

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.

3

май—июнь

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 № ФС77-75442

**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

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2019

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Ю.В.Захарова, Л.А.Леванова, Т.А.Штернис, А.С.Сухих, А.А.Марковская

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИФИДОБАКТЕРИЙ ПРИ МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ КИШЕЧНИКА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

Кемеровский государственный медицинский университет

Цель. Оценить биологические свойства бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей при различных степенях дисбактериоза кишечника для определения направлений коррекции бифидофлоры при ВИЧ-инфекции. *Материалы и методы.* Выделено 58 культур бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных детей, 45 от детей группы сравнения. У бифидобактерий изучены индекс адгезии микроорганизмов (ИАМ), гидрофобность (Н), кислотообразование, антиоксидантная активность (АОА), отсроченный антагонизм к условно патогенным микроорганизмам. *Результаты.* У ВИЧ-инфицированных детей при I степени дисбактериоза кишечника биологические свойства бифидобактерий не отличались от группы сравнения ($p > 0,05$). При II степени дисбактериоза гидрофобность бифидобактерий была равна 45,75% (33; 58,8), ИАМ — 2,5 (2,0; 2,9), кислотообразование 67,3° Т (53,0; 97,4), АОА — 0,8 $E_{\text{аоа}}$ (0,6; 1,0). При III степени микроэкологических нарушений Н была равна 22,7% (15,8; 46,6), ИАМ — 2,4 (1,92; 3,69), кислотообразование — 66,3° Т (48,9; 94,9), АОА — 0,4 $E_{\text{аоа}}$ (0,3; 0,6). Показатели биологических свойств при II и III степени дисбактериоза были статистически ниже, чем у бифидофлоры от ВИЧ-негативных детей ($p < 0,01$). *Заключение.* При I степени дисбактериоза при ВИЧ-инфекции необходимо проводить коррекцию количественного уровня бифидобактерий. При II и III степени — корректировать поверхностные свойства, антиоксидантную и сахаролитическую активность бифидобактерий.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 3—9

Ключевые слова: бифидобактерии, ВИЧ-инфекция, микрофлора кишечника, биологические свойства

Yu.V.Zakharova, L.A.Levanova, T.A.Shternis, A.S.Sukhikh, A.A.Marcovskaya

CHARACTERISTICS OF BIFIDOBACTERIA BIOLOGICAL PROPERTIES IN GUT MICROFLORA DISORDERS IN HIV-INFECTED CHILDREN

Kemerovo State Medical University, Russia

Aim is to evaluate the biological properties of bifidobacteria in HIV-infected children with different degrees of gut microflora disorders to determine the direction for correction of bifidobacterium in HIV infection. *Materials and methods.* 58 selected cultures of bifidobacteria from HIV-infected children, 45 children in the comparison group. In bifidobacteria studied adhesion index of microorganisms (IAM), hydrophobicity (H), acid formation, antioxidant activity (AOA), delayed antagonism to opportunistic microorganisms. *Results.* In HIV-infected children at I degree of gut microflora disorders biological properties of bifidobacteria did not differ from the comparison group ($p > 0.05$). At II degree of gut microflora disorders hydrophobicity of bifidobacteria was 45.75% (33; 58.8), IAM — 2.5 (2.0; 2.9), acid formation 67.3° T (53.0; 97.4), AOA — 0.8 $E_{\text{аоа}}$ (0.6; 1.0). At III degree of gut microflora disorders H — 22.7% (15.8; 46.6), IAM — 2.4 (1.92; 3.69), acid formation — 66.3° T (48.9; 94.9), AOA — 0.4 $E_{\text{аоа}}$ (0.3; 0.6). Value biological properties at II and III degrees of gut microflora disorders were lower than in bifidoflora from HIV-negative children ($p < 0.01$). *Conclusion.* At the I degree of gut microflora disorders in HIV infection it is necessary to correct the quantitative level of bifidobacteria. At II and III degree it is necessary to correct the surface properties, antioxidant and fermentation of carbohydrates activity of bifidobacteria.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 3—9

Key words: bifidobacteria, HIV infection, gut microflora, biological properties

ВВЕДЕНИЕ

Бифидобактерии являются активными регуляторами кишечного микробиоценоза [1, 3]. Они осуществляют модуляцию состава и численности факультативной микрофлоры кишечника не только за счет формирования антагонистических взаимоотношений с условно патогенной и патогенной микрофлорой, но и за счет влияния на их свойства. Это реализуется за счет выделения экзометаболических, подавляющих факторы персистенции условно патогенной микрофлоры (УПМ), что повышает чувствительность этих бактерий к факторам естественной резистентности макроорганизма [3, 14].

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что микрoэкологические нарушения кишечника чаще характеризуются снижением популяционного уровня индигенных микроорганизмов и увеличением интенсивности колонизации слизистой кишечника УПМ [4, 5]. У ВИЧ-инфицированных детей условно патогенные микросимбионты нередко являются причиной вторичных бактериальных инфекций [10, 12, 13]. При этом практически отсутствуют данные о биологических свойствах бифидобактерий при ВИЧ-инфекции, что не позволяет эффективно проводить коррекцию микрoэкологических нарушений у данной категории пациентов и предупреждать развитие у них осложнений.

Цель исследования — оценить биологические свойства бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей при различных степенях дисбактериоза кишечника для определения направлений коррекции бифидофлоры при ВИЧ-инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучены биологические свойства 103 культур бифидобактерий, в том числе 58 от ВИЧ-инфицированных детей и 45 от детей группы сравнения. Диагноз ВИЧ-инфекция детям был поставлен на основании эпидемиологических, клинических и лабораторных данных. Критерием включения в группу сравнения было отсутствие у детей ВИЧ-статуса. Гендерные и возрастные характеристики сравниваемых групп были сходными.

Забор материала и бактериологическое исследование содержимого толстой кишки проведено в соответствии с действующими нормативными документами [9]. Состояние микробиоценоза кишечника оценивали согласно [7]. Выделение и определение количественного содержания бифидобактерий осуществляли методом серийных разведений с использованием Бифидум-среды (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Для создания анаэробных условий применяли анаэроостаты (BBL, США) и газогенерирующие пакеты (НПО «Новое дело», Санкт-Петербург). Верификацию бактерий на родовом уровне осуществляли по специфическому ферменту фруктозо-6-фосфат фосфокетолазе (Ф-6-ФФК). У бифидобактерий изучали адгезивную способность (индекс адгезии микроорганизмов — ИАМ) [2], гидрофобность (Н), кислотообразование [8], антиоксидантную активность ($E_{\text{аоа}}$ — единицы антиоксидантной активности) [11], отсроченный антагонизм [6].

Для статистического анализа использовали программно-методический комплекс анализа данных IBM SPSS Statistics / PS IMAGO. Закон распределения исследуемых данных отличался от нормального, поэтому достоверность различий в парных независимых совокупностях определяли с помощью непараметрических критериев оценки достоверности (критерия U Манна-Уитни и критерия χ^2). Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Средние значения количественных показателей представлены в виде медианы и значений 25 и 75 перцентилей — Me (LQ; UQ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У детей независимо от ВИЧ-статуса чаще регистрировали дисбактериоз кишечника II степени (41,5% у ВИЧ+ и 48,6% у ВИЧ-) и III степени (33,8% у ВИЧ+ и 43,3% у ВИЧ-) ($p > 0,05$). Изменения кишечного микробиоценоза характеризовались снижением количественного уровня индигенной микрофлоры и повышением содержания условно патогенных микроорганизмов. Уже при I степени дисбактериоза кишечника у ВИЧ-инфицированных детей отмечали дефицит бифидобактерий ($p < 0,01$). При этом титр типичных кишечных палочек у детей основной группы превышал аналогичный показатель в группе сравнения практически на 2 lg КОЕ/г ($p < 0,001$) (табл.).

II степень микрoэкологических нарушений кишечника у ВИЧ-инфицированных детей характеризовалась дальнейшим снижением уровня колонизации слизистой кишечника бифидобактериями ($p < 0,05$). Количественный уровень типичных кишечных палочек по сравнению с начальной степенью дисбактериоза снижался и достигал нормальных значений. У детей с ВИЧ-статусом при II степени дисбактериоза кишечника регистрировали более высокие титры УПМ, в частности микроорганизмов рода *Klebsiella* и *Staphylococcus* ($p < 0,05$).

При III степени дисбактериоза кишечника у ВИЧ-позитивных детей количественное содержание бифидобактерий, лактобацилл и типичных кишечных палочек было достоверно ниже, чем у ВИЧ-негативных ($p < 0,05$), тогда как титры УПМ не отличались от детей группы сравнения ($p > 0,05$).

Установлено, что при I степени микрoэкологических нарушений у ВИЧ-инфицированной популяции бифидобактерий характеризовалась средними показателями гидрофобности Н составил 51,3% (40,3; 68,2) и специфической адгезии, ИАМ

Количественное содержание микрофлоры (в lg КОЕ/г) при различных степенях дисбактериоза кишечника (Me (LQ; UQ))

Микроорганизмы	I степень		II степень		III степень	
	ВИЧ+ (n=13)	ВИЧ- (n=13)	ВИЧ+ (n=37)	ВИЧ- (n=36)	ВИЧ+ (n=39)	ВИЧ- (n=25)
<i>Bifidobacterium</i>	8,7* (7,9; 9,1)	10,2 (9,8; 11,0)	7,9* (7,5; 8,0)	9,3 (9,0; 9,9)	7,5* (7,0; 8,0)	9,0 (8,0; 9,5)
<i>Lactobacillus</i>	7,5 (6,8; 7,9)	7,7 (7,0; 8,0)	7,0 (6,6; 7,2)	7,3 (6,8; 7,5)	5,2* (4,1; 6,3)	7,1 (6,0; 7,5)
<i>E.coli lac+</i>	9,3* (8,5; 10)	7,5 (7,0; 8,0)	7,8 (7,0; 8,0)	7,3 (7,0; 7,7)	6,3* (6,0; 7,0)	7,5 (7,0; 8,0)
<i>E.coli lac-</i>	4,5 (4,0; 5,0)	-	5,4 (5,0; 5,8)	4,8 (4,2; 5,0)	7,5 (7,0; 8,0)	7,0 (6,0; 7,8)
<i>E.coli hly+</i>	4,5 (4,4; 5,0)	4,1 (3,5; 4,5)	5,7 (5,0; 6,0)	5,0 (4,5; 5,5)	7,4 (7,0; 8,0)	6,9 (6,0; 7,0)
<i>Klebsiella</i>	-	4,3 (4,0; 4,8)	6,4* (6,0; 7,0)	4,8 (4,2; 5,2)	8,0 (7,5; 8,3)	8,2 (8,0; 8,5)
<i>E.faecalis</i>	6,7 (6,0; 7,2)	7,5 (7,0; 8,0)	6,2 (5,8; 6,5)	7,1 (6,5; 7,3)	7,2 (7,0; 7,6)	7,0 (6,0; 7,5)
<i>E.faecium</i>	5,7 (5,5; 6,0)	6,5 (6,0; 7,0)	6,8 (6,0; 7,0)	6,6 (6,0; 7,0)	7,0 (6,0; 7,5)	6,8 (6,0; 7,0)
<i>Staphylococcus</i>	3,1 (2,5; 3,5)	2,5 (2,0; 3,0)	4,0* (3,2; 4,5)	2,8 (2,5; 3,3)	4,8 (4,0; 5,0)	3,7 (3,2; 3,9)
<i>Candida</i>	3,5 (3,0; 4,0)	3,0 (2,0; 3,5)	3,6 (3,0; 3,9)	3,4 (3,2; 3,6)	5,1 (4,8; 5,5)	4,5 (4,0; 5,0)

Примечание. * Статистически значимые различия в группах ВИЧ+ и ВИЧ- детей ($p < 0,05$).

составил 2,64 (2,33; 3,25). У бифидобактерий, выделенных от детей группы сравнения, показатели, характеризующие колонизационный потенциал, были сходными ($p > 0,05$). Гидрофобность в среднем была равна 56,7% (43,2; 77,9), а ИАМ 3,17 (2,24; 4,17). При I степени дисбактериоза штаммы бифидобактерий от ВИЧ-позитивных детей обладали средней кислотообразующей активностью, титруемая кислотность в популяции бактерий в среднем составила $98,3^0$ Т (71,4; 127). Кислотообразование бифидобактерий от ВИЧ-негативных детей характеризовалось как высокое и составило в среднем 101^0 Т (86; 122,6) ($p > 0,05$); 64,3% бифидобактерий при ВИЧ-инфекции проявляли антагонизм к облигатным представителям кишечного микробиоценоза. Антагонистические отношения в 57,1% случаев формировались с *Escherichia coli lac+*, в 7,2 % случаев с *Enterococcus faecalis*. Частота формирования антагонизма в популяции бифидобактерий от ВИЧ-негативных детей с I степенью дисбактериоза была выше и составила 72,7%, однако разница с основной группой была статистически незначима ($\chi^2 = 6,33$; $df = 1$; $p = 0,56$). Также, как у ВИЧ-инфицированных, в 54,5% случаев формировались антагонистические отношения с облигатными представителями кишечного микросимбиоза — с *E.coli lac+* и *E.faecalis*. Однако в 18,2 % случаев у ВИЧ-негативных детей регистрировали антагонизм бифидобактерий к условно патогенным коккам и представителям семейства *Enterobacteriaceae* ($\chi^2 = 7,5$; $df = 1$; $p = 0,02$).

При II степени дисбактериоза у бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных детей снижалась гидрофобность клеточной поверхности. Популяционный показатель гидрофобности у них составил только 45,75% (33; 58,8). В группе ВИЧ-негативных детей гидрофобность клеток по сравнению с I степенью дисбактериоза кишечника практически не изменялась, составляя 58,15% (45,78; 88,58), что было статистически выше, чем в группе ВИЧ-инфицированных ($p < 0,05$).

У бифидобактерий от ВИЧ-позитивных детей снижалась способность к специфической адгезии до 2,5 (2,0; 2,9). У детей без ВИЧ-статуса с усугублением микробиологических нарушений показатель специфической адгезии практически не изменялся и составлял 3,2 (2,9; 3,8). При этом различия среди бифидобактерий в способности адгезироваться в группе ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей была статистически значимы ($p < 0,001$). Изменение показателей специфической и неспецифической адгезии бифидобактерий при II степени дисбактериоза приводило у ВИЧ-инфицированных детей к снижению их количественного уровня до 8,7 lg КОЕ/г. У детей группы сравнения показатель плотности колонизации бифидобактериями снижался не так значительно, как у ВИЧ-положительных детей — с 10,2 lg КОЕ/г до 9,3 lg КОЕ/г. Несмотря на то, что у пациентов с ВИЧ-статусом при дисбактериозе II степени кислотообразование бифидобактерий падало до $67,3^0$ Т (53,0; 97,4), тем не менее, частота формирования антагонистических взаимоотношений сохранялась на уровне 68,9%. Это согласуется с данными литературы о том, что продукция органических кислот является важным, но не главным фактором антагонизма у бифидофлоры [14]. При этом, в 37,8% случаев бифидофлора у ВИЧ-инфицированных детей проявляла антагонизм к УПМ. Количество продуцируемых бифидобактериями кислот в группе ВИЧ-негативных детей статистически значимо отличалось от основной группы ($p < 0,001$). Кислотообразование характеризовалось как высокое и составляло 103^0 Т (81; 125,5). Также как в группе ВИЧ-инфицированных, в 70% случаев бифидобактерии проявляли антагонизм к кишечной микрофлоре, при этом в 50% случаев это был антагонизм по отношению к УПМ ($\chi^2 = 3,06$; $df = 1$; $p = 0,08$).

При III степени микробиологических нарушений штаммы бифидобактерий, изолированные от ВИЧ-позитивных детей, в 58,9% случаев характеризовались как

низкогидрофобные, значение H не превышало 22,7% (15,8; 46,6). При этом в группе сравнения гидрофобность бифидобактерий была в 2 раза выше и составляла 54,58% (36,85; 76,63), разница была статистически значима ($p < 0,001$). Показатель специфической адгезии бифидобактерий в группе ВИЧ-положительных детей при III степени дисбактериоза кишечника не отличался от аналогичного показателя при микробиологических нарушениях II степени и составлял 2,4 (1,92; 3,69). В группе ВИЧ-негативных детей, специфическая адгезия бифидофлоры была статистически выше и достигала 3,17 (2,24; 4,18) ($p < 0,01$). Вследствие нарушения как специфической, так и неспецифической адгезии количественный уровень бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных был снижен до $7,5 \lg$ КОЕ/г. Также у них при III степени дисбактериоза относительно II степени не изменялась способность бифидобактерий к кислотообразованию — $66,3^\circ T$ (48,9; 94,9). Показатель статистически значимо отличался только от показателя кислотности при I степени дисбактериоза в группе ВИЧ-положительных пациентов ($p < 0,05$). Кислотообразование бифидобактерий, изолированных от ВИЧ-негативных детей, было статистически выше: $101,5^\circ T$ (86,1; 122,6) ($p < 0,001$). Обращает на себя внимание снижение у детей с ВИЧ-статусом при III степени микробиологических нарушений в 2 раза частоты антагонизма (до 33,3%) бифидофлоры по отношению к другим членам микробиоценоза ($p < 0,05$). При этом только в 12,8% случаев бифидофлора проявляла антагонизм к УПМ. У ВИЧ-негативных детей с III степенью микробиологических нарушений кишечника, наоборот, происходило увеличение до 94% частоты антагонизма со стороны бифидофлоры. В 76,4% случаев антагонистические взаимоотношения формировались с УПМ ($\chi^2 = 1,4$; $df = 1$; $p = 0,02$).

