом через 5-6 часов, что увеличивало число проведенных анализов в 5-10 раз.

За этот подвиг правительство наградило в октябре 1943 г. З.В. Ермольеву Орденом Ленина, а затем в том же году вместе с коллегой из ВИЭМ Лидией Якобсон наградило Сталинской премией 1 степени «За разработку нового метода быстрой диагностики и фагопрофилактики инфекционной болезни».

Полученная премия была передана в Фонд Оборона на постройку боевого самолета. Однако фаги были слабыми средствами при смертельно опасных гангренах, постоперационных нагноениях ран, сепсисах и т.д., приводя к высокой смертности. Необходимы были мощные антибактериальные препараты. З.В. Ермольева поняла это еще в 1929 г. и начала со своей группой изучать свойства лизоцима [4], искать новые источники его выделения (кроме яичного белка) среди растительного сырья. Через год З.В. Ермольева рекомендовала лизоцим для лечения заболеваний глаз и носоглотки, для пищевой промышленности как консервант, в сельскохозяйственной отрасли для обработки льна. Но кристаллический лизоцим она создала только в 1970 г., и он стал применяться в хирургии, офтальмологии, педиатрии. За эти разработки в 1935 г. она получила докторскую степень, а в 1939 г. стала профессором. Вот так в нашей стране появился лизоцим, о котором в 1909 г. сообщил наш микробиолог П.Н. Лашенков, а в 1922 г. — Александр Флеминг, который ввел термин «лизоцим».

Выдающимся научно-практическим достижением З.В. Ермольевой стало создание отечественного антибиотика пенициллин [2, 4].

В 1928 г., т.е. 90 лет назад, Александр Флеминг заметил, что зеленая плесень *Penicillium notatum*, случайно выросшая на несброшенных чашках со стафилококком, мощно ингибировала рост кокка. Гриб выделял в среду вещество (он назвал его пенициллином) с антибактериальным действием против стафилококков, стрептококков, коринебактерий и др. Свои наблюдения А. Флеминг изложил 13 сентября 1929 г. на заседании Медицинского исследовательского клуба при Лондонском университете. Вещество оказалось нестойким, и после 3-кратных попыток выделения пенициллина из среды биохимики не смогли решить эту проблему.

В 1938 г. этой работой занялись профессор Оксфордского университета микробиолог и врач Говард Флори и биохимик Эрнст Чейн с группой в 20 человек.

В военное время в Англии было трудно начать масштабные работы по созданию промышленного пенициллина. Поэтому в 1941 г. Оксфордская группа, кроме Чейна, переехала в США под денежное покровительство крупнейших фармфирм. С 1943 г. работа была засекречена.

В 1941 г. в нашей стране уже знали, что в Англии из какого-то вида гриба *Penicillium* создается очень активный в отношении многих микроорганизмов препарат. З.В. Ермольева в это же период вместе со своей сотрудницей Тamarой Иосифовной Балезиной провели целевой скрининг среди более чем 90 образцов плесени и выделили продуцент пенициллина *Penicillium crustosum* [2,4].

В 1943 г. после разрешения Фармкомитета на клиническое применение пенициллина З.В. Ермольева и коллеги испытали неочищенный, приготовленный из отечественного сырья пенициллин на 1200 раненых.

В январе 1944 г. в Москву в составе делегации приехал Г. Флори для сравнения активности своего продуцента пенициллина и нашего. Отечественный штамм оказался активнее (28 единиц в 1 мл против 20 соответственно). Следует отметить, что несколько позднее к весне 1944 года американцы имели миллиарды единиц пенициллина. Им удалось выделить новый продуцент пенициллина *Penicillium chrysogenum*, который был в 400 раз активнее прежнего.

В 1945 г. они получили 15 тонн высокоактивного фармакопейного пенициллина, а А. Флеминг, Г. Флори и Э. Чейн получили Нобелевскую премию за открытие и получение пенициллина.

Приехавший Г. Флори предложил проверить клиническую эффективность препаратов. Сравнительное лечение пенициллином проводили в Яузской больнице в 2 группах раненых с сепсисом одинаковой степени тяжести. Хотя наш пенициллин использовали в меньших по активности дозах, т.к. он был менее очищенным, эффект был одинаков с очищенным американским препаратом. Г. Флори понравилась доброжелательная соревновательность и атмосфера работы.