По данным литературы на всех стадиях ВИЧ-инфекции отмечают снижение активности в сыворотке крови супероксиддисмутазы (СОД), снижение соотношения СОД/глутатионпероксидаза, которое коррелирует с развитием генерализованных осложнений [13]. В просвете кишечника при микробиологических нарушениях также регистрируют увеличение содержания в кишечнике токсических форм кислорода [4]. Это, в свою очередь, может являться одним из факторов, определяющих количественное содержание бифидобактерий и УПМ в кишечнике. Способность бифидобактерий инактивировать токсические формы кислорода связывают, прежде всего, с ненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав их клеточной стенки, и с продукцией серосодержащих аминокислот. Также у бифидобактерий функционируют ферментные антиоксидантные системы — НАДН-оксидаза, НАДН-пероксидаза, а некоторые виды бифидофлоры продуцируют каталазу [14]. В связи с этим, мы изучили антиоксидантную активность бифидобактерий. Установлено, что при I степени дисбактериоза антиоксидантные свойства штаммов в сравниваемых группах были сходными ($p > 0,05$). Антиоксидантная активность бифидобактерий у ВИЧ-положительных и ВИЧ-негативных детей составила $1,5 E_{aoa}$ (1,1; 1,7) и $1,7 E_{aoa}$ (1,2; 1,7) соответственно. При II степени дисбактериоза у бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных детей происходило снижение антиоксидантных свойств в 1,9 раза, по сравнению с ВИЧ-негативными детьми ($p < 0,01$). Антиоксидантная активность в сравниваемых группах составляла $0,8 E_{aoa}$ (0,6; 1,0) и $1,5 E_{aoa}$ (1,3; 1,6) соответственно. Обращает на себя внимание, что показатели антиоксидантной защиты бифидофлоры при II степени дисбактериоза у ВИЧ-негативных детей сохранялись практически, как при I степени. При усугублении микробиологических нарушений до III степени у ВИЧ-инфицированных пациентов регистрировали дальнейшее снижение активности антиоксидантных систем бифидобактерий, которая не превышала в среднем $0,4 E_{aoa}$ (0,3; 0,6). У штаммов, выделенных от ВИЧ-негативных детей, антиоксидантная активность составляла $0,9 E_{aoa}$ (0,8; 1,1) ($p < 0,01$).

Частота микрoэкологических нарушений кишечника с учетом степени тяжести у ВИЧ-инфицированных детей не отличалась от аналогичного показателя в группе ВИЧ-негативных детей ($p > 0,05$). Чаще всего в сравниваемых группах регистрировали дисбактериоз кишечника II степени и III степени. У детей с ВИЧ-статусом уже при I степени дисбактериоза отмечали снижение титров бифидобактерий до 8,7 (7,9; 9,1) lg КОЕ/г. В группе ВИЧ-негативных пациентов количественный уровень бифидофлоры был статистически выше и достигал 10,2 (9,8; 11) lg КОЕ/г ($p < 0,05$). Бифидобактерии от ВИЧ-позитивных детей на начальной стадии дисбактериоза по показателям специфической адгезии, гидрофобности, кислотообразованию, антиоксидантной активности не отличались от бифидофлоры детей без ВИЧ-статуса ($p < 0,05$). Однако они не проявляли антагонизма по отношению к УПМ. Несмотря на то, что более половины штаммов бифидобактерий вступали в антагонистические отношения с *E. coli lac+*, тем не менее, количественный уровень данных микросимбионтов превышал допустимые значения нормы и составлял 9,3 (8,5; 10) lg КОЕ/г. По данным многочисленных исследований высокое количественное содержание представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе типичной кишечной палочки, является маркерным признаком кишечного микробиоценоза при ВИЧ-инфекции, т.е. полученные данные согласуются с литературными [14]. Однако, формирование «энтеробактериального» типа микробиоценоза при I степени микрoэкологических нарушений у ВИЧ-инфицированных происходит при сохранении регулирующего влияния бифидофлоры.

При II степени дисбактериоза кишечника титры бифидофлоры у детей с ВИЧ-статусом снижались до 7,9 (7,5; 8) lg КОЕ/г и отличались от титров в группе ВИЧ-негативных детей ($p < 0,05$). У бифидобактерий ВИЧ-позитивных детей по сравнению с ВИЧ-негативными пациентами отмечали статистически более низкие показатели гидрофобности клеточной поверхности, адгезивной и кислотообразующей способности, антиоксидантных свойств штаммов ($p < 0,05$). Несмотря на то, что частота формирования антагонизма в сравниваемых группах бифидобактерий не отличалась, тем не менее, бифидофлора у ВИЧ-позитивных детей в 1,5 раза реже вступала в антагонистические взаимоотношения с УПМ. Поэтому при II степени микрoэкологических нарушений мы также как при I степени регистрировали высокий количественный уровень (6,4 lg КОЕ/г) энтеробактерий, в частности представителей рода *Klebsiella* ($p < 0,05$). Кроме того, статистически значимые различия регистрировали по среднему содержанию стафилококков, титры которых при ВИЧ-инфекции и II степени микрoэкологических нарушений составляли 4 (3,2; 4,5) lg КОЕ/г ($p < 0,05$).

При III степени микрoэкологических нарушений при ВИЧ-инфекции отмечали глубокий дефицит бифидофлоры, так как их средний количественный уровень не превышал 7,5 (7,0; 8,0) lg КОЕ/г. Изменялись и биологические свойства бифидофлоры. Бифидобактерии у ВИЧ-инфицированных имели низкую гидрофобность, тогда как в группе ВИЧ-негативных гидрофобность была в 2 раза выше ($p < 0,001$). Статистически значимые различия также наблюдали в отношении показателей кислотообразования и антиоксидантной защиты ($p < 0,001$). При этом у бифидобактерий в группе ВИЧ-негативных детей гидрофобность, специфическая адгезия, кислотообразование при III степени дисбактериоза не изменялись, а частота антагонизма даже возрастала с 70 до 94%. Вероятнее всего, это является проявлением процесса саморегуляции кишечного микробиоценоза, который реализуется путем компенсаторного повышения активности доминантных микросимбионтов. При ВИЧ-инфекции включение компенсаторных механизмов, направленных на стабилизацию

микробиоценоза, не наблюдалось. Частота антагонизма бифидофлоры снижалась в 2 раза, по сравнению со II степенью дисбактериоза ($p < 0,05$), и только 12,8% штаммов бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных проявляли антагонизм по отношению к УПМ. Помимо бифидобактерий при III степени дисбактериоза у ВИЧ-позитивных лиц были снижены титры лактобацилл и типичных кишечных палочек. В группе сравнения дефицит лактобацилл и кишечных палочек наблюдался в 1,5 — 2 раза реже ($p < 0,05$).

Таким образом, у ВИЧ-инфицированных детей при I степени микробиологических нарушений целесообразно проводить коррекцию количественного уровня бифидобактерий. При II и III степенях дисбактериоза кишечника необходима разработка подходов, связанных с модуляцией биологических свойств бифидофлоры. Основными точками приложения для коррекции свойств бифидобактерий при ВИЧ-инфекции являются их поверхностные характеристики, антиоксидантная защита и активность сахаролитических ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бовбель И.Э. Современные представления о микробиоте кишечника и возможности эффективного применения пробиотиков в практике врача-педиатра. Медицинские новости. 2017, 2 (269):25-31.
2. Брилис В.И., Брилине Т.А., Ленцнер Х.П. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. Лабораторное дело. 1986, 4:210-212.
3. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б. Регуляция иммунного гомеостаза кишечника человека метаболитами бифидобактерий в условиях микробного распознавания. Журн. микробиол. 2017, 3:12-18.
4. Гапон М.Н., Терновская Л.Н. Выявление степени микробиологических нарушений кишечника на основе расчета локального антиоксидантного индекса. Журн. микробиол. 2016, 2:80-84.
5. Ивашкин В.Т. Микробиом человека в приложении к клинической практике. Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2017, 6 (27):4-13.
6. МУ 2.3.2.2789-10. «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов». М., 2011.
7. Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника»: приказ МЗ РФ № 231 от 9 июня 2003 г.
8. Определение специфической активности пробиотиков. ОФС 1.7.2.0009-15: Общая фармакопейная статья. М., 2015.
9. Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника: МР-№10-11/31: метод. рекомендации. М., 1986.
10. Пузырева Л.В., Конченко В.Д., Далаева Л.М. Сепсис у ВИЧ-инфицированных пациентов. Инфекция и иммунитет. 2017, 3 (7):251-258.
11. Сухих А.С., Захарова Ю.В. Пат. 2465593 Российская Федерация, МПК С1. Способ количественного определения антиоксидантной активности микроорганизмов. Заявл. 06.07.2011; опубл. 27.10.2012, бюл. № 30.
12. Dubourg G. Microbiome of HIV-infected people. Microbial Pathogenesis. 2017, 106: 85–93.
13. Mudd J.C., Brenchley J.M. Gut mucosal barrier dysfunction, microbial dysbiosis, and their role in HIV-1 disease progression. J. Infect. Diseases. 2016, 214 (suppl. 2):58–66.
14. O'Callaghan A., D. van Sinderen. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. Frontiers in Microbiology. 2016, 7:925.

Поступила 06.12.18

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

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛАКТОБАЦИЛЛ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА У ЖИТЕЛЕЙ ТЮМЕНИ

Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии

Цель. Изучить видовой состав бактерий рода *Lactobacillus*, населяющих дистальный отдел толстого кишечника пациентов различных возрастных групп у жителей города Тюмень. *Материалы и методы.* Проанализировано содержание бактерий рода *Lactobacillus* в фекалиях 1545 жителей г. Тюмень в возрасте от 1 месяца до 76 лет, обратившихся с жалобами на дисфункцию кишечника. Выросшие колонии лактобацилл идентифицированы методом масс-спектрометрии. *Результаты.* Исследование видовой состава лактобацилл показало их широкое разнообразие в зависимости от возраста. Статистически значимые различия по содержанию в толстом кишечнике лактобацилл в различных возрастных группах пациентов выявлены по видам *L.rhamnosus* и *L.fermentum*. *Заключение.* Сведения о видовой характеристике лактобактерий, населяющих толстый кишечник пациентов с учетом возрастных особенностей, повысят эффективность проведения коррекции микробиоты толстого кишечника и профилактики воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 10—15

Ключевые слова: толстый кишечник, виды бактерий, род *Lactobacillus*, возраст

L.V.Kataeva, A.A.Vakarina, O.N.Kolotova, O.V.Posoyuznykh, V.V.Tashlanova, N.F. Karpukhina,
L.A.Bychkova

AGE FEATURES OF SPECIES DIVERSITY LACTOBACILL OF LARGE INTESTINE IN RESIDENTS OF TYUMEN

Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology, Russia

Aim. To study the species composition of bacteria of the genus *Lactobacillus*, inhabiting the distal large intestine of patients of different age groups, residents of the city of Tyumen. *Materials and methods.* The content of bacteria of the genus *Lactobacillus* in feces of 1545 residents of Tyumen aged 1 month to 76 years who complained of intestinal dysfunction was analyzed. Grown colonies of lactobacilli identified by mass spectrometry. *Results.* The study of the species composition of lactobacilli showed their wide diversity depending on age. Statistically significant differences in the content of lactobacilli in the large intestine in different age groups of patients were identified by the species *L. rhamnosus* and *L. fermentum*. *Conclusion.* Information on the species characterization of lactobacilli that inhabit the large intestine of patients, taking into account age-related features, will increase the effectiveness of the correction of the microbiota of the large intestine and the prevention of inflammatory diseases of the gastrointestinal tract.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 10—15

Key words: large intestine, species of bacteria, genus *Lactobacillus*, age

ВВЕДЕНИЕ

Среди всего многообразия микробиоты толстого кишечника наиболее важными ее представителями являются бактерии родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* ввиду их потенциального значения для поддержания гомеостаза системы человек — окружающая среда, сохранения здоровья населения, профилактики и лечения многих заболеваний различной этиологии [1,2,5].

В настоящее время изучено около 100 видов бактерий рода *Lactobacillus* семейства *Lactobacillaceae*, циркулирующих на растениях и в организме млекопитающих.

Интерес исследователей к бактериям рода *Lactobacillus* связан с их важными и разнообразными функциями: от участия в обменных процессах до способности ингибировать различные патогенные и условно патогенные микроорганизмы [6,9,12,13]. Известно также, что в толстом кишечнике здоровых взрослых людей наиболее часто встречаются 14 видов лактобацилл, среди них преобладают *L.brevis* (28%), *L.plantarum* (19%), *L.acidophilus* (12%), *L.casei* (9,5%) [2], кроме того, встречаются такие виды как *L.bulgaricus*, *L.salivarius*, *L.rhamnosus*, *L.reuteri* [11].

Проведенные ранее исследования свидетельствуют о том, что более чем у половины пациентов различных возрастов с жалобами на дисфункции кишечника, как при воспалительных заболеваниях, так и при паразитарных инвазиях отмечается дефицит лактобацилл в содержимом толстого кишечника [3,4]. Коррекция дисбиотических нарушений желудочно-кишечного тракта требует применения пробиотических препаратов. На современном этапе для этих целей аптечная сеть предлагает большое количество пробиотических препаратов, как монокомпонентных, так и поликомпонентных, относящихся к одному или нескольким родам. К сожалению, положительный эффект пробиотиков даже при длительном применении носит транзиторный характер и заканчивается при отмене препарата. По мнению исследователей, одной из главных причин неэффективности применения пробиотиков может быть чужеродность микроорганизмов для человека [5]. На наш взгляд, результативность приема пробиотических препаратов может быть низкой, в частности, вследствие того, что виды лактобацилл, входящие в состав применяемого пробиотика, не соответствуют аутофлоре конкретного пациента. В связи с этим исследования возрастных и региональных особенностей видовой структуры лактобацилл, обнаруживаемых в дистальных отделах толстого кишечника, остаются актуальными.

Цель исследования — изучение видового состава бактерий рода *Lactobacillus*, населяющих дистальный отдел толстого кишечника пациентов различных возрастных групп, жителей города Тюмень.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализировано содержание бактерий рода *Lactobacillus* в дистальных отделах толстого кишечника (при исследовании кала на дисбактериоз) 1545 пациентов в возрасте от 1 месяца до 76 лет, обратившихся с жалобами на дисфункцию кишечника. Видовой состав лактобацилл исследовали в следующих возрастных группах пациентов: 0-3 года; 4-14 лет; 17-54 года и 55-78 лет (пациенты 15 — 16 лет за период наблюдения не обращались с указанными жалобами).

Исследования кала на дисбактериоз кишечника проводились согласно ОСТУ 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Лактобациллы выделяли на плотной питательной среде — лактобакагаре. В соответствии с инструкцией по применению питательной среды для выделения и культивирования лактобацилл отбирали гладкие, круглые, белые, полупрозрачные или сероватые колонии диаметром не менее 1 мм. Все колонии микроорганизмов идентифицированы методом масс-спектрометрии. Принцип идентификации основан на спектральном анализе молекулярных масс белков. При изучении видового состава штаммов анализировали лактобациллы только с высоким уровнем видовой идентификации (показатель score более 2).

Статистическую обработку материала осуществляли в программе «Excel» с вычислением показателей: средней арифметической, ошибки и достоверности различий полученных результатов с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов исследования кала на дисбактериоз выявил дефицит ($\leq 10^5$ КОЕ/г фекалий) бактерий рода *Lactobacillus* в дистальном отделе толстого кишечника у 65,9 % пациентов. Таким образом, видовой состав лактобацилл изучен у 527 пациентов различных возрастных групп.

По результатам нашего исследования в фекалиях всех обследованных пациентов идентифицировано 19 видов лактобацилл. При этом, в возрастных группах 0—3 и 17—54 лет количество видов лактобацилл составило 14 и 15 соответственно, в то время как в группе пациентов 4—14 лет и старше 55 лет было определено только 6 и 7 видов соответственно. Таким образом, у детей старше 3 лет и пациентов старше 55 лет видовое разнообразие лактобацилл менее выражено. Важно подчеркнуть, что у 15 пациентов ($2,85 \pm 4,2$ %) обнаруживались два вида лактобацилл и у одного пациента — три вида. Структура видового состава лактобацилл, выделенных из кала пациентов различных возрастных групп и в целом, представлена в табл. Как видно из табл., в дистальных отделах кишечника преобладают такие виды лактобацилл как *L.rhamnosus*, *L.plantarum*, *L.fermentum*. Эти виды можно отнести к аллохтонным, то есть постоянно присутствующим в содержимом кишечника. Реже встречаются лактобациллы видов *L.paracasei*, *L.salivarius* и *L.gasseri*. Виды лактобацилл, обнаруженные у единичных пациентов (менее 3%), скорее всего, принадлежат к аутохтонным, то есть имеют транзитный характер.

При анализе видового состава лактобацилл содержимого толстого кишечника в различных возрастных группах выявлены некоторые особенности. Во всех возрастных группах пациентов в содержимом кишечника среди лактобацилл превалирует вид *L.rhamnosus*, так, в возрастной группе до 3 лет бактерии этого вида обнаруживаются у половины пациентов. С увеличением возраста происходит снижение частоты обнаружения *L.rhamnosus* в дистальных отделах толстого кишечника (рис.). При сравнении показателей частоты обнаружения лактобацилл этого вида у пациентов первых трех возрастных групп (0-3 года, 4-14 лет, 17-54) с группой пациентов 55 — 76 лет, определены статистически достоверные различия, $p \leq 0,01$.

L. plantarum стабильно определяются у 20% пациентов во всех возрастных группах. Статистически значимые различия отмечены по частоте обнаружения у пациентов *L.fermentum* в возрастных группах 4—14 и 55—76 лет. У пациентов старше 55 лет бактерии этого вида обнаруживаются чаще, $p \leq 0,05$.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о видовом разнообразии лактобацилл, населяющих толстый кишечник людей. Наличие различных видов лактобацилл, циркулирующих в толстом кишечнике, зависит от многих факторов: микрoэкологические нарушения при клинической патологии различного происхождения [Million M. et al., 2013], в том числе паразитарные инвазии [4,8], а также возраста [3] и характера питания. При преимущественном употреблении молочных продуктов доминируют такие виды как *L.delbrueckii*, *L.acidophilus*. Питание, состоящее из овощных блюд, предполагает содержание в кишечнике *L.plantarum*. Можно предположить, что на состав микробиоты человека оказывают влияние и региональные особенности [11]. Существенное значение в развитии дисфункции кишечника, связанного с дефицитом лактобацилл, имеет антибиотикотерапия (антибиотик-ассоциированные диареи); в соответствии с принятыми международными рекомендациями, всем больным, получающим антибиотики, должны назначаться антибиотикорезистентные пробиотики [7,10].

Анализ пробиотиков, в состав которых входят лактобациллы, показал, что отечественные лекарственные препараты содержат преимущественно *L. acidophilus* —

Структура видов бактерий рода *Lactobacillus*, выделенных из фекалий пациентов различных возрастных групп

Виды лактобацилл	Всего		0 — 3 лет		4 — 14 лет		17 — 54 лет		55 — 76 лет	
	кол-во чел.	% ± m	кол-во чел.	% ± m	кол-во чел.	% ± m	кол-во чел.	% ± m	кол-во чел.	% ± m
<i>L.rhannosus</i>	237	44,97±2,17	139	50,55±3,01*	20	46,51±7,61*	70	40,00±3,70*	8	23,53±7,27*
<i>L.plantarum</i>	106	20,11±1,75	58	21,09±2,46	8	18,61±5,93	33	18,86±2,96	7	20,59±6,93
<i>L.fermentum</i>	69	13,09±1,47	40	14,55±2,13	3	6,98±3,88*	18	10,29±2,30	8	23,53±7,27*
<i>L.paracasei</i>	34	6,45±1,07	12	4,36±1,23	5	11,63±4,89	13	7,43±1,98	4	11,76±5,53
<i>L.salivarius</i>	34	6,45±1,07	8	2,91±1,01	0	0	22	12,57±2,51	4	11,76±5,53
<i>L.gasseri</i>	23	4,36±0,89	11	4,00±1,18	4	9,30±4,43	6	3,43±1,38	2	5,88±4,04
<i>L.acidophilus</i>	6	1,14±0,46	2	0,73±0,51	1	2,33±2,30	3	1,71±0,96	0	0
<i>L.brevis</i>	5	0,95±0,42	0	0	0	0	5	2,86±1,26	0	0
<i>L.oris</i>	4	0,76±0,38	2	0,73±0,26	0	0	2	1,14±0,80	0	0
<i>L.delbrueckii</i>	3	0,57±0,33	0	0	0	0	2	1,14±0,80	1	2,94±2,9
<i>L.mucosae</i>	3	0,57±0,33	0	0	0	0	3	1,71±0,98	0	0
<i>L.vaginalis</i>	2	0,38±0,27	1	0,36±0,36	0	0	1	0,57±0,57	0	0
<i>L.reuteri</i>	2	0,38±0,27	1	0,36±0,36	0	0	1	0,57±0,57	0	0
<i>L.crispatus</i>	2	0,38±0,27	0	0	0	0	2	1,14±0,80	0	0
<i>L.agilis</i>	1	0,19±0,19	1	0,36±0,36	0	0	0	0	0	0
<i>L.johnsonii</i>	1	0,19±0,19	1	0,36±0,36	0	0	0	0	0	0
<i>L.sakei</i>	1	0,19±0,19	0	0	0	0	1	0,57±0,57	0	0
<i>L.antri</i>	1	0,19±0,19	1	0,36±0,36	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus spp.</i>	2	0,38±0,27	2	0,73±0,51	0	0	0	0	0	0
Всего пациентов	527		275		43		175		34	

Примечание. * Статистически значимые различия.

ацилакт, аципол, биобактан сухой, линекс. В биологически активных добавках, таких как витанар, гиалакт, бифиформ комплекс, витафлор, пробиотическим микроорганизмом также является *L. acidophilus*. В силу того, что они продуцируют микроцины с широким спектром антагонистической активности, их применение для подавления условно патогенных бактерий очень эффективно [2]. Но учитывая то, что в дистальных отделах кишечника содержание ацидофилов составляет всего $1,14 \pm 0,46$ %, для восстановления дефицита лактобацилл назначение пробиотиков, содержащих *L. acidophilus*, не очень результативно.

Для разработки комбинированных препаратов, состоящих из нескольких микроорганизмов, преимущественно встречающихся в содержимом кишечника, важно изучение не только их антагонистической активности в межштаммовых взаимоотношениях, но и определение видов лактобацилл, населяющих толстый кишечник с учетом возраста пациентов. Проведенные ранее исследования [6] свидетельствуют о том, что некоторые изученные штаммы *L. plantarum*, *L. delbrueckii* и *L. rhamnosus*, обладающие высокой антагонистической активностью, подавляют по 7 и 8 штаммов аналогичных видов. Высокий уровень антагонизма этих бактерий по отношению к представителям этого же рода и вида ограничивает их применение при реализации принципа совместного культивирования.

Таким образом, исследование видового состава лактобацилл, населяющих дистальный отдел толстого кишечника, показало их значительное разнообразие. Причем у детей старше 3 лет и пациентов старше 55 лет видовое разнообразие лактобацилл менее выражено. Статистически значимые различия по содержанию в толстом кишечнике лактобацилл в различных возрастных группах пациентов выявлены по видам *L. rhamnosus* и *L. fermentum*. Восстановление дефицита лактобацилл при дисбиозе кишечника необходимо осуществлять пробиотическими микроорганизмами с учетом сведений об их видовом составе в дистальных отделах кишечника конкретного пациента. Это, возможно, окажется более эффективным для восстановления дефицита лактобацилл и получения стойкого результата после отмены препаратов пробиотиков. Сведения о видовой характеристике лактобацилл, выделенных из толстого кишечника пациентов различных возрастных групп, дадут возможность более качественного проведения коррекции микробиоты толстого кишечника, что будет способствовать профилактике заболеваний желудочно-кишечного тракта воспалительного характера.

С нашей точки зрения, в качестве критерия при первичном скрининге перспективных штаммов для производства пробиотиков можно использовать спектр видов бактерий рода *Lactobacillus*, населяющих дистальный отдел толстого кишечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева И.В. Современные доказательные данные эффективности применения *Lactobacillus rhamnosus* GG и *Bifidobacterium lactis* Bb-12 в педиатрической практике. Вопросы современной педиатрии. 2011, 1(10):50-57.
2. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл. Бюллетень сибирской медицины. 2003, 46:50-55.
3. Катаева Л.В., Степанова К.Б., Степанова Т.Ф., Нижегородцева Н.Ф., Ташланова В.В. Возрастные особенности дисбиоза толстой кишки. Журн. микробиол. 2010, 1:76-80.
4. Катаева Л.В., Степанова К.Б., Степанова Т.Ф., Ташланова В.В., Швед Е.И., Нижегородцева Н.Ф., Бычкова Л.А. Возрастные особенности дисбиоза толстого кишечника при лямблиозной инвазии. Мед. паразитол. 2011, 1:7-10.
5. Нилова Л. Ю., Бойцов А.Г., Оришак Е.А. К вопросу о применении пробиотиков для коррекции дисбиоза толстого кишечника. Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. Мечникова И.И. 2008, 3(28):154-157.

6. Суржик А.В. Влияние пробиотической культуры *Lactobacillus rhamnosus* GG на иммунный ответ организма. Вопросы современной педиатрии. 2009, 2(8):54-58.
7. Урсова Н.И. Антибиотик-ассоциированная диарея: выбор пробиотика с позиций медицины, основанной на доказательствах. Трудный пациент. 2013, 2-3(11):22-28.
8. Geeta Shukla, Ramandeep Kaur Sidhu. *Lactobacillus casei* as a probiotic in malnourished *Giardia lamblia*-infected mice: a biochemical and histopathological study. Canadian J. Microbiol. 2011;57(2):127-135.
9. Huanlong Qin, Zhongwei Zhang, Xiaomin Hang et al. *L. plantarum* prevents Enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. BMC Microbiology. 2009, 9:63-69.
10. Johnson-Henry K.C., Donato K. A., Shen-Tu G. et al. *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG Prevents Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-Induced Changes in Epithelial Barrier Function. Infect. Immun. 2008, 76(4):1340-1348.
11. Mitsuoka T. Establishment of Intestinal Bacteriology. Bioscience of Microbiot, Food and Health. 2014, 33(3):99-116.
12. Vizoso Pinto M.G., Rodriguez Gómez M., Seifert S. et al. *Lactobacilli* stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. Int. J. Food. Microbiol. 2009 Jul 31, 133(1-2): 86-93.
13. Yujun Jiang, Xuena Lü, Chaoxin Man et al. *Lactobacillus acidophilus* Induces Cytokine and Chemokine Production via NF- κ B and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways in Intestinal Epithelial Cells. Clin. Vaccine Immunol. 2012, 19(4):603-608.

Поступила 08.12.18

Контактная информация: Катаева Любовь Владимировна, к.м.н.,
625026, Тюмень, ул. Республики, 147, р.т. (9097)40-50-74

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

В.М.Бержеиц¹, А.А.Бабахин², Н.С.Петрова¹, А.В.Васильева¹, С.В.Хлгатын¹, О.Ю.Емельянова¹

НОВЫЕ ФОРМЫ КЛЕЩЕВЫХ АЛЛЕРГОИДОВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, ²ГНЦ Институт иммунологии, Москва

Цель. Разработка технологии приготовления полимерного аллергоида, полученного путем модификации формальдегидом экстракта *Dermatophagoides farinae* и мономерного аллергоида, полученного методом сукцинирования *Dermatophagoides pteronyssinus*, и изучение их физико-химических и иммунологических свойств. *Материалы и методы.* В обработанных формальдегидом препаратах определяли содержание белка, изоэлектрические точки белковых компонентов с помощью метода изоэлектрофокусирования (ИЭФ), эстеразную активность препаратов. Антигенные свойства клещевого аллергоида изучали методами иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза. Для характеристики специфической активности клещевого аллергоида применяли микроточечный ИФА. Аллергоид, полученный методом сукцинирования, также был изучен по физико-химическим показателям. *Результаты.* Установлено, что в результате формализации происходит выраженное снижение аллергенной активности аллергоида. Также показано, что сукцинирование приводит к существенному снижению аллергенности мономерного аллергоида за счет блокады В-клеточных эпитопов и сохранению иммуногенности за счет Т-клеточных эпитопов. *Заключение.* Благодаря доказанному снижению аллергенности и повышению иммуногенности мономерные и полимерные аллергоиды могут быть рекомендованы для проведения аллергенспецифической иммунотерапии (АСИТ).

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 15—21

Ключевые слова: аллергенный экстракт, клещи домашней пыли, аллергенспецифическая иммунотерапия, формализация, сукцинирование, аллергоид, аллергенность, иммуногенность

NEW FORMS OF HOME DUST MITE ALLERGOID

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²State Scientific Centre Institute of Immunology, Moscow, Russia

Aim. The purpose of this study is to create the technology of preparation of the polymeric allergoid received by chemical modification of *Dermatophagoides farinae* extract by a formaldehyde and a monomeric allergoid of *Dermatophagoides pteronyssinus* received by succinilation and studying of their physical, chemical and immunologic properties. *Materials and methods.* In the modification species determined the protein content, isoelectric points of protein components by a method of isoelectrofocusing (IEF), esterase activity. Antigenic properties of allergoid studied by methods of an immunodiffusion and an immunoelectrophoresis. Applied microdot immunoenzyme assay to characterize the specific activity of a resulting allergoid. Received by a succinilation allergoid was also studied on physical and chemical indicators. *Results.* It is established that the formalinization is resulted by the expressed depression of allergenic activity of an allergoid. It is also shown that succinilation leads to essential depression of allergenicity of a monomeric allergoid due to blockade of B-cellular epitopes and to conservation of an adjuvanticity helps to T-cellular epitopes. *Conclusion.* Thanks to the proved depression of allergenicity and rising of an adjuvanticity monomeric and polymeric allergoid can be recommended for carrying out allergenspecific immunotherapy (ASIT).

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 15—21

Key words: allergenic extract, home dust mite allergens, allergenspecific immunotherapy, formalinization succinilation, allergoid, allergenicity, immunogenicity

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время около 150 млн людей в Европе и до 1 млрд в мире страдают аллергическими заболеваниями. По оценке Всемирной Организации Аллергии (WAO) данные заболевания охватывают 30 — 40% населения. Европейская академия аллергии и клинической иммунологии прогнозирует, что через 15 лет более 50% населения Европы будет страдать от той или иной формы аллергии [10, 14]. Тенденция распространения данной патологии сохраняется на протяжении последних лет и за рубежом, и у нас в стране. По данным статистики из разных источников той или иной формой аллергии страдает от 17,5% до 30% населения России [7]. Основным сенсибилизирующим компонентом жилища человека, инициирующим формирование атопических заболеваний верхних и нижних дыхательных путей, являются пироглифидные клещи рода *Dermatophagoides*. Во всем мире примерно 10—20% населения и 90% больных бронхиальной астмой имеют гиперчувствительность к клещам домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae*, чья причинно-значимая роль в появлении симптомов атопических аллергических заболеваний достоверно установлена [15, 16]. Клещи домашней пыли являются основной причиной таких аллергических заболеваний, как бронхиальная астма, круглогодичный ринит и атопический дерматит [17, 18]. Поэтому необходима разработка новых эффективных подходов к терапии и профилактике аллергических состояний, вызванных сенсибилизацией к ним. Единственным патогенетическим методом лечения атопических заболеваний на данный момент является аллергенспецифическая иммунотерапия (АСИТ) [1]. Настоящее и будущее АСИТ связано с повышением ее безопасности и эффективности, в связи с чем современные исследования направлены на разработку новых усовершенствованных препаратов.

Изначально для проведения АСИТ использовали водно-солевые экстракты (ВСЭ) из культуры клещей. Но главными недостатками таких препаратов были их

высокая аллергенность и слабые иммуногенные свойства. Снижение аллергенности и повышение иммуногенности препаратов путем модификации различными химическими агентами всегда являлось актуальным направлением в разработке современных форм для проведения АСИТ. Изначально были получены алергоиды — препараты аллергенов, полимеризованных формальдегидом и глутаральдегидом. Снижение аллергенности (блокада IgE-связывающих эпитопов альдегидными группами) и одновременное усиление иммуногенности модифицированных препаратов достигалось за счет увеличения молекулярной массы и устойчивости к влиянию денатурирующих агентов, с чем связан также пролонгирующий эффект [6,9]. Полимеризованные аллергены по сравнению с нативными экстрактами аллергенов более интенсивно стимулируют увеличение циркулирующих Treg при АСИТ [19]. Из литературных источников известно о выраженном снижении аллергенности ВСЭ после их полимеризации [5,8,11]. В дальнейшем модификация аллергенов проводилась различными химическими агентами, с помощью которой получали мономерные препараты. Данные алергоиды могут быть получены путем сукцинирования (обработка янтарным ангидридом), малеинирования (обработка малеиновым ангидридом), карбомилирования (реакция с цианатом калия) различных аллергенных экстрактов [9,12,13]. Мономерные алергоиды обладают необходимыми для АСИТ характеристиками: сниженная гипоаллергенность и высокая иммуногенность. Рост аллергических заболеваний среди населения диктует необходимость постоянного совершенствования различных форм лечебных препаратов аллергенов.