Для клинического доказательства эффективности нашего пенициллина в сентябре 1944 г. З.В. Ермольева и бригада специалистов во главе с главным хирургом нашей Армии Н.Н. Бурденко выехали на 1 Прибалтийский фронт с базой в Даугавпилсе и находились там почти полгода. Здесь располагались около 30 госпиталей.

В целом, пенициллин на разных фронтах спас тысячи жизней. Если пенициллин вводили не позднее 2 часов после ранения осложнения отсутствовали, а бойцы с сепсисом выживали.

В целом Н.Н. Бурденко и специалисты оценили пенициллин-крустозин как очень эффективное антибактериальное средство, устранившее монополию зарубежного пенициллина. В 1944 г. поверхностным методом по утвержденному 1 регламенту стали налаживать производство антибиотика, прежде всего в Москве [2]. Масштаб выпуска не отвечал имеющимся потребностям. Официальная инструкция на применение появилась только в 1945 г.

Препарат был недостаточно очищенным, требовал повышения и стабилизации активности, промышленных условий получения. Большое значение для свойств пенициллина имела организованная в 1945 г. во Всесоюзном химико-фармацевтическом институте (ВНИХФИ) лаборатория пенициллина. Совершенствованием производства пенициллина занимались уже другие группы ученых и технологов. Культивировали продуцент в созданном стерилизуемом аппарате для глубинного выращивания с аэрацией. Получили направленный синтез пенициллина после добавления в питательную среду некоторых факторов-предшественников (0,1% фенилацетамид, фенилуксусная кислота). Это повысило выход целевого продукта с 10-15% до 50-70%.

Наш пенициллин после лиофильной сушки (разработанной для препарата сотрудниками Петра Капицы) выглядел пока еще как желтоватый аморфный порошок с достаточной активностью и низкой частотой побочных реакций. Американский очищенный препарат имел вид белого кристаллического порошка.

В декабре 1950 г. ряд ученых и инженеров получили Сталинскую премию 2 степени за разработку и внедрение промышленного метода получения пенициллина. К огромному сожалению, среди них не было З.В. Ермольевой, чья основополагающая роль в создании этого препарата неопределима.

После создания пенициллина З.В. Ермольева занималась конструированием и изучением новых лекарств [3, 4, 5]. Некоторые свойства этих препаратов забыты и о них интересно вспомнить, возможно, возобновить их изучение. В 1951 г. ею был создан антибиотик экмолин трипротаминного ряда, полученный из молок рыб, который задерживал развитие вируса гриппа А. Вместе с М.М. Маевским в эксперименте был испытан препарат актиноксантин, приводивший к деструкции онкологической опухоли и даже её исчезновению. Например, при испытании этого препарата на клетках асцитного рака Эрлиха эффективная доза — 1γ/мл. Изучение опухолей у

крыс с саркомой показало более обширные очаги распада опухоли в опыте, чем в контроле. Ученые обратили внимание на несовпадение антибактериального и противоопухолевого действия.

В период активного применения пенициллина, стрептомицина, биомицина и т.д. появились данные об осложнениях (токсических, аллергических и др.), появлении резистентных к антибактериальным препаратам бактерий, а также их фильтрующихся форм и кандидозах. Эти вопросы З.В. Ермольева вместе с другими учеными не только изучала, но и искала пути их преодоления. Она была озабочена токсическим действием пенициллина на мозг при местном эндолюмбальном введении, а также токсическим влиянием стрептомицина на черепно-мозговые нервы и побочным действием биомицина на пищеварительную систему.

Для преодоления антибиотикорезистентности З.В. Ермольева рекомендовала применять либо совмещенные препараты, либо их сочетанное применение (с другими химиотерапевтическими средствами, гормонами, кортизонами, витаминами). Так, созданный в ее коллективе экмоновоциллин рекомендовали применять против спирохет, стафилококков, анаэробных микробов. Совмещение пенициллина и стрептомицина, по ее данным, при лечении пневмонии у детей давало синергидный эффект; при комбинации пенициллина с экмолином почти не возникали резистентные формы у возбудителя пневмонии.