Цель данного исследования — разработать технологии приготовления полимерного алергоида, полученного путем модификации формальдегидом экстракта *Dermatophagoides farinae* и мономерного алергоида, полученного методом сукцинирования, *Dermatophagoides pteronyssinus*, и изучить их физико-химические и иммунологические свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Ранее была разработана технология получения алергоида из клещей *D. farinae*, а также изучены его физико-химические и иммунологические свойства. Модифицированные формы клещевого аллергена получали путем обработки клещевого экстракта формальдегидом (одноэтапный метод по Marsh D., 1970) и глутаровым альдегидом (методом Nakada Sh., 1985). Определяли содержание белка (по Sedmak J., 1977), изоэлектрические точки белковых компонентов клещевого аллергена и алергоида с помощью метода изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в агарозном геле, эстеразную активность препаратов спектрофотометрически по начальным скоростям гидролиза синтетического субстрата — этилового эфира бензоил-L-аргинина (по методу Пасхина Т.С., 1968). Проводили гель-фильтрацию на сефарозе G-100 и сефакриле S-300. Антигенные свойства клещевого алергоида изучали методами иммунодиффузии (Ouchterlony O., 1958) и иммуноэлектрофореза (Аксельсен Н., 1977). Реакцию активной системной анафилаксии воспроизводили на морских свинках (метод Титова С.М., 1973). Для изучения аллергенных свойств препаратов использовали сыворотки больных с сенсибилизацией к клещам *D. farinae*. Для характеристики специфической активности клещевого аллергена и алергоида применяли микроточечный ИФА (МТИФА) (Михайлов А.Г., 1991). Степень снижения аллергенности модифицированного формальдегидом препарата оценивали с помощью метода, основанного на количественном определении гистамина в условиях *in vitro* с помощью спектрофлуориметрического метода (Shore P., 1959).

На настоящий момент отработана технология получения модифицированной формы аллергена в виде мономерного аллергоида (sD1) на основе водно-солевого экстракта из клещей *D. pteronyssinus* методом сукцинилирования. Данная технология основана на модификации специфических белков путем сукцинилирования е-групп лизина, приводящего к «разворачиванию» белковой молекулы. Клещевой экстракт получен согласно действующему регламенту ФСП ЛП-000701, отвечающему требованиям ОФС 1.7.1.0001.15., и на основании патента RU №2331437 (НИИВС им.И.И. Мечникова). Лиофилизированный экстракт модифицирован сукцинилированием янтарным ангидридом (сD1).

В раствор D1 (концентрация 1—5% по общему белку) при pH 8,5—9 и комнатной температуре вводили порциями янтарный ангидрид (ЯА) при массовом соотношении ЯА: белок = 1:1, непрерывно поддерживая указанный pH. После стабилизации pH (окончание реакции) раствор диализовали и лиофильно высушивали. Степень модификации определяли количественно по реакции с ТНБС (2,4,6-тринитробензолсульфо кислота). Концентрации белка в полученных образцах измеряли методом Бредфорда. С целью анализа белков в нативном (D1) и модифицированном экстрактах (sD1) использовали стандартную методику электрофореза. Эквивалентные количества D1 и sD1 (по общему белку) после растворения в буфере образца и денатурирования вносились в объеме 10 мкл в 15% полиакриламидный гель. Электрофорез проводили в камере VE-10(Helicon) при ограничении напряжения 200 вольт в течение 1,5 ч. Проявление производили красителем Coomassie Brilliant Blue. В качестве контроля молекулярной массы использовали стандартные маркеры SeeBlue (Thermo Fisher Scientific) и PageRuler (Thermo Fisher Scientific).

Для выявления присутствия в экстракте D1 мажорного аллергена Der p 1 был получен его масс-спектр на масс-спектрометре Agilent 6460 (USA) при помощи использования ионизации электроспреем — Electro Spray Ionization (ESI). Для оценки изменений третичной структуры белковых молекул использован метод спектрально-го кругового дихроизма (КД). Образцы экстракта D1 и модифицированного производного sD1, как и главного аллергена Der p 1 и его сукцинилированной формы sDer p 1 растворяли в PBS. Изучение аллергенности sD1 проводили методом торможения реакции связывания аллерген-специфического IgE, используя пуллированную сыворотку от 5 больных с сенсibilизацией к *D. pteronyssinus* (III—V классов). Оценку иммуногенности D1 и sD1 осуществляли на мышах-самках линии BALB/c. Мышей BALB/c иммунизировали внутривбрюшинно четырехкратно с интервалом в 3 нед. D1 или sD1 в дозе 100 мкг/мышь (по белку) как без адьюванта, так и с адьювантом — Al(OH)3 (в дозе 2 мг/мышь).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение клещевого аллергена, модифицированного глутаровым альдегидом, показало, что данная обработка не привела к увеличению молекулярной массы и не вызвала значительных изменений pI белков по сравнению с немодифицированным препаратом. Дальнейшие исследования были связаны с модификацией клещевого аллергена с помощью формальдегида. ИЭФ образцов исходного сырья и аллергоида позволил выявить различие в значениях pH белковых фракций этих препаратов. Было обнаружено, что фракции немодифицированного аллергена более гетерогенны по заряду и располагаются в нейтральной и кислой областях pH. Фракции аллергоида фокусировались в более кислых значениях pH. Различия в результатах ИЭФ обусловлены взаимодействием формальдегида с положительно заряженными группами белковых компонентов аллергена, при котором происходит изменение суммарного поверхностного заряда. Проведение гель-фильтрации образцов натив-

ного и модифицированного клещевых аллергенов на колонке с Сефакрилом S-S00 показало, что оба образца элюировали одним пиком, однако максимум кривой элюции алергоида был несколько сдвинут в более высокомолекулярную область, но при этом объем его выхода был несколько меньше. Это связано с конформационными преобразованиями белковых компонентов клещевого аллергена в результате их взаимодействия с формальдегидом. Определение эстеразной активности показало ее значительное снижение после обработки клещевого аллергена формальдегидом. Клещевой алергоид сохранил лишь 8% активности исходного клещевого аллергена. Изучение антигенных свойств клещевого аллергена и алергоида проводили иммунохимическими методами с использованием полученных кроличьих антисывороток. Результаты реакции двойной радиальной иммунодиффузии в агаровом геле показали, что каждый препарат формирует отчетливые преципитаты с гомологичными антисыворотками. Выраженное взаимодействие клещевого аллергена с антиалергоидной сывороткой указывало, что в антиалергоидной сыворотке присутствуют антитела, сходные по специфичности с антителами, присутствующими в сыворотке животных, иммунизированных нативным клещевым аллергеном.

Для получения мономерного алергоида экстракт клещей домашней пыли *D. pteronissinus* (D1) модифицировали сукцинированием, после чего определяли степень модификации и концентрацию белка. Сукцинирование связано с модификацией ϵ -групп лизина белка, что приводит к разворачиванию белковой молекулы. Степень модификации экстракта D1 составила 98,9%. Концентрация общего белка в образцах D1 и модифицированного сукцинированием экстракта (sD1) составляла соответственно 17,71 и 63,25 мкг/мг. В модифицированном препарате увеличение концентрации белка происходило за счет диализа после процесса модификации. По результатам электрофореза можно сделать вывод, что модификация D1 существенно не влияет на размер молекул белка в экстракте. Основное количество вещества принадлежит двум фракциям — низкомолекулярной и фракции порядка 12—13 кДа. Масс-спектрометрический анализ образца D1 выявил характеристические значения m/z (отношение массы к заряду), которые свидетельствуют о присутствии Der p 1 в экстракте D1. Изучение алергенности sD1 показало, что модификация экстракта D1 путем сукцинирования приводит к существенному ее снижению. Методом ИФА и хемилюминесцентного анализа показано, что связывание специфического анти-Der p IgE с sD1 выражено более существенно, чем с немодифицированным D1. Уровень гистамина, высвобождающегося из лейкоцитов крови больных с сенсibilизацией к *D. pteronissinus* после ее инкубации с sD1 был значительно ниже такового при инкубации с немодифицированным экстрактом D1. Для высвобождения одного и того же количества гистамина требовалась концентрация sD1, в 100 раз превышающая концентрацию D1. При этом, как D1, так и sD1, взятые в широком диапазоне концентраций, не обладали гистамин-высвобождающим действием при инкубации с кровью доноров, не сенсibilизированных к Der p. Изучение иммуногенности sD1 в сравнении с D1 при иммунизации мышей BALB/c с адьювантом $Al(OH)_3$ или без него выявило ожидаемые изменения, характерные тем, что получены ранее при использовании модельного алергена овальбумина. При иммунизации мышей D1 или sD1 без адьюванта выраженный анти-Der p IgE-ответ наблюдался только после четвертой иммунизации, причем у мышей, иммунизированных немодифицированным D1, он был значительно выше такового при иммунизации sD1. При иммунизации мышей sD1 с адьювантом $Al(OH)_3$ анти-Der p IgE-ответ даже после 4 иммунизации был существенно ниже такового, чем при иммунизации D1 с $Al(OH)_3$. Анти-Der p IgG1-ответ при иммунизации sD1 без адьюванта был выше такового при иммунизации только D1, а при иммунизации D1 и sD1 с адьювантом уровень анти-Der p IgG1

были сходными после 2 и последующих иммунизаций. В то же время, уровень анти-Der p IgG2a, начиная с 3 иммунизации, был существенно выше при иммунизации sD1 по сравнению с иммунизацией D1 как с адьювантом, так и без него.

Одной из главных задач данного исследования являлось получение модифицированного полимерного препарата клещевого аллергена путем его формализации. Результатом модификации нативного аллергена является образование химических связей в виде внутримолекулярных метиленовых «мостиков», что приводит к химическим и конформационным изменениям компонентов клещевого аллергена. С помощью методов МТИФА и количественного определения гистамина, секретиремого тучными клетками крысы, установлено что, в результате формализации снижается способность клещевого алергоида взаимодействовать со специфическими к немодифицированному клещевому аллергену IgG антителами животных и IgE антителами человека. Это доказывает значительное снижение аллергенной активности модифицированного препарата. При этом иммуногенные свойства клещевого алергоида сохранены, и препарат способен индуцировать выработку антител, специфичных к немодифицированному клещевому аллергену. Совокупность данных, полученных в работе, свидетельствует о том, что данная форма модификации водно-солевого аллергена может быть использована для приготовления лечебного алергоида путем формализации.

Из данных литературных источников, посвященных химической модификации аллергенов, известна возможность модификации аллергена путем точечной блокады ϵ -групп лизина в молекуле белка за счет конъюгации с носителем, которая приводит к заметному снижению аллергенности при сохраненной иммуногенности [2]. В ходе исследований стало очевидно, что блокаду ϵ -групп лизина можно осуществить ацилированием путем прямого воздействия, например, янтарного ангидрида. Используя модельный аллерген овальбумин, показано, что обработка янтарным ангидридом (сукцинирование) приводила к существенному снижению аллергенности за счет блокады В-клеточных эпитопов и сохранению иммуногенности за счет Т-клеточных эпитопов, в значительно меньшей степени подвергнутых модификации. Экспериментальная АСИТ сукцинированным овальбумином (ОА) на мышинных моделях бронхиальной астмы и атопического дерматита показала более выраженный терапевтический эффект по сравнению с АСИТ немодифицированным ОА при лучшем профиле безопасности за счет пониженной аллергенности [3,4]. Данный подход (сукцинирование) теоретически может быть применен к любому аллергенному экстракту, что расширяет возможности создания новых препаратов мономерных алергоидов для безопасной и эффективной АСИТ. В данном исследовании использован экстракт из клещей домашней пыли *D. pteronyssinus*, подвергнутый модификации сукцинированием с целью получения мономерного алергоида. Показано, что аллергенность (IgE-связывающая активность) сукцинированного экстракта sD1 значительно ниже таковой у немодифицированного, причем иммуногенность в плане индукции антиаллергенных (анти-Der p) антител субклассов G1 и G2a была даже несколько выше, чем у немодифицированного экстракта D1. Таким образом, полученный гипоаллергенный мономерный алергоид из клещей домашней пыли *D. pteronyssinus* может служить примером разработки препаратов алерговакцин для безопасной и эффективной АСИТ. То обстоятельство, что сукцинированный экстракт sD1 сохраняет мономерность, является очень важной характеристикой, позволяющей использовать такие препараты алерговакцин для сублингвальной АСИТ. Предполагают, что мономерные алергоиды могут быть рекомендованы для проведения сублингвальной АСИТ, а полимерные алергоиды — для классической инъекционной АСИТ. Это связано с тем, что полимерные

аллергоиды (полученные обработкой альдегидами) значительно труднее проникают через слизистую мембрану из-за большого размера конгломератов, состоящих из 150—250 отдельных белковых молекул [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Астафьева Н.Г., Гамова И.В., Удовиченко Е.Н. и др. Место аллергенспецифической иммунотерапии в лечении атопии. *Consilium medicum*. 2013, 3:55-61.
2. Бабахин А.А., Ласкин А.А., Смирнов В.В., Андреев С.М., Бабиевский К.К., Гушин И.С., Хаитов М.Р. Мономерный аллергоид из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*: иммунологические свойства. *Российский аллергологический журнал*. 2016, 4(5):29-36.
3. Бабахин А.А., Литвин Л.С., Стеценко О.Н. и др. Аллерген-специфическая иммунотерапия химически модифицированными аллергенами. Часть 2. Гипосенсибилизация аллерготропином (комплексом мономерного аллергоида и иммуномодулятора полиоксидония) на модели экспериментальной аллергической бронхиальной астмы. *Физиология и патология иммунной системы*. 2011, 11:3-22.
4. Бабахин А.А., Шершакова Н.Н., Камышников О.Ю. и др. Аллерген-специфическая иммунотерапия химически модифицированными аллергенами. Часть 3. Эффективность аллергенной иммунотерапии мономерным аллергоидом, адьювантированным липидированным экзополисахаридом из *Shigella sonnei*, на экспериментальной модели атопического дерматита. *Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика*. 2014, 9:3-26.
5. Игнатов А.А., Раменская Г.В., Смирнов В.В. Современные основы стандартизации препаратов аллергенов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2015, 1:16.
6. Курбачева О.М., Ильина Н.И. Лечение аллергического ринита: когда, как и зачем? *Российский аллергологический журнал*. 2006, 2:66-75.
7. Матвеева Л.П., Ермакова М.К. Экспертиза лечения поллиноза у детей аллергоидами и аллергенами. *Проблемы экспертизы в медицине*. 2006, 3:42-44.
8. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В. и др. Аллерготропин для лечения поллинозов и способ лечения поллинозов. Описание изобретения к патенту №2205661 от 13.07.2001г. 2001:1-5.
9. Cirkovic T.D., Bukilica M.N., Gavrovic M.D. et al. Physicochemical and immunologic characterization of low-molecular weight allergoids of *Dactylis glomerata* pollen proteins. *Allergy*. 1999, 54:128-134.
10. Jarvis D., Newson R., Lotval J. et al. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: The GA2LEN survey in Europe. *Allergy*. 2012, 67:91-98.
11. Lockey R.F. «ARIA»: global guidelines and new forms of allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunology*. 2001, 108:497-499.
12. Mistrello G., Brenna O., Roncarolo D. et al. Monomeric chemically modified allergens: immunologic and physicochemical characterization. *Allergy*. 1996, 51:8-15.
13. Mistrello G., Roncarolo D., Zanoni D. et al. Allergic relevance of *Cupressus arizonica* pollen extract and biological characterization of the allergoid. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2002, 129:296-3004.
14. Papadopoulos N.G., Agache I., Bavbek S. et al. Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA. *Clinical and Translational Allergy*. 2012, 2:1-3.
15. Platt-Mills T.A. The future of allergy and clinical immunology lies in evaluation, treatment and research on allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002, 110:565-566.
16. Platt-Mills T.A., Ervin E.A., Heymann P.W., Woodfolk J.I. Pro: The evidence for a causal role of dust mites in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009, 180:109-121.
17. Platts-Mills T.A., Carter M.C. Asthma and indoor exposure to allergens. *N. Engl. J. Med.* 1997, 336:1382-1384.
18. Sporic R., Chapman M.B., Platts-Mills T.A. House dust mite exposure as a cause of asthma. *Clin. Exp. Allergy*. 1992, 22:897-906.
19. Urry Z.L., Richards D.F., Black C. et al. Depigmented-polymerised allergoids favour regulatory over effector T cells: enhancement by $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3. *BMC Immunol. PabMed*. 2014. doi: 10.1186/1471-2172-15-21.

Поступила 18.12.18

Контактная информация: Бержец Валентина Михайловна, д.б.н., 105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

Л.Н.Лухверчик¹, Г.И.Алаторцева¹, Л.Н.Нестеренко¹, В.В.Доценко¹, И.И.Амиантова¹, М.В.Жукина¹, В.Ю.Кабаргина¹, М.Р.Бобкова², Е.В.Казеннова², В.В.Зверев^{1,3}

ВЛИЯНИЕ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ НА ИЗМЕНЕНИЯ СПЕКТРА СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ИНДИВИДУАЛЬНЫМ АНТИГЕНАМ ВИЧ-1 У ЛИЦ, ИНФИЦИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ СУБТИПАМИ ВИРУСА

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, ³Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва

Цель. Оценить уровень антител (АТ) к антигенам ВИЧ-1 у инфицированных различными субтипами вируса лиц, получавших и не получавших антиретровирусную терапию (АРТ). *Материалы и методы.* Исследованы образцы сывороток крови от ВИЧ-1 инфицированных лиц субтипами А1, В и С (АРТ+) — 40 чел., (АРТ-) — 29 чел. АТ определяли методом модифицированного линейного иммуноанализа. Для каждого образца рассчитывали индексы позитивности по каждому антигену. *Результаты.* Выявлены разнонаправленные изменения уровня АТ к антигенам ВИЧ-1 у лиц, инфицированных различными субтипами вируса на фоне АРТ и без ее проведения. *Заключение.* Изучение изменений спектра АТ к белкам ВИЧ-1 у лиц, инфицированных различными субтипами вируса, на фоне АРТ, является перспективным для разработки дополнительных динамических критериев оценки развития ВИЧ-инфекции.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 22—27

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, линейный иммуноанализ, антитела, субтип ВИЧ-1, антиретровирусная терапия

L.N.Lukhverchik¹, G.I.Alatorseva¹, L.N.Nesterenko¹, V.V.Dotsenko¹, I. I.Amiantova¹, M.V.Zhukina¹, V.Yu. Kabargina¹, M.R.Bobkova², E. V.Kazenнова², V.V. Zverev^{1,3}

ANTIRETROVIRAL THERAPY EFFECT ON SPECIFIC ANTIBODIES SPECTRUM CHANGES TO HIV-1 INDIVIDUAL ANTIGENES FROM PERSONS INFECTED WITH DIFFERENT VIRUS SUBTYPES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, ³First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Aim. To estimate the antibodies (Ab) level to HIV-1 antigens in persons infected with virus various subtypes, which received and didn't receive antiretroviral therapy (ART). *Materials and methods.* Blood serum samples of HIV-1-infected with subtypes А1, В and С (ART+) — 40 persons, (ART-) — 29 persons. Ab were determined by modified linear immunoassay. Positivity indices for each antigen were calculated for each sample. *Results.* Multidirectional changes in the Ab level to HIV-1 antigens were revealed in persons infected with virus various subtypes at the ART background and without it. *Conclusion.* The study of Ab spectrum changes in persons infected with virus various subtypes at the ART background is promising for the additional dynamic criteria development for HIV infection progress estimation.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 22—27

Key words: HIV-infection, linear immunoassay, antibodies, subtype of HIV-1, antiretroviral therapy

ВВЕДЕНИЕ

Идентификация антител (АТ) к антигенам вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) является основным методом лабораторной диагностики. АТ к ВИЧ появляются у 90—95 % инфицированных в течение 1 месяца после заражения. Для их

определения последовательно используют два высокочувствительных и высокоспецифичных метода — иммуноферментный анализ и линейный иммуноанализ [1].

Однако, кроме диагностической, АТ к ВИЧ играют важную роль в иммунном ответе. АТ к поверхностным белкам ВИЧ, таким как gp120 и gp41, способствуют нейтрализации вируса. На эффективность нейтрализации вируса специфичными АТ влияют различные факторы: аминокислотная последовательность и пространственная структура эпитопов, степень гликозилирования и стабильность поверхностных белков ВИЧ [12].

Данные АТ, связавшись с зараженными ВИЧ клетками, уничтожают их путем антителозависимой клеточной цитотоксичности. Этот механизм элиминации зараженных клеток хорошо изучен у больных с бессимптомной ВИЧ-инфекцией. Доказано, что его эффективность тесно связана с благоприятным течением заболевания [3]. Однако малоизученными остаются изменения спектра специфических АТ и их вируснейтрализующей активности на поздних стадиях ВИЧ-инфекции при проведении антиретровирусной терапии (АРТ).

Поэтому целью нашей работы было изучение спектра и содержания АТ к антигенам ВИЧ-1 в образцах сывороток крови от инфицированных различными субтипами вируса лиц, получавших и не получавших АРТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 69 образцов сывороток крови от инфицированных различными субтипами ВИЧ-1 лиц, не получавших АРТ (АРТ–) — 29 чел. и получавших АРТ (АРТ+) — 40 чел. Исследуемые образцы были предварительно охарактеризованы сотрудниками НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. Основные характеристики групп, сформированных для проведения исследований, представлены в табл.

Основные характеристики исследованных групп пациентов, инфицированных различными субтипами ВИЧ-1

Основные показатели	Инфицированные субтипом А1:		Инфицированные субтипом В:		Инфицированные субтипом С:	
	АРТ– (n=8)	АРТ+ (n=8)	АРТ– (n=11)	АРТ+ (n=26)	АРТ– (n=10)	АРТ+ (n=6)
Возраст (M±m), лет	34,4±3,0	36,0±2,5	34,4±2,8	42,7±2,2	40,3±4,0	42,8±6,7
Женщины, %	63	63	64	38	80	33
Мужчины, %	37	37	36	62	20	67
Срок заболевания (M±m), лет	3,8±0,7	7,4±1,4	4,7±1,3	5,4±0,7	2,2±0,4	2,1±0,9
Путь заражения: половой, %	50	25	36	35	60	50
в/в наркомания, %	50	75	64	65	40	50
Стадия ВИЧ-инфекции:						
3, %	50	-	36	4	60	-
4А, %	12	63	36	42	30	33
4Б, %	38	13	14	35	10	50
4В, %	-	24	14	19	-	17
Количество CD4-клеток (M±m), клеток в мл	411±106,4	385,5±91,8	522,8±105,5	369,3±46,7	439,7±62,1	588,5±243,5
Вирусная нагрузка (M±m), кол-во копий в мл	788257±65470	39469±2527	54723±2140	129383±6071	312389±19506	1732558±184234

Специфические АТ определяли методом линейного иммуноанализа с использованием экспериментально модифицированного набора реагентов «Блот-ВИЧ 1/2+0» (ЗАО БТК «Биосервис»), в котором на стрипы нитроцеллюлозных мембран дополнительно были нанесены линии с иммобилизованными рекомбинантными антигенами Vif и Nef. По окончании стандартной процедуры линейного иммуноанализа стрипы иммуносорбента сканировали, полученное изображение анализировали с помощью компьютерной программы «TotalLab-TL120». На основании оценки интенсивности окрашивания линий стрипа, включая контрольную, рассчитывали индекс позитивности (ИП) для каждого образца как соотношение интенсивности окрашивания линий с антигенами ВИЧ-1, включая Vif и Nef, к интенсивности окрашивания линии с отрицательным контрольным антигеном. Для каждой группы рассчитывалось среднее значение ИП. Все статистические расчеты проводили с помощью программы «Excel 2013»: пакет «Анализ данных».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных результатов показал неоднозначные изменения в содержании АТ к индивидуальным антигенам ВИЧ-1 у лиц, инфицированных различными субтипами вируса.

ИП АТ к белку gp160 (Env1) у лиц с субтипами А1 и В мало изменялись на фоне АРТ ($12,0 \pm 1,1$ против $10,7 \pm 1,9$ и $14,7 \pm 1,1$ против $14,3 \pm 1,2$, соответственно). У пациентов, инфицированных субтипом С ВИЧ-1, при получении АРТ уровень АТ к gp160 увеличивался почти в 2 раза по сравнению с нелечеными пациентами ($17,5 \pm 2,2$ против $9,0 \pm 1,2$).

Не оказывало существенного влияния проведение АРТ и на содержание АТ к gp41 в сыворотке крови лиц, инфицированных субтипами А1 ($8,8 \pm 0,7$ против $8,9 \pm 0,9$) и В ($12,5 \pm 0,9$ против $13,4 \pm 1,8$). Однако у лиц с ВИЧ-1 субтипа С при АРТ уровень АТ к gp41 повышался в 2 раза ($14,6 \pm 2,5$ против $7,3 \pm 1,1$).

Количество АТ к белку Gag-1 при проведении АРТ увеличивалось у инфицированных субтипом А1 в 1,3 раза ($13,4 \pm 1,9$ против $10,6 \pm 1,6$) и субтипом С в 1,2 раза ($12,1 \pm 1,7$ против $10,5 \pm 2,5$). В то же время, у пациентов, инфицированных субтипом В, наблюдалось значительное снижение в 1,4 раза содержания АТ к белку Gag-1 в сыворотке крови ($8,8 \pm 0,6$ против $12,3 \pm 1,5$).

Среднее значение ИП АТ к антигену p51 в сыворотке крови при проведении АРТ снижалось почти в 2 раза ($4,3 \pm 0,6$ против $8,4 \pm 0,8$) у лиц с ВИЧ-инфекцией, вызванной субтипом В. У инфицированных субтипом А1 на фоне АРТ содержание АТ данной специфичности практически не менялось ($8,3 \pm 0,9$ против $9,0 \pm 0,9$). А у пациентов с субтипом С, получавших АРТ, наоборот, даже наблюдалось небольшое увеличение количества АТ к антигену p51 ($6,6 \pm 1,5$ против $5,0 \pm 1,4$).

При оценке уровня АТ к белку p31 была иная картина: при проведении АРТ отмечено повышение их количества во всех анализируемых группах. У инфицированных субтипом А1 — в 2 раза ($6,0 \pm 0,8$ против $3,0 \pm 0,9$), у инфицированных субтипом В — в 1,9 раза ($6,2 \pm 0,8$ против $3,2 \pm 0,9$), у инфицированных субтипом С — в 1,4 раза ($3,7 \pm 0,9$ против $2,7 \pm 0,8$).

Уровень АТ к Vif повышался в 2,6 раза у лиц, инфицированных субтипом С ВИЧ-1, при проведении АРТ — от $0,7 \pm 0,08$ до $1,8 \pm 0,3$. У лиц с субтипами А1 и В количество АТ к Vif не изменялось на фоне АРТ, в сравнении с нелечеными пациентами, инфицированными этими же субтипами ($0,9 \pm 0,04$ против $1,0 \pm 0,02$ и $0,9 \pm 0,07$ против $0,9 \pm 0,09$, соответственно).

Аналогичная картина наблюдалась при оценке содержания АТ к Nef, которые снижались в 3 раза в группе лиц с субтипом А1 на фоне АРТ ($1,0 \pm 0,05$ против $3,0 \pm 0,9$). У пациентов, инфицированных субтипами В и С, проведение АРТ не оказывало влияния на уровень АТ к Nef ($2,5 \pm 0,6$ против $2,5 \pm 0,9$ и $1,0 \pm 0,06$ против $1,0 \pm 0,02$, соответственно).

Анализ изменения уровня АТ у ВИЧ-инфицированных, получавших и не получавших АРТ, выявил его зависимость от субтипа вируса и функционального назначения исследуемых белков ВИЧ-1 (структурных, регуляторных).

У пациентов, инфицированных субтипами А1 и В, не наблюдалось изменений количества АТ к белкам gp160 (Env1) и gp41 на фоне АРТ. А у лиц, инфицированных субтипом С ВИЧ-1, при получении АРТ их уровень вырос практически в 2 раза по сравнению с нелечеными пациентами. АТ к поверхностным гликопротеинам, в том числе к gp160, и трансмембранному белку gp41 появляются в крови практически сразу после инфицирования [4]. Они способны к нейтрализации вируса и подавлению его репликации. АТ к gp160 и gp41 препятствуют взаимодействию ВИЧ с CD4 рецептором клетки мишени [10]. Пока нет убедительных данных о корреляции между титром нейтрализующих АТ и клиническим течением заболевания. Однако, подтверждено, что их высокий уровень ассоциируется с более благоприятным течением ВИЧ-инфекции [9]. Таким образом, оценка содержания АТ к gp160 и gp41 может служить косвенным показателем благоприятного течения инфекции у ВИЧ-инфицированных.

Показана разнонаправленная динамика изменений содержания АТ к белку Gag-1 при проведении АРТ: у лиц, инфицированных субтипами А1 и субтипом С, уровень данных антител повышался, а у пациентов, инфицированных субтипом В, наоборот, понижался. Белок Gag-1 (p24) является одним из сердцевинных белков вируса и кодируется геном gag. Первичным продуктом его трансляции является p53, из которого, в конечном итоге, образуются белки p17 и p24. У ВИЧ-инфицированных в большинстве случаев АТ образуются именно к этим антигенам. При этом p24 является более иммуногенным, чем p17 [2].

Количество АТ к антигену p51 в сыворотке крови при проведении АРТ снижалось у лиц с ВИЧ-инфекцией, вызванной субтипом В. У инфицированных субтипом А1 на фоне АРТ их содержание практически не менялось. А у инфицированных субтипом С наблюдалось небольшое повышение АТ к p51. Уровень АТ к p31 после проведения АРТ повышался во всех анализируемых группах. Ген pol кодирует белки p51 и p31 — ферменты, обратную транскриптазу (ОТ) и интегразу ВИЧ. ОТ обеспечивает превращение вирусной РНК в провирусную ДНК в цитоплазме CD4-клеток, что является критическим этапом жизненного цикла вируса. Активация CD4-клетки приводит к интеграции провирусной ДНК. Латентно инфицированные, покоящиеся CD4-клетки, содержащие неинтегрированную ДНК ВИЧ, образуют длительно существующие резервуары инфекции [6]. Интеграция провирусной ДНК в ядро клетки является предпосылкой для синтеза новых вирионов, для этого обязательно наличие фермента интегразы. Это высококонсервативный фермент, который определяется у ряда различных клинических штаммов ВИЧ-1 и инактивируется под действием ингибиторов интегразы (ралтегравир, элвитегравир и долутегравир) [13]. Изучение изменения уровня АТ к p31 на фоне АРТ может стать дополнительным критерием оценки эффективности применения ингибиторов интегразы.

Уровень АТ к Vif повышался только у лиц, инфицированных субтипом С, при проведении АРТ. У лиц с субтипами А1 и В количество АТ к Vif не изменялось на фоне АРТ, в сравнении с нелечеными пациентами, инфицированными этими же

субтипами. Vif — вирусный белок, инактивирующий фермент АРОВЕС3G путем образования с ним комплекса. Это приводит к деградации вирусной ДНК в клетках организма-хозяина. Блокада АРОВЕС3G под действием Vif наблюдается только у человека. Ведется поиск специфических ингибиторов, обеспечивающих инактивацию АРОВЕС3G с помощью Vif или его внутриклеточную деградацию. На основании вышеизложенного можно предположить, что АТ к Vif могут быть потенциальными маркерами эффективности ингибирования инактивации АРОВЕС3G [8].

Уровень АТ к Nef существенно снижался на фоне АРТ только в группе пациентов с субтипом А1. В группах с субтипами В и С он практически не изменялся. Nef является регуляторным белком, продукция которого осуществляется на ранних этапах цикла репликации вируса. Он индуцирует снижение синтеза молекул CD4 и антигенов HLA I класса на поверхности инфицированных клеток. Это способствует их ускользанию от действия цитотоксических Т-клеток. Nef характеризуется высокой иммуногенностью. Выраженный иммунный ответ на этот белок наблюдается уже на стадии острой ВИЧ-инфекции [7].

Различия между исследованными группами в продукции АТ к различным белкам ВИЧ могут быть обусловлены индивидуальными особенностями HLA-фенотипа, определяющего способность данного человека реагировать на конкретный антиген. Также выявленные различия могут быть связаны с высокой генетической изменчивостью и неоднородностью субтипов ВИЧ-1. Понимание направлений адаптации вируса к воздействию иммунного ответа организма, их влияния на иммуногенность и патогенез ВИЧ-1 является важным фактором для совершенствования диагностики, лечения пациентов и профилактики ВИЧ-инфекции/СПИДа [5].

Для прогнозирования течения ВИЧ-инфекции применяют два индикатора — уровень CD4+ лимфоцитов и вирусную нагрузку. Однако, доказано существование ряда других прогностических показателей развития ВИЧ-инфекции, отражающих или присутствие вирусного антигена, или выраженность иммунного ответа на него. Их называют суррогатными маркерами. К ним относят антиген р24, β2-микроглобулин сыворотки, неоптерин, α-интерферон, растворимый рецептор CD8 и др. [11]. Дальнейшее изучение спектра АТ к белкам ВИЧ-1, возможно, позволит найти новые суррогатные маркеры.

Полученные результаты позволяют заключить, что изучение изменений спектра АТ к белкам ВИЧ-1 у лиц, инфицированных различными субтипами вируса на фоне АРТ, является перспективным для разработки дополнительных динамических критериев оценки развития ВИЧ-инфекции.