Получение полусинтетических форм антибиотиков оказалось действенным способом борьбы с антибиотикорезистентностью.

В отношении аллергических реакций З.В. Ермольева рекомендовала использовать антигистаминные препараты, а пенициллин сочетать с экмолином, т.к. он обладал антигистаминным действием. Было рекомендовано последовательно вводить пенициллин и биомицин при их сочетании, т.к. они являются антагонистами. В 1959 г. в одном из докладов З.В. Ермольева обратила внимание на возникающие дисбактериозы после применения биомицина и сопутствующие кандидозы после использования *per os*. Но внутримышечное применение терапевтических доз биомицина (100 мг/сут) задерживало дисбактериоз у мышей, обезьян и людей.

Одна из основных рекомендаций З.В. Ермольевой для борьбы с инфекциями со сниженным процентом побочных явлений — создавать новые формы препаратов. Так, появились производные пенициллина — новоциллин, экмоновоциллин, которые были очень эффективны при сифилисе. В конце 50-х годов медицинская промышленность начала выпускать новокаиновую соль пенициллина пролонгированного действия.

Препарат длительного действия, названный бициллином, в дозе 300 тыс. Ед. сохраняется в организме до 7 сут., а при дозе 600 тыс. Ед. до 10 сут. Бициллин было рекомендовано вводить с новокаиновой или калиевой солью. Эту форму пенициллина в литературе назвали панпенициллином, или бициллином 2-3.

На пороге 60-х годов З.В. Ермольева сообщила о создании у нас новых препаратов — тетрациклиновых соединений. Препараты оказались эффективными при сыпном тифе, бруцеллёзе, пневмонии, стафилококковом эндокардите (когда не действуют пенициллин и стрептомицин), при амёбиазе, трахоме. З.В. Ермольева сообщала, что при бруцеллёзе течение инфекции облегчают препараты левомицетина, биомицина, тетрациклина в сочетании со специфичной бруцеллёзной вакциной. З.В. Ермольева в конце 50-х годов писала о том, что туляремия может быть излечена стрептомицином, а при экспериментальной чуме наиболее эффективен стрептомицин с экмолином (по выводам Л.Н. Макаровской) и др. [5].

З.В. Ермольева обращала внимание на способ введения препаратов. Так, резко снижалось число осложнений при скарлатине, если пенициллин с экмолином принимали внутрь, а один экмолин внутримышечно. Вместе с сотрудниками предложила микстуру биомицина с экмолином и сахарным сиропом для лечения носителей дифтерийной палочки, острых катаров верхних дыхательных путей, скарлатины. При лечении перитонитов рекомендовано введение биомицина с но-

вокаином внутривенно. По данным врачей клиники хирургии 1 Медицинского института им. И.М. Сеченова, сотрудничавшими с З.В. Ермольевой, при бронхоэктатической болезни выраженный терапевтический эффект в 120 случаях получен при внутримышечном введении биомицина (как правило, с новокаином) вместо введения перос, т.к. биомицин вызывал рвоту.

При жизни З.В. Ермольевой в 1955 г. был открыт продуцент цефалоспоринов С, а в начале 60-х годов начали работать над созданием полусинтетических цефалоспоринов. На основе беталактамов и фторхинолонов создали хинолактамы, обладающие меньшей скоростью формирования резистентности к ним и лучшими фармакологическими показателями.

Тогда же созданы препараты, сочетающие антимикробное действие с иммуномодулирующей активностью, например, цефодизим, стимулирующий фагоцитоз в популяции В- и Т-лимфоцитов.

Следует отметить, что З.В. Ермольева была первой в нашей стране, применившей в 1960 г. интерферон как противовирусное средство, а в 1962 г. — при тяжелых формах гриппа.

З.В. Ермольева также обращала внимание на использование антибиотиков в сельскохозяйственной практике: биомицин в корме норок способствовал увеличению их веса и качества шкурки. Пенициллин в маленькой дозе увеличивал рост и вес цыплят на 15-20%. Она считала, что в малых количествах антибиотики могут быть факторами роста.