Сбор и аттестация исследуемых образцов выполнены в рамках выполнения гранта Российского научного фонда (проект №15-15-00050-П).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобкова М.Р., Лаповок И.А. Лабораторные методы дифференциальной диагностики острой, ранней и текущей ВИЧ-инфекции. Кл. лаб. диагностика. 2007, 12:25-32.
2. Евстигнеев И.В. Лабораторные методы диагностики острой, ранней и текущей ВИЧ-инфекции. Кл. иммунология, аллергология, инфектология. 2012, 4:34-40.
3. Ahmad R., Sindhu S.T., Toma E. et al. Evidence for a correlation between antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating anti-HIV-1 antibodies and prognostic predictors of HIV infection. J. Clin. Immunol. 2001, 21:227-233.
4. Cohen O. J., Fauci A. S. Current strategies in the treatment of HIV infection. Adv. Intern. Med. 2001, 46:207-246.
5. Hemelaar J., Gouws E., Ghys P.D. et al. Global Trends in Molecular Epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. AIDS. 2011, 25(5):679-689.

6. Huang J., Wang F., Argyris E. et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat. Med.* 2007, 13:1241-1247.
7. Lichterfeld M. et al. Immunodominance of HIV-1-specific CD8+ T-cell responses in acute HIV-1 infection: at the crossroads of viral and host genetics. *Trends in Immunol.* 2005, 26:166-171.
8. Mariani R., Chen D., Schröfelbauer B. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by vif. *Cell.* 2003, 114:21-31.
9. Montefiori D.C., Pantaleo G., Fink L.M. et al. Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors. *J. Infect. Dis.* 1996, 173:60-67.
10. Niwa Y., Yano M., Futaki S. et al. T-cell membrane-associated serine protease, tryptase TL2, binds human immunodeficiency virus type 1 gp120 and cleaves the third-variable-domain loop of gp120. Neutralizing antibodies of human immunodeficiency virus type 1 inhibit cleavage of gp120. *Eur. J. Biochem.* 1996, 237:64-70.
11. Pedersen C., Katzenstein T., Nielsen C. et al. Prognostic value of serum HIV-RNA levels at virologic steady state after seroconversion: Relation to CD4 cell count and clinical course of primary infection. *J. Acquir. Immun. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1997, 16:93-99.
12. Wang S.K., Liang P.H., Astronomo R.D. et al. Targeting the carbohydrates on HIV-1: Interaction of oligomannose dendrons with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2008, 105:3690-3695.
13. Zack J.A., Arrigo S.J., Weitsman S.R. et al. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: Molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 1990, 61:213-222.

Поступила 18.12.18

Контактная информация: Лухверчик Людмила Николаевна, к.м.н.,
115088, Москва, 1 Дубровская ул., 15, р.т. (495)674-77-95

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*М.Н.Носик¹, К.А.Рыжов¹, А.В.Кравченко², С.Е.Севостьянихин³, У.А.Куимова², А.Б.Потапова⁴,
А.Л.Собкин³*

АНАЛИЗ УРОВНЯ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1 К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ НА ТЕРРИТОРИИ МОСКВЫ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²ЦНИИ эпидемиологии, Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИД, ³Туберкулезная клиническая больница №3, Москва, ⁴Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Цель. Проанализировать уровень лекарственной устойчивости ВИЧ среди первичных пациентов (не получавших АРВ-терапию), проживающих в Московском регионе, где доступ к антиретровирусной терапии достаточно высок. *Материалы и методы.* Были исследованы образцы крови от 527 больных за период 2008-2015 гг., не получавших АРВ-терапию и проживающих в Московском регионе: в Москве (n=279) и в Московской области (n=248). Для анализа возможных мутаций устойчивости были изучены нуклеотидные последовательности области генома вируса с использованием тест-систем ViroseqTMHIV-1 Genotyping System и программного обеспечения CPR (<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>). *Результаты.* Установлено, что уровень передачи резистентных штаммов ВИЧ-1 среди «наивных» ВИЧ-позитивных пациентов по-прежнему остается довольно низким и составляет 2%. Однако процент мутаций полиморфизма и второстепенных замен, которые в сочетании с другими мутациями устойчивости в гене обратной транскриптазы могут приводить к снижению чувствительности вируса к антиретровирусным препаратам (АРВ-препараты), довольно высок и составляет 34,5%. *Заключение.* Уровень первичной резистентности среди ВИЧ-инфицированных лиц, не получающих лечение, не превышает 5%. Однако, учитывая

широкий доступ к АРТ и появление в последние годы неоднозначных мутаций и делеций в области обратной транскриптазы/ гене протеазы, которые потенциально могут привести к устойчивости к АРВ-препаратам, необходим постоянный мониторинг за циркуляцией резистентных штаммов.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 27—31

Ключевые слова: ВИЧ, мутации, лекарственная устойчивость

M.N.Nosik¹, K.A.Ryzhov¹, A.V.Kravchenko², S.E.Sevostyanihin³, U.A.Kuimova², A.B.Potapova⁴, A.L.Sobkin³

ANALYSIS OF PREVALENCE OF HIV-1 PRIMARY RESISTANCE TO ANTIRETROVIRAL DRUGS IN THE TERRITORY OF MOSCOW AND MOSCOW REGION

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Central Research Institute of Epidemiology, ³Moscow Tuberculosis Clinic №3, ⁴Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. To analyze the level of HIV drug resistance among primary patients (who did not receive antiretroviral therapy (ART)) living in the Moscow region, where access to the antiretroviral therapy is quite high. *Material and methods.* Blood samples from 527 drug-naïve patients who live in the Moscow (n=279) and in the Moscow region (n=248) were examined for the period 2008-2015 years. For detecting and analyzing possible mutations of resistance virus genome nucleotide sequence region was studied using the test systems ViroseqTMHIV-1 Genotyping System and StanfordHIV Drug Resistance database (<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>). *Results.* It was found that the level of transmission of HIV-1 resistant strains among naïve-drug HIV-positive patients is still quite low, that is 2%. However, the percentage of polymorphism mutations and secondary substitutions which in combination with other resistance mutations in the reverse transcriptase gene can reduce the virus sensitivity to antiretroviral drugs (ARVs) is quite high — 34.5%. *Conclusion.* The level of primary resistance among drug-naïve HIV-infected persons does not exceed 5%. However, given the wide access to ART and the emergence in recent years of ambiguous mutations and deletions in the reverse transcriptase/ protease gene that could potentially lead to ARVs resistance, it is obvious that continuous monitoring of the circulation of resistant strains is necessary.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 27—31

Key words: HIV, mutations, drug-resistance

ВВЕДЕНИЕ

Лечение ВИЧ-инфекции является одной из актуальнейших проблем современной медицины. В настоящее время с помощью химиопрепаратов, направленных на ингибирование различных ферментов вируса, удается значительно улучшить состояние больных, подавляя на какой-то период репродукцию ВИЧ. К сожалению, это временный успех, так как сложная природа вируса иммунодефицита человека позволяет ему быстро адаптироваться к действию лекарств. Широкое использование антиретровирусной терапии (АРТ) при ВИЧ-инфекции приводит к формированию у ВИЧ-инфицированных устойчивости к лекарственным препаратам. При развитии резистентности к препаратам сразу нескольких групп возможности АРТ значительно сокращаются. В настоящее время всё больше появляется сообщений о передаче резистентных штаммов ВИЧ лицам, которые ранее не проходили АРТ, в результате чего проводимое лечение не дает положительных результатов. Более того, уже существующие мутации в геноме вируса, связанные с резистентностью к антиретровирусным препаратам (АРВ-препаратам) вследствие естественного полиморфизма квазивариантов вируса еще до начала терапии сводят на нет положительный эффект от АРВ-препаратов [14]. Так, уровень резистентности среди первичных пациентов до

начала АРТ составляет 10% в странах с низким и средним уровнем дохода. В странах Западной Европы и США уровень первичной резистентности составляет 12-23%, США (19-23%), Франции и Великобритании (14%), Нидерландах (13%), Испании (12%) [12,13]. В нашей стране до последнего времени уровень первичной резистентности оставался невысоким и не превышал 5% [3,7,9,10].

Как можно более раннее выявление вариантов ВИЧ, устойчивых к АРВ-препаратам, позволяет оптимально скорректировать терапию и тем самым предотвратить формирование множественных мутаций. Известно, что новые мутации увеличивают степень резистентности и формируют перекрестную резистенцию к другим препаратам этого же класса [11]. ВОЗ определяет четыре уровня распространенности первичной резистентности ВИЧ к АРВ-препаратам, каждый из которых предусматривает комплекс мер для ограничения последствий негативного влияния резистентности вируса на организм пациента [12]. В большинстве европейских странах проверка на резистентность к антиретровирусным препаратам (АРВ-препаратам) является неотъемлемой частью терапии. В России, в отличие от других стран мира, не рекомендуется проведение массовых скрининговых тестирований на первичную резистентность ВИЧ к АРВ-препаратам у «наивных пациентов» и/или планирующих начать лечение ВИЧ- позитивных лиц [2,8]. Целесообразным считается проведение кросс-секционных исследований в регионах страны с опытом применения АРТ более трех лет [8].

Учитывая, что с увеличением доступа к АРТ всё большее число недавно ВИЧ-инфицированных пациентов могут быть инфицированы резистентными штаммами вируса, целью работы было проанализировать уровень лекарственной устойчивости ВИЧ за семилетний период среди первичных пациентов (не получавших АРВ-терапию), проживающих в Московском регионе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были исследованы образцы крови от 527 ВИЧ-позитивных пациентов за период 2008-2015 гг., не получавших АРТ и проживающих в Московском регионе: в Москве (n=279) и в Московской области (n=248). Пациенты наблюдались в Федеральном Центре по профилактике и борьбе со СПИД и в ТБК №3. Для анализа возможных мутаций устойчивости были изучены нуклеотидные последовательности области генома вируса с использованием тест-систем Viroseq™HIV-1 Genotyping System и программного обеспечения CPR (<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проанализировано 114 образцов крови за период 2008-2010 гг., 198 образцов крови за период 2011-2012 гг. и 215 за период 2013-2015 гг. Хотя согласно российским рекомендациям по надзору за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к АРВ-препаратам, критериями включения пациента в исследование по изучению первичной резистентности является длительность инфицирования менее 1 года на момент исследования и количество CD4 > 500 клеток/мл [4], для получения более полной информации о циркуляции резистентных штаммов ВИЧ-1 среди первичных пациентов в обследуемую группу вошли также лица с числом клеток CD4 менее 500 клеток/мл (35%) и со сроками инфицирования более одного года на момент исследования (23%).

Среди исследованных образцов за период 2008-2010 гг. в 2 образцах было выявлено по одной значимой мутации устойчивости: мутация M184V (n=1), ассоциируемая с резистентностью к НИОТ (нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы), и мутация K101E (n=1), ассоциируемая со средней резистентностью к

препаратам класса ННИОТ (ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы), в частности к невирапину и рилпивирину. За период 2011- 2012 гг. значимые мутации были выявлены в 4 образцах: мутации Q151M (n=1) и M41L (n=2), ведущие к устойчивости к НИОТ, и мутация L100F (n=1), связанная с резистентностью к ННИОТ. За период 2013- 2015 гг. значимые мутации были выявлены также в 4 образцах: D30N (n=2) мутация высокого уровня резистентности к нелфинавиру (ИП), мутация V108I (n=1), ассоциируемая со средней резистентностью к невирапину (ННИОТ) и мутация V32I (n=1), ассоциируемая с резистентностью к препаратам класса ИП (ингибиторы протеазы), за исключением саквинавира. Таким образом, частота выявления мутаций устойчивости у первичных больных составила за период 2009-2010 гг. 1,8%; за период 2011-2012 гг. — 2%, за период 2013-2015 гг. — 2%. Процент мутаций полиморфизма и второстепенных замен, которые могут оказывать незначительное снижение чувствительности вируса в сочетании с другими мутациями устойчивости для всех групп был фактически одинаковым: в гене обратной транскриптазы — A62V (44,1±0,6%), V90I (10,5±0,2%), E138A (1,1±0,1%); в гене протеазы — L10I (16,4%±0,2), V77I (31,7±0,4%), M36A (69,9±0,5%), L63P (9,8±0,4%). Среди образцов, собранных за период 2013- 2015 гг., у 8 образцов были выявлены довольно необычные мутации в области обратной транскриптазы: V276L, L279IKMN, K275X, K281APX, G285AE, T286DINV, K287KRW, A288FIL, L289LFV, T7TFIS, P9IT, K13KE, I274IFL, V276AP, L279DEKN, Q278X и в области протеазы: D25DAE, T26TA, G27GA, D30DE, T31TA, E35Deletion, R87R, E65EIKV.

Таким образом, в ходе проведенных исследований нами было установлено, что уровень передачи резистентных штаммов ВИЧ-1 среди ВИЧ-инфицированных лиц, не получающих лечение, по-прежнему остается довольно низким и составляет 2%. Однако процент мутаций полиморфизма и второстепенных замен, которые в сочетании с другими мутациями устойчивости в гене обратной транскриптазы могут приводить к снижению чувствительности вируса к антиретровирусным препаратам (АРВ), довольно высок и составляет 34,5%.

Полученные результаты в целом согласуются с данными других исследователей и свидетельствуют о том, что уровень первичной резистентности среди ВИЧ-инфицированных лиц, не получающих лечение, не превышает 5% [1,4—6]. Однако, учитывая широкий доступ к АРТ и появление в последние годы неоднозначных мутаций и делеций в области обратной транскриптазы/ гене протеазы, которые потенциально могут привести к устойчивости к АРВ-препаратам, необходим постоянный мониторинг за циркуляцией резистентных штаммов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцева Н.Н., Парфенова О.В., Ефимов Е.И.. Анализ распространенности резистентных штаммов ВИЧ к антиретровирусным препаратам в Приволжском федеральном округе. *Вопр. вирус.* 2013, 6: 39-41.
2. Зайцева Н.Н., Парфенова О.В., Пекшева О.Ю. Анализ распространенности первичной резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам в Приволжском федеральном округе. *Медицинский альманах.* 2016, 3(43):93-95.
3. Казеннова Е.В., Антонова О.В., Кузин С.Н., Серкина Т.П., Соколова Л.С., Васильев А.В., Лаповок И.А., Бобкова М.Р. Молекулярно-эпидемиологическое исследование распространения ВИЧ-1 на территории Республики Саха (Якутия). *Вопр. вирусол.*, 2011, 5:30-34.
4. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Лебедев А.В., Глушенко Н.В., Зверев С.Я., Нистратова Ю.И., Зайцева Н.Н., Парфенова О.В., Герасимов В.В., Шошокин В.А., Бобкова М.Р. Анализ резистентности ВИЧ в Приволжском федеральном округе Российской Федерации. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия.* 2015, 7(3):56-66.

5. Лебедев А.В., Нешумаев Д.А., Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глушенко Н.В., Плотникова Ю.К., Пономарева О.А., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р. Сравнительный анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в Иркутской области в 1999 и 2012 гг. *Вопр. вирусол.* 2016, 61(3):112-119.
6. Лебедев А.В., Казеннова Е.В., Зверев С.Я., Нистратова Ю.И., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глушенко Н.В., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р. Анализ изменчивости гена *env* варианта IDU-A ВИЧ-1 в ходе развития эпидемии ВИЧ-инфекции на территории Пермского края России (1996-2011 гг.). *Вопр. вирусол.* 2016, 61(5):222-229.
7. Мусатов В.Б., Яковлев А.А., Тыргина Т.В., Ладная Н.Н. Прогностическое значение результатов генотипирования вирусов иммунодефицита человека, выделенных от больных первичной ВИЧ-инфекцией в 2009 и 2011 годах в Санкт-Петербурге. *Вестник Санкт-Петербургского университета.* 2013, 1:171-178.
8. Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам. Методические рекомендации. МР 3.1.5.0075/1-13. Роспотребнадзор, 2013.
9. Петрова Л.В., Дементьева Н.Е., Яковлев А.А. Проблема резистентности к антиретровирусным препаратам в терапии ВИЧ-инфекции и результаты ее определения у ВИЧ-инфицированных больных по материалам ГИБ № 30 им. С.П. Боткина. *Вестник Санкт-Петербургского университета.* 2008, 11(2):59-67.
10. Суханова А.Л., Рудинский Н.И., Богословская Е.В., Круглова А.И., Башкирова Л.Ю., Цыганова Г.М., Шипулин Г.А., Казеннова Е.В., Аликикна Ю.И., Зверев С.Я., Гришечкин А.Е., Михайлович В.М., Покровский В.В., Бобкова М.Р., Бобков А.Ф. Полиморфизм протеазы и обратной транскриптазы у вариантов ВИЧ 1 подтипа А, доминирующих на территории СНГ. *Молекулярная биология.* 2005, 6:934-941.
11. Alteri C., Svicher V., Gori C. et al. Characterization of the patterns of drug-resistance mutations in newly diagnosed HIV-1 infected patients naive to the antiretroviral drugs. *BMC Infect. Dis.* 2009, 9:1471-2334.
12. WHO. HIV drug resistant report 2017.
13. Hrazic M., Pellegrin I., Deveaue C. et al. Genotypic drug resistance during HIV-1-primary infection in France (1996-1999): frequency and response to treatment. *AIDS.* 2002, 16:793-796.
14. Lapadula G., Izzo I., Gargiulo F. et al. Updated prevalence of genotypic resistance among HIV-1 positive patients naive to antiretroviral therapy: a single center analysis. *J. Med. Virol.* 2008, 80:747-53.