З.В. Ермольева заслужила глубочайшее уважение и признание ее выдающихся заслуг не только в нашем Отечестве, но и за рубежом. Она имела многочисленные награды и почетные звания. З.В. Ермольева была нашим представителем в ВОЗ. С 1956 г. до конца жизни возглавляла Комитет по антибиотикам; являлась членом редколлегии международного «Журнала антибиотиков» в Токио, главным редактором нашего журнала «Антибиотики», членом ряда научных обществ, членом Комитета Советских женщин, членом президиума Общества СССР-Канада, участвовала в работе Комитета защиты мира.

Она имела 535 научных публикаций (в том числе, 6 монографий). Среди ее учеников 34 доктора наук и более 146 кандидатов наук [4].

С 1945 по 1947 гг. З.В. Ермольева была директором Института профилактики инфекций. В 1947 г. на базе этого института создали Всесоюзный НИИ пенициллина, позднее переименованный во ВНИИ антибиотиков, где она возглавляла отдел экспериментальной терапии. В 1945 г. ее избрали членом-корреспондентом АМН СССР, а в 1963 г. академиком АМН СССР. С 1952 г. одновременно до конца своей жизни З.В. Ермольева возглавляла кафедру микробиологии и лабораторию новых антибиотиков Центрального института усовершенствования врачей, которая отныне носит ее имя [4].

З.В. Ермольева скончалась 2 декабря 1974 г., похоронена в Москве, на кладбище в Кузьминках.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ермольева З.В. Холера. М., Медгиз, 1942.
2. Ермольева З.В. Пенициллин. М., Медгиз, 1946.
3. Ермольева З.В. Стрептомицин. М., Медгиз, 1956.
4. Жизнь в науке (к 75-летию со дня рождения З.В. Ермольевой). Журн. микробиол. 1973, 12: 127-128.
5. Ломов Ю.М., Макаровская Л.Н., Подосинникова А.С., Воронежская Л.Г., Попова Г.О., Шербанюк А.И. Роль З.В. Ермольевой в исследованиях по особо опасным инфекциям. Антибиотики и химиотерапия, 1998, 5: 16-17.
6. Медведева Л.М. Памяти З.В. Ермольевой посвящается. Вестник ВолгГМУ, 2014, 4(52): 131-132.

*Поступила 31.05.18*

## НЕКРОЛОГИ

17 сентября 2018 г. на 91 году жизни скончался известный микробиолог д.м.н. профессор **Владимир Гаврилович Лиходед**.

В.Г. Лиходед — участник ВОВ, имеет ордена и медали. В 1956 году окончил Военно-морскую медицинскую академию в Ленинграде, после чего служил врачом на Северном Флоте. Затем поступил на работу в Институт экспериментальной медицины в Ленинграде. В 1960 г. В.Г. Лиходед поступил в аспирантуру ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и в 1963 г. защитил кандидатскую диссертацию по специальности «микробиология». В этот период он начинает работать в МНИИВС им. И.И. Мечникова сначала научным сотрудником, а затем зав. лабораторией генетики и селекции вакцинных штаммов. Здесь Владимир Гаврилович воспитал когорту молодых исследователей, впоследствии авторитетных специалистов-микробиологов. В 1971 г. В.Г. Лиходед защитил докторскую диссертацию, посвященную вопросу колициногенности, а в 1974 г. ему присвоили звание профессора. В 1985 г. В.Г. Лиходед перешел на работу в учреждение, занимавшееся вопросами биотехнологии (впоследствии НПЦ «Гидробиос») и длительный период являлся там зам. директора по науке. С 1998 г. В.Г. Лиходед был ведущим научным сотрудником в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Основным направлением исследований В.Г. Лиходеда в эти годы стало изучение роли микробиоты и факторов врожденного иммунитета в патогенезе хронических воспалительных процессов человека. Он сформулировал основные положения рецептурной теории атерогенеза. В 2002 г. на основании научных заслуг его избрали действительным членом РАМТН. Он имел звание «Ветеран труда» и был награжден знаком «Отличнику здравоохранения».

15 ноября 2018 г. на 73 году жизни скончалась известный лептоспиролог д.м.н. профессор член-корр. РАН **Юлия Васильевна Ананьина**.