Поступила 18.12.18

Контактная информация: Носик Марина Николаевна, к.б.н.,
115088, Москва, 1 Дубровская ул.,15, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

А.В.Зубков¹, Н.С.Кузьмина¹, С.А.Мазурина¹, Л.Г.Бутова¹, Н.М.Рахматулина², Н.А.Сибгатулина², В.Б.Гервазиева¹

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ sIGE К ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЕ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С АУТОИММУННЫМИ И АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; ²Казанская государственная медицинская академия

Цель. Создание метода определения sIgE к тиреопероксидазе (ТПО) в сыворотке крови пациентов с аутоиммунными и аллергическими заболеваниями. *Материалы и методы.* Материалом для исследования служили сыворотки крови 25 больных АИТ, 94 пациентов с ХСК, 47 больных БА, аллергическим ринитом (АР) и 25 образцов сывороток крови здоровых лиц. Возраст пациентов варьировал от 17 до 65 лет. В разработанном методе определения sIgE к ТПО в твёрдофазном

ИФА в качестве антигена использовали нативную аффинно-очищенную ТПО (чистота >95 %, ферментативная активность 60 ± 15 ед.акт./мг), которая содержала все иммунодоминантные участки, определенные с использованием панели моноклональных антител в ИФА. Выявление в сыворотке крови sIgE, связавшихся с антигеном, осуществляли с помощью моноклональных антител к IgE (8E/4F4), конъюгированных с пероксидазой хрена. *Результаты.* В сыворотках крови пациентов с бронхиальной астмой (БА), аллергическим ринитом (АР) и хронической спонтанной крапивницей (ХСК) выявляются sIgE к ТПО в 18 — 21% случаев. В сыворотке крови пациентов с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) и у здоровых лиц sIgE к ТПО не были обнаружены. *Заключение.* Определение sIgE к ТПО у больных ХСК и аллергическими заболеваниями позволит выявить ранние нарушения аутоиммунного ответа к антигенам щитовидной железы и обеспечить своевременную диагностику патологии последней.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 31—36

Ключевые слова: sIgE к ТПО, аллергия, аутоиммунитет, крапивница

A.V.Zubkov¹, N.S.Kuzmina¹, S.A.Mazurina¹, L.G.Butova¹, N.M.Rahmatulina², N.A.Sibgatulina², V.B.Gervazieva¹

THE METHOD TO DETECT SIGE TO THYROID PEROXIDASE IN CASES OF THE PATIENTS WITH AUTOIMMUNE AND ALLERGIC DISEASES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Kazan State Medical Academy, Russia

Aim of this research has been to create a method to detect sIgE to thyroid peroxidase (TPO) in serum of the patients with autoimmune and allergic diseases. *Materials and methods.* In this research native affine-purified TPO (more the 95% clean, enzyme activity 60 ± 15 of enzyme unit per mg) with immune dominant elements only (confirmed by inhibitory ELISA) has been used. The detection of sIgE in serum, combined with TPO, was carried out with monoclonal antibodies to IgE (8E/4F4) conjugated with horseradish peroxidase. *Results.* In serum of patients with bronchial asthma, allergic rhinitis and chronic spontaneous urticarial sIgE to TPO has been detected in 18—21% of cases. The healthy people and the patients with autoimmune thyroiditis had no sign of sIgE to TPO in their serum. *Conclusion.* The detection of sIgE to TPO in cases of patients with chronic spontaneous urticarial and allergic diseases will make possible to perform the early diagnosis of thyroid autoimmune disorders and provide timely and adequate therapy.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 31—36

Key words: sIgE to TPO, allergic diseases, autoimmunity, chronic spontaneous urticarial

ВВЕДЕНИЕ

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы нередко сочетаются с бронхиальной астмой (БА) и хронической спонтанной крапивницей (ХСК) [6, 7]. При этом наиболее частым в этой ассоциации является болезнь Хашимото или аутоиммунный тиреоидит (АИТ). Болезнь поражает преимущественно женщин в возрасте 30—50 лет и мужчин 40—65 лет. Но существуют также риски возникновения подобных эндокринных нарушений у молодых девушек (после беременности), у подростков и детей. Диагностируют заболевание у 3—5% людей в периоды гормональных сбоев и дисфункций щитовидной железы.

Диагностика аутоиммунных заболеваний щитовидной железы выполняется с использованием клинических лабораторных и инструментальных методов анализа и содержит такие показатели, как изменение уровня гормонов, повышение концентрации антител к аутоантигенам щитовидной железы — тиреоглобулину (ТГ), тиреопероксидазе (ТПО) и рецептору тиреотропного гормона (рТТГ), а также оценивают

гипоэхогенность железы методом УЗИ и клинические симптоматические признаки. В 85% случаев АИТ протекает бессимптомно в течение нескольких лет. Выявление аутоантител свидетельствует о наличии аутоиммунного процесса. При этом следует отметить, что развитие аутоиммунных реакций в щитовидной железе, прежде всего, связано с определением IgG-аутоантител, тогда как роль IgE-аутореактивности при этих заболеваниях до конца не изучена. В то же время, IgE-аутоантитела к соответствующим аутоантигенам как показатель сниженной функции регуляторного звена иммунитета определяются при многих аутоиммунных заболеваниях (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, рассеянный склероз) [12], а также при тяжелых формах бронхиальной астмы [3] и атопическом дерматите[5].

В связи с этим целью работы явилось создание метода определения sIgE к ТПО в сыворотке крови и его апробация у пациентов с аутоиммунными и аллергическими заболеваниями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

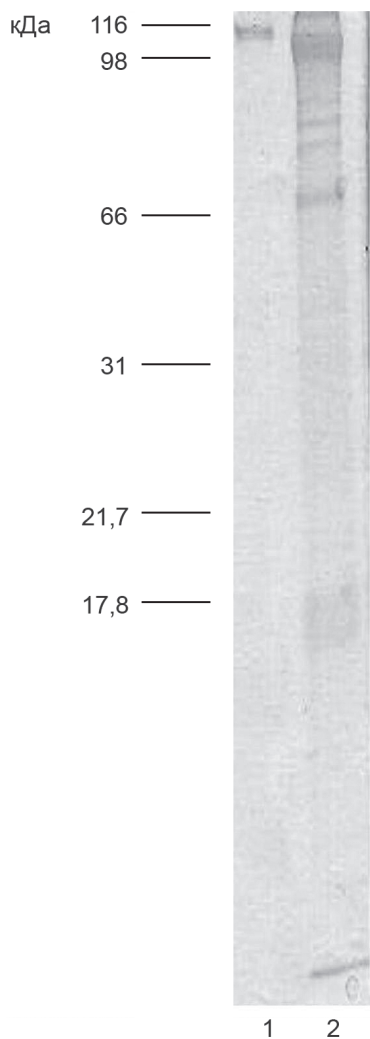
Материалом для исследования служили сыворотки крови 25 больных АИТ, 94 пациентов с ХСК, 47 больных БА, аллергическим ринитом (АР) и 25 образцов сывороток крови здоровых лиц. Возраст пациентов варьировал от 17 до 65 лет.

Антиген ТПО из ткани щитовидной железы получали из предварительно осажденной микросомальной фракции тиреоцитов путем солиubilизации с последующей очисткой методом аффинной хроматографии на колонке с CN-Br сефарозой 4В, конъюгированной с МкАТ к ТПО [2, 4]. На всех этапах выделения ТПО чистоту белка контролировали методами ИФА, электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга. По результатам проверки, чистота препарата составляла более 95%. Эпитопную специфичность выделенного антигена ТПО изучали методом конкурентного ИФА с использованием панели моноклональных антител [1, 2]. sIgE к ТПО в сыворотках крови определяли с помощью непрямого твердофазного ИФА. Для этого в лунки полистиролового планшета высокой сорбции производства «Nunc» (ThermoFisherScientific, США) вносили полученный нативный антиген ТПО в оптимальной концентрации 7,5 мкг/мл в 0,01 М карбонатном буферном растворе, pH 9,6. Выдерживали планшет в течение 18 часов при 4 °С. Затем после 3-кратной отмывки 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором с 0,05 % твин-20 pH 7,2 (ФСБ-Т) в лунки планшета вносили исследуемые образцы сыворотки крови человека в разведении 1:10 в ФСБ и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С, далее отмывали 3 раза ФСБ-Т. Выявление в сыворотке крови sIgE, связавшихся с ТПО, осуществляли с помощью моноклональных антител к IgE (8E/4F4), конъюгированных с пероксидазой хрена (ООО «Полигност», Санкт-Петербург). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С, после отмывали 3 раза в ФСБ-Т. Ферментативную реакцию регистрировали по изменению окраски субстратно-хромогенной смеси (ТМБ) в течение 20 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность раствора в лунках планшета измеряли на фотометре вертикального сканирования Anthos 2020 при длине волны 450 нм. Результаты считали положительными при значениях ОП, превышающих удвоенное значение ОП порогового уровня в лунках отрицательного контроля. В качестве отрицательного контроля использовали пул сывороток здоровых доноров.

Во всех исследованных образцах сыворотки больных и здоровых лиц исследовали уровень гормонов щитовидной железы (ТТГ, Т₄ свободный, Т₃) методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов реагентов производства фирмы «Алкор Био» (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов был получен высокоочищенный препарат ТПО (рис.), чистота >95 %, с ферментативной активностью 60 ± 15 ед. акт./мг. По данным электрофореза и иммуноблоттинга визуализировался белок с м.м. 110 кДа. Полученный образец нативной пероксидазы щитовидной железы содержал пять иммунодоминантных участков, определенных при исследовании эпитопной структуры антигена [1]. Кроме того, ТПО содержала сложный конформационный эпитоп, образованный двумя линейными участками 606-617 а.о. и 706-720 а.о., к которому выявляются аутоантитела (IgG) у 82% больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы.



Электрофореграмма препаратов ТПО на стадии аффинной очистки в 10 % ПААГ (концентрация белка равнялась 10 мкг/трек): дорожка 1 — препарат ТПО, очищенный методом аффинной хроматографии; дорожка 2 — супернатант солибилизированной МФТ.

На следующем этапе разработан иммуноферментный метод определения sIgE к ТПО в сыворотке крови человека, в основе которого — аффинно-очищенный белок ТПО и конъюгат моноклональных антител к IgE. Апробацию метода проводили с образцами 25 сывороток крови здоровых лиц, 25 больных АИТ, 94 пациентов с ХСК и 47 больных аллергическими заболеваниями. Все пациенты с установленным диагнозом АИТ (длительность заболевания более 10 лет) и повышенным уровнем IgG-аутоантител к ТПО находились на гормонозаместительной терапии, при этом уровень гормонов (ТТГ, T_3 , T_4 свободный) находился в пределах нормы. Аллергические заболевания были представлены аллергическим ринитом (АР) интермиттирующего и персистирующего течения ($n=6$) и БА среднетяжелого и тяжелого персистирующего течения с длительностью заболевания более 10 лет ($n=41$). Длительность заболевания ХСК составила от 1 года до 25 лет. У 34 (36%) больных ХСК с помощью кожного тестирования с аутосывороткой была подтверждена аутоиммунная форма заболевания (ХАК); у 60 — крапивница была идиопатической (ХИК).

Определение sIgE к ТПО показало, что в сыворотке крови пациентов с ХСК аутоантитела выявляются у 17 (18%) из 94 человек. При этом sIgE к ТПО в сыворотке крови определялись как при аутоиммунной, так и при идиопатической форме заболевания и не были связаны с гендерным распределением и возрастом пациентов. Следует отметить, что sIgE-аутоантитела обнаруживали у больных ХСК с длительностью заболевания менее 4 лет. У больных аллергическими заболеваниями sIgE к ТПО выявлены у 1 из 6 пациентов с АР и у 9 из 41-с БА. Обращает на себя внимание отсутствие sIgE к ТПО в сыворотках больных АИТ, тогда как IgG-аутоантитела определяли в диапазоне от 70 до 500 МЕ/мл при норме до 50 МЕ/мл. В сыворотке крови здоровых лиц sIgE к ТПО не были обнаружены.

В последнее время все большее внимание привлекают исследования, посвященные изучению аутореактивности у больных с аллергическими и аутоиммунными заболеваниями. Снижение в ряде случаев регуляторных механизмов иммунитета может привести к нарушению толерантности к собственным аутоантигенам, циркулирующим в крови. Одним из таких аутоантигенов является ТПО.

В нашей работе был разработан метод твердофазного ИФА определения аутоантител sIgE класса к ТПО в сыворотке крови больных с разными хроническими воспалительными заболеваниями. Был получен высокоочищенный препарат нативной ТПО, по своим характеристикам: чистоте, иммунологическим свойствам и ферментативной активности, не уступающий зарубежным аналогам.

Проведенное нами ограниченное авторское испытание метода определения sIgE к ТПО с 25 образцами сыворотки крови больных АИТ, 94 образцами сыворотки больных ХСК, 47 образцами сывороток больных аллергией и 25 образцами сывороток здоровых лиц, позволило выявить в ряде из них наличие sIgE аутоантител. Появление sIgE к ТПО, также как и к другим тканевым аутоантигенам в сыворотке крови больных БА, отражает проявление аутореактивности у пациентов с более тяжелым и длительным течением заболевания [3]. В то же время, у больных ХСК эти антитела выявлялись у лиц с длительностью заболевания менее 4 лет. При АИТ не выявлялись sIgE к ТПО, что, может быть, связано как с наличием выраженного дозозависимого IgG иммунного ответа к ТПО при интерференции с IgE антителами, с одной стороны, так и с возможным снижением sIgE в циркуляции, связанным с высокой цитофильностью sIgE, с другой стороны. В этом наши результаты согласуются с данными зарубежных исследований. Так, Concha L.V. et al. показали, что в сыворотке крови 32 больных, содержащей IgG к антигенам щитовидной железы, только у 2 из 20 пациентов с ХСК были обнаружены IgE аутоантитела: у 1 пациента антитела выявлялись к ТПО и у одного — к ТГ. В то же время, у 12 лиц без крапивницы таковые не обнаружены [8]. Исследованию sIgE к антигенам щитовидной железы (ТПО, ТГ) у больных ХСК посвящены еще несколько работ. В двух из них авторам удалось выявить повышенный, более чем в 2 раза, уровень sIgE к ТПО в образцах сыворотки крови пациентов с ХСК в сравнении с образцами сывороток крови здоровых лиц [7,14]. В двух исследованиях результаты детекции sIgE к ТПО были отрицательными [11, 15].

Как известно, аутоиммунное воспаление щитовидной железы начинается постепенно и протекает бессимптомно длительное время. При этом в сыворотке крови под влиянием различных стрессорных факторов, в том числе вирусных инфекций, появляются аутоантигены, стимулирующие иммунную систему. На минимальные дозы аутоантигенов иммунная система реагирует прежде всего IgE-аутореактивностью. По мере увеличения антигенной нагрузки (при более выраженном воспалительном повреждении ткани) иммунный ответ переключается на IgG. Данные о том, что IgE-аутоантитела, включая sIgE к ТПО, могут индуцировать симптомы ХСК, подтверждаются активацией тучных клеток и базофилов [10, 13, 14], а также эффективностью терапии омализумабом у пациентов с ХСК [9].