13 лет Ю.В. Ананьина была заместителем директора НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и долгое время зав. лабораторией лептоспирозов. В ее лаборатории хранилась уникальная коллекция лептоспир. Ю.В. Ананьина была экспертом ВОЗ по лептоспирозу, заместителем гл. редактора журнала «Паразитология и паразитарные болезни», членом редколлегии ЖМЭИ.

Светлая память о Владимире Гавриловиче Лиходеде и Юлии Васильевне Ананьиной навсегда сохранится в наших сердцах.

---

## СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Вакарина А.А., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф.* Влияние бактериофагов на чувствительность условно патогенных бактерий к антибактериальным препаратам . . . . . 3  
*Vakarina A.A., Kataeva L.V., Stepanova T.F.* Influence of bacteriophages on sensitivity of conditionally pathogenic bacteria to antibacterial preparations
- Меринова Л.К., Король Е.В., Сенина Т.В., Меринова О.А., Шаров Т.Н., Плеханова Н.Г.* Переключение морфотипов колоний *Burkholderia pseudomallei* при переходе культур в стационарное состояние и в организме экспериментальных животных . . . . . 8  
*Merinova L.K., Korol E.V., Senina T.V., Merinova O.A., Sharov T.N., Plekhanova N.G.* Switching of *Burkholderia pseudomallei* colony morphotypes in stationary condition and in the organism of experimental animals
- Агафонова Е.Ю., Смирнова Н.И., Альхова Ж.В., Краснов Я.М., Ливанова Л.Ф., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В.* Нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, выделенные на территории России: молекулярно-генетические особенности и патогенные свойства . . . . . 13  
*Agafonova E.Yu., Smirnova N.I., Alkhova Zh.V., Krasnov Ya.M., Livanova L.F., Lozovsky Yu.V., Kutyrev V.V.* Non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor, isolated in the territory of russia: molecular-genetic peculiarities and pathogenic properties
- Заднова С.П., Крицкий А.А., Плеханов Н.А., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И.* Сравнительный анализ адаптационных свойств типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor. . . . . 25  
*Zadnova S.P., Kritsky A.A., Plekhanov N.A., Cheldyshova N.B., Smirnova N.I.* Comparative analysis of adaptation properties in typical and genetically altered *Vibrio cholerae* El Tor strains
- Акимкин В.Г., Горелов А.В., Подколзин А.Т., Денисюк Н.Б.* Эпидемиологический и молекулярно-генетический мониторинг ротавирусной инфекции в Оренбургском регионе в предвакцинальный период. . . . . 30  
*Akimkin V.G., Gorelov A.V., Podkolzin A.T., Denisyuk N.B.* Epidemiological and molecular-genetic monitoring of rotavirus infection in the Orenburg Region in the period predictively
- Базыкина Е.А., Троценко О.Е., Туркутюков В.Б., Балахонцева Л.А., Котова В.О.* Эпидемиология ВИЧ-ассоциированного туберкулеза в Дальневосточном регионе . . . 36  
*Bazykina E.A., Trotsenko O.E., Turkutyukov V.B., Balakhontseva L.A., Kotova V.O.* Epidemiology of HIV-assosiated tuberculosis in the Far Eastern Federal District
- Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Таран Т.В., Прислегина Д.А., Манин Е.А., Семенко О.В., Куличенко А.Н.* Анализ заболеваемости природно-очаговыми инфекциями на юге европейской части России в 2017 году . . . . . 44  
*Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Taran T.V., Prislegina D.A., Manin E.A., Semenko O.V., Kulichenko A.N.* Analysis of natural focal infections incidence in the south of the European part of the Russian Federation in 2017

- Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Марданлы С.С., Ротанов С.В.* Распространенность вирусов герпеса человека среди контингентов различного возраста ..... 50  
*Mardanly S.G., Arseneva V.A., Mardanly S.S., Rotanov S.V.* The prevalence rate of human herpes viruses among different age populations
- Марков А.А., Тимохина Т.Х., Перунова Н.Б., Паромова Я.И., Иванова Е.В.* Возможность применения экзометаболитов *Bifidobacterium bifidum* № 791 в травматологии и ортопедии ..... 55  
*Markov A.A., Timokhina T.H., Perunova N.B., Paromova Y.I., Ivanova E.V.* Possibility of using exometabolites *Bifidobacterium bifidum* № 791 in traumatology and orthopedics
- Корзая Л.И., Догадов Д.И., Гончаренко А.М., Лапин Б.А.* Сравнительное изучение противокореевого иммунитета у взрослого населения города Сочи и обезьян Адлерского приматологического центра. .... 61  
*Korzaya L.I., Dogadov D.I., Goncharenko A.M., Lapin B.A.* Comparative study of anti-measles immunity in adult population of Sochi and laboratory primates of Adler primate center
- Кост В.Ю., Ртищев А.А., Минтаев Р.Р., Аكوпова И.И., Лисовская К.В., Маркушин С.Г.* Изучение биологических свойств аттенуированных вариантов штамма А/WSN/33, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза PB2-гена ..... 68  
*Kost V.Yu., Rtischev A.A., Mintaev R.R., Akopova I.I., Lisovskaya K.V., Markushin S.G.* Study of the biological properties of attenuated variants of the virulent A/WSN/33 strain of influenza virus, obtained by the site-specific mutagenesis of PB2-gene
- Ефременко Д.В., Василенко Н.Ф., Ефременко В.И.* Биологическая безопасность массовых мероприятий: оценка внешней эпидемиологической угрозы. .... 76  
*Efremenko D.V., Vasilenko N.F., Efremenko V.I.* Biological safety of public events: assessment of external epidemiological threat
- Иванюшко Т.П., Поляков К.А., Кунижеева М.А., Иванов С.Ю., Абрамов Д.Д.* Оценка качественного и количественного состава микробиоты ротовой полости у больных с медикаментозным остеонекрозом челюсти ..... 82  
*Ivanyushko T.P., Polyakov K.A., Kunizheva M.A., Ivanov S.Yu., Abramov D.D.* Evaluation of the qualitative and quantitative composition of oral microbiota in patients with medial osteonecrosis of the jaw

#### КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ (SHORT COMMUCATION)

- Березняк Е.А., Тришина А.В., Селянская Н.А., Архангельская И.В., Симонова И.Р., Ежо-ва М.И.* Антибиотикочувствительность штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, изолированных из гидроэкосистем в 2016-2017 гг. в Ростове-на-Дону ..... 87  
*Bereznyak E.A., Trishina A.V., Selyanskaya N.A., Arkhangelskaya I.V., Simonova I.R., Ezhova M.I.* Antibiotic sensitivity of *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains isolated from hydroecosystems in 2016-2017 in Rostov-On-Don

#### ОБЗОРЫ (REVIEWS)

- Антипова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Тотолян Арег А.* Программа элиминации кори в Африканском регионе ВОЗ: состояние проблемы ..... 91  
*Antipova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentieva I.N., Totolyan Areg A.* The program of measles elimination in the WHO African region: current state of the problem

<i>Коровкина Е.С., Костинов М.П.</i> Иммунопатологические механизмы внебольничной пневмонии и хронической обструктивной болезни легких, обусловленные инфекционной этиологией этих заболеваний, и пути возможной иммунокоррекции . . .	100
<i>Korovkina E.S., Kostinov M.P.</i> Immune mechanisms of community-acquired pneumonia and copd due to infectious etiology and methods of immunotherapy	
<i>Сомова Л.М., Андрюков Б.Г., Тимченко Н.Ф., Псарева Е.К.</i> Псевдотуберкулез как персистентная инфекция: этиопатогенетические предпосылки. . . . .	110
<i>Somova L.M., Andryukov B.G., Timchenko N.F., Psareva E.K.</i> Pseudotuberculosis as persistent infection: etiopathogenetic preconditions	

ИСТОРИЯ НАУКИ (HISTORY OF SCIENCE)

<i>Блинкова Л.П.</i> З.В. Ермольева — выдающийся микробиолог, создатель отечественного пенициллина и других антибактериальных препаратов. . . . .	119
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

НЕКРОЛОГИ (OBITUARIES) . . . . .	125
----------------------------------	-----