Таким образом, ранняя диагностика аутоиммунных процессов в щитовидной железе с использованием метода определения sIgE к ТПО, наряду с IgG-аутоантителами, у больных с иммуно-опосредованными заболеваниями, в том числе при ХСК, позволит своевременно диагностировать патологию щитовидной железы и обеспечить адекватную своевременную терапию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубков А.В., Свиридов В.В., Кириллова Г.А. и др. Изучение эпитопной специфичности аутоантител к тиреоидной пероксидазе при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы. Клиническая и экспериментальная тиреодология. 2011, 7(2):43-48.
2. Зубков А.В., Яковлева И.В., Свиридов В.В. и др. Моноклональные антитела в исследовании структуры тиреопероксидазы — ведущего аутоантигена щитовидной железы. Физиология и патология иммунной системы. 2005, 9(8):25-30.
3. Конищева А.Ю., Штерншис Ю.А., Гервазиева В.Б. IgE-аутоантитела у больных атопической бронхиальной астмой. Медицинская иммунология. 2007, 9(2-3):181-182.
4. Кузьмина Н.С., Яковлева И.В., Свиридов В.В. и др. Моноклональные антитела к человеческой пероксидазе щитовидной железы. Биотехнология. 2005, 1:51-57.
5. Самойликов П.В., Гервазиева В.Б., Кожевников С.А. IgE- и IgG-аутореактивность у детей с атопическим дерматитом. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2012, 57(1) 6:97-103.
6. Abdel-Aziz M.F., Rafaat M.M., Sabry I.M. et al. Study of thyroid autoantibodies in patients with bronchial asthma and allergic rhinitis. Thyroid Science. 2010, 5(2):CLS1-5.
7. Altrichter S., Peter H.J., Pisarevskaja D. et al. IgE mediated autoallergy against thyroid peroxidase — A novel pathomechanism of chronic spontaneous urticaria? PLoS One. 2011; 6 (4): e14794.
8. Concha L.B., Chang C.C., Szema A.M. et al. IgE-antithyroid antibodies in patients with Hashimoto's disease and chronic urticaria. Allergy Asthma Proc. 2004, 25(5):293-296.
9. Chang T.W., Chen C., Lin C.J. et al. The potential pharmacologic mechanisms of omalizumab in patients with chronic spontaneous urticaria. J. Allergy Clin. Immunol. 2015, 135(2):337-42. doi: 10.1016/j.jaci.2014.04.036.
10. Chen Q., Zhai Z., Xu J. et al. Basophil CD63 expression in chronic spontaneous urticaria: correlation with allergic sensitization, serum autoreactivity and basophil reactivity. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2017, 31(3):463-468. doi: 10.1111/jdv.13912.
11. Hatada Y., Kashiwakura J., Hayama K. et al. Significantly high levels of anti-dsDNA immunoglobulin E in sera and the ability of dsDNA to induce the degranulation of basophils from chronic urticaria patients. Int. Arch. Allergy Immunol. 2013, 161(2):154-158. doi: 10.1159/000350388.
12. Maurer M., Altrichter S., Schmetzer O. et al. Immunoglobulin E-Mediated Autoimmunity. Front Immunol. 2018 Apr 9;9:689. doi: 10.3389/fimmu.2018.00689.
13. Panaszek B., Pawłowicz R., Grzegorzółka J. et al. Autoreactive IgE in Chronic Spontaneous/Idiopathic Urticaria and Basophil/Mastocyte Priming Phenomenon, as a Feature of Autoimmune Nature of the Syndrome. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 2017, 65(2):137-143. doi: 10.1007/s00005-016-0417-7.
14. Shin Y.S., Suh D.H., Yang M.E. et al. Serum Specific IgE to Thyroid Peroxidase Activates Basophils in Aspirin Intolerant Urticaria. J. Korean Med. Sci. 2015, 30:705-709.
15. Tedeschi A., Lorini M., Asero R. Anti-thyroid peroxidase IgE in patients with chronic urticaria. J. Allergy Clin. Immunol. 2001, 108 (3):467-468.

Поступила 18.12.18

Контактная информация: Зубков Александр Владимирович, к.м.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495) 917-52-42

СОСТОЯНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОЙ ИММУНИЗАЦИИ ПАРОТИТНОЙ ВАКЦИНОЙ «ЛЕНИНГРАД-3» С РАЗНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ АНТИГЕНА

¹НПО «Микроген», Москва; ²ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская обл.; ³ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова, Москва

Цель. В течение трех лет изучали уровень и спектр нейтрализующей активности специфических антител у 60 добровольцев, привитых двумя сериями российской паротитной вакцины с разным содержанием антигена штамма вируса паротита (ВП) «Ленинград-3» (Л-3). *Материалы и методы.* В исследовании обе группы добровольцев имели сходные демографические и анамнестические характеристики. Ни у кого из 60 привитых добровольцев не было выявлено значимых поствакцинальных реакций. Уровень специфических антител (АТ) измеряли в ИФА и реакции нейтрализации (РН) со штаммом ВП Л-3 и с 5 гетерологичными штаммами ВП генотипов А, В, С, D, H. *Результаты.* Максимум «функциональной» активности специфических АТ в сыворотке добровольцев обеих групп в соответствии с полученными показателями индекса avidности (ИА) и уровнем нейтрализующих титров (НТ) в РН с 6 штаммами ВП наблюдался на 12-18 месяцы после вакцинации. При этом сам уровень специфических АТ в ИФА снижался, начиная с 12 месяца. В целом, отмечено падение всех показателей иммунитета в сыворотке добровольцев обеих групп к 3 году после вакцинации относительно соответствующих максимальных значений. В представленном исследовании серии паротитной вакцины, несмотря на значительную разницу в специфической активности штамма ВП «Л-3» в одной прививочной дозе (2,76 раза, U-test $p > 0,005$), обеспечивали формирование специфического иммунитета (по 8 показателям) на одинаковом уровне, а также одинаковую динамику у 60 однократно привитых добровольцев. *Заключение.* Исходя из полученных результатов представляется целесообразным контролировать или ограничивать верхний предел специфической активности ВП в прививочной дозе вакцины. Такое ограничение, на наш взгляд, позволит снизить количество неблагоприятных событий после иммунизации, в том числе трансмиссию вакцинного штамма ВП, а также сделать производство вакцины более экономичным.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 37—45

Ключевые слова: специфическая активность вируса паротита в прививочной дозе, нейтрализующая активность антител и avidность в динамике

Е.В.Отрашевская¹, М.В.Кулак², Е.К.Букин², Г.М.Игнатев³

SPECIFIC HUMORAL IMMUNITY AFTER IMMUNIZATION WITH VACCINE CONTAINED LENINGRAD-3 (L-3) MUMPS VIRUS STRAIN OF DIFFERENT POTENCY

¹Scientific and Production Association for Immunobiological Preparations «Microgen», Moscow. ²State Scientific Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region; ³Chumakov Federal Scientific Centre for Research and Development of Immune and Biological Products, Moscow, Russia

Aim. The persistence of the specific antibodies and the kinetics of the antibody neutralizing activity level and spectrum were studied in two groups of healthy young adults after the immunization with two different vaccine lots characterized with the different vaccine potency were studied for 3 years. *Materials and methods.* Antibodies were measured by enzyme immunoassay (EIA) and by plaque reduction neutralization (PRN) assay using the L-3 vaccine mumps virus (MuV) and five more heterologous MuV strains of genotypes A, B, C, D and H as the targets in 3-year follow-up serum samples ($n=60$) of once-vaccinated volunteers.

Results. Maximal of the specific antibodies functional activity according to the avidity index as well as to the neutralizing activity level against 6 used in the investigation MuV strains was registered on month 12th till 18th after vaccination in both groups of volunteers. Interestingly the specific IgG levels registered by EIA were going already down from month 12th. It was a waning immunity tendency, in general, over time in both groups of volunteers. In the current investigation two vaccines lots contained significantly different MuV titer in one dose (2, 76-fold difference, U-test $p > 0,005$) induced the specific humoral immunity with no statistical differences in the measured parameters in 60 once vaccinated volunteers. *Conclusion.* The current study results make it possible to suggest controlling or limiting the maximum permissible level of vaccine potency, as no more. Such limitation could reduce the risk of the post vaccination reaction and of vaccine virus horizontal transmission. At the same time the optimal vaccine potency bound will make vaccine production more economical.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 37—45

Key words: mumps vaccine potency, specific antibodies neutralizing activity and avidity kinetics

ВВЕДЕНИЕ

Вспышки паротитно-вирусной инфекции (ПВИ) в популяции с уровнем охвата специфической иммунизацией — хорошо известный феномен [4, 5, 10, 14]. Дискутируется вопрос о снижении показателей поствакцинального иммунитета с течением времени, особенно в условиях уменьшения циркуляции «диких» штаммов вирусов паротита (ВП) и соответственно снижения их бустерного влияния [8-10, 13, 15]. Многолетние наблюдения за эффективностью иммунизации паротитной вакциной в разных странах свидетельствует о необходимости мониторинга функционального состояния специфического иммунитета [5, 6], т.к. лишь некоторая часть поствакцинальных антител (АТ) иммунологически функциональна [3, 5, 6, 10]. Наиболее точно отражает функциональную активность противопаротитных АТ реакция нейтрализации [5, 6, 10]. Некоторые исследователи сходятся во мнении, что несмотря на серологическую монотипичность ВП, при анализе протективности паротитной вакцины необходимо оценивать спектр нейтрализующей активности специфических АТ, предпочтительно к «диким» штаммам ВП, циркулирующим на данной территории [4, 5, 11].

Все производители живых вакцин, в состав которых входит паротитный компонент, гарантируют минимальное (не менее) содержание ВП в прививочной дозе, которое обеспечивает сероконверсию у реципиентов [Rubin S.A. et al., 2013]. В открытых источниках отсутствуют результаты сравнительных исследований показателей специфического иммунитета после иммунизации паротитной вакциной с разным содержанием ВП в прививочной дозе.

В настоящем исследовании проведено сравнительное изучение показателей специфического иммунитета у здоровых добровольцев в течение трех лет после иммунизации сериями паротитной вакцины с разным уровнем специфической активности вакцинного штамма ВП в прививочной дозе. В динамике оценивали общий уровень, зрелость (авидность) и функциональную активность специфических АТ, т.е. спектр и уровень нейтрализующей активности к разным штаммам ВП

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было организовано как рандомизированное и слепое. Для участия в исследованиях приглашали здоровых (без хронических заболеваний) мужчин в возрасте 18-25 лет без вакцинации против эпидемического паротита и без паротит-

но-вирусной инфекции в анамнезе. Все добровольцы дали письменное согласие на участие в исследованиях. Все исследования были согласованы с этическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор». До начала исследований сыворотки добровольцев были проверены на отсутствие специфических антител (IgM и IgG) к ВП с использованием наборов ИФА (Enzygnost, Siemens Healthcare Diagnostics) и в реакции нейтрализации (РН) с ВП шести разных генотипов, включая вакцинный штамм «Л-3».

В итоге, для дальнейших исследований были отобраны 60 человек с отсутствием специфического гуморального иммунитета к ВП. Добровольцы рандомизировано были разделены на две равные группы и привиты двумя разными сериями паротитной вакцины производства НПО «Микроген». Одна группа добровольцев была привита серией паротитной вакцины «Х» со специфической активностью ВП 4,82 lg ТЦД₅₀ в одной прививочной дозе (по данным производителя). Вторая группа добровольцев была привита серией вакцины «У» со специфической активностью ВП 5,23 lg ТЦД₅₀ в одной прививочной дозе (по данным производителя).

В течение 21 суток после вакцинации проводили ежедневный медицинский осмотр добровольцев. В течение последующих 3 лет в динамике на 1, 3, 6, 9, 12, 24 и 36 месяцы у добровольцев брали образцы сыворотки крови. Собранные образцы сывороток хранили при температуре — 80 °С до одномоментного проведения исследований. При исследовании образцов оценивали титр специфических АТ, их функциональную активность (уровень и спектр нейтрализующей активности), а также зрелость (авидность).

Определение специфических АТ в сыворотке проводили с использованием наборов ИФА (Enzygnost, Siemens Healthcare Diagnostics). Использовали установленную производителем систему оценки результата: отрицательный $\leq 1:100$, положительный $\geq 1:200$, пороговый (равнозначный) $< 1:200$ и $> 1:100$. Оценку авидности специфических АТ проводили по ранее описанной методике [14]. Индекс авидности (ИА) определяли как процентное соотношение показателя абсорбции до и после обработки 6М мочевиной. Использовали установленную систему оценки ИА для паротитных АТ: ИА $\leq 31\%$ — низкий, ИА $\geq 32\%$ — высокий [Narita M. et al., 1998].

Реакцию нейтрализации (РН) проводили с вакцинными штаммами ВП: «Ленинград-3» («Л-3»), «Enders» (генотип А) и «Утабе» (генотип В), предоставленными Т.Н. Юнасовой (ФГБУ НЦЭСМП МЗ РФ), а также с «дикими» штаммами ВП: «Dragoon» (генотип «С», номер GenBank AY681495), «Petronov» (генотип «Н», номер GenBank AY669145) и «London-1» (генотип D), предоставленным доктором S. Rubin (FDA, США) по ранее описанной методике [4-6]. Отрицательный контроль (неиммунную сыворотку) использовали при проведении каждой РН. Титр 1:4 ($2^{-\log_2}$) был принят как пороговый в РН [Rubin S.A. et al., 2008].

Полученные в результате проведенных исследований нейтрализующие титры (НТ) были трансформированы в $-\log_2$ для статистической обработки. Средние значения титров АТ в группах выражали как среднее геометрическое (GM) \pm стандартное отклонение (SD), а средние значения ИА в группах выражали как среднее арифметическое (M) \pm SD. Статистический анализ проводили с вычислением Student's t-test (two-tail, paired) при сравнении исследуемых показателей в динамике в одной группе и с вычислением Mann-Whitney U-test при сравнении аналогичных показателей между группами. Для проверки взаимосвязи между показателями рассчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмена (r). Статистическую достоверность определяли как $p \leq 0.05$. Было проведено прогнозирование уровня специфических АТ по окончании периода наблюдения с помощью линейных трендов через функцию «предсказание» (Microsoft Excel 2010).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ни у одного привитого добровольца не было отмечено каких-либо поствакцинальных реакций. В течение 3 лет после проведенной вакцинации ни у одного участника не была зарегистрирована паротитно-вирусная инфекция.

Результаты измерения специфических АТ и их avidности представлены на рис. 1 и 2. Через 1 месяц после вакцинации сероконверсия в ИФА была выявлена у семерых привитых в группе «Y» и четверых в группе «X», а с 3 месяца все участники были серопозитивными. Далее динамика титра специфических АТ в ИФА была схожа вне зависимости от титра ВП в прививочной дозе (рис.1). При сравнении титров специфических АТ между двумя группами привитых добровольцев статистическая разница не была выявлена на всем периоде наблюдения, U-test $p > 0,05$. Максимальный уровень специфических АТ наблюдался на 9 месяце после вакцинации. Затем на 36 месяце после вакцинации в крови добровольцев обеих групп отмечалось достоверное падение титра специфических АТ (t-test $p < 0,004$), хотя сами титры при этом оставались положительными ($\geq 1:100$).

Максимальные средние значения ИА в обеих группах добровольцев наблюдались на 18 месяце и составляли в обеих группах (M) $>32\%$, что свидетельствует о формировании зрелого специфического иммунитета. Достоверной разницы между группами по ИА не было выявлено, U-test $p > 0,05$. Следует отметить, что после достижения максимальных значений ИА в обеих группах достоверного падения показателя не наблюдалось до конца наблюдения, t-test $p > 0,05$. Ни в одной из групп не было выявлено корреляции между титром АТ и уровнем ИА.

Через 3 месяца после иммунизации у всех участников отмечена сероконверсия в РН с вакцинным штаммом ВП «Л-3». Динамика НТ к штамму ВП «Л-3» была схожа в обеих группах добровольцев вне зависимости от титра ВП в прививочной дозе (рис.3). При сравнении НТ к штамму ВП «Л-3» в сыворотке крови привитых между группами достоверной разницы не выявлено ни на одной точке исследования (U-test $p > 0,05$). С 6 месяца после вакцинации и до конца строка наблюдения в сы-

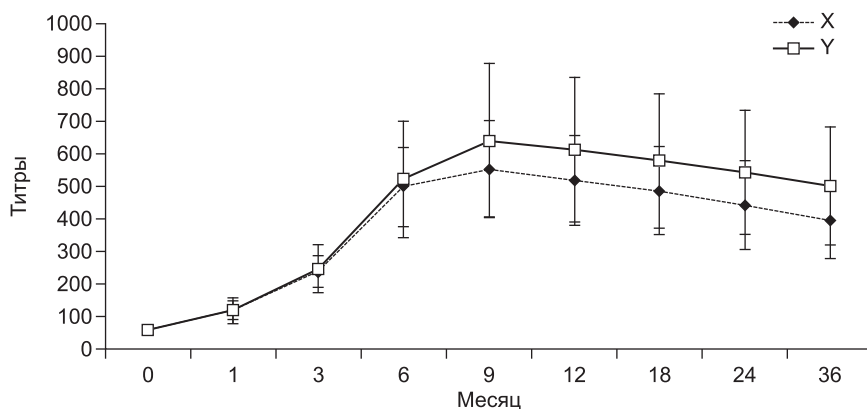


Рис. 1. Динамика специфических АТ в сыворотке крови вакцинированных добровольцев после однократной иммунизации паротитной вакциной сериями с разной специфической активностью ВП в прививочной дозе.

0 месяц — до вакцинации; «X» — группа добровольцев, привитых серией вакцины со специфической активностью ВП 4,82 lg ТЦД₅₀ в одной прививочной дозе; «Y» — группа добровольцев, привитых серией вакцины со специфической активностью ВП 5,23 lg ТЦД₅₀ в одной прививочной дозе (здесь и на рис. 2, 3).

Значения титров АТ в ИФА представлены, как GM±SD.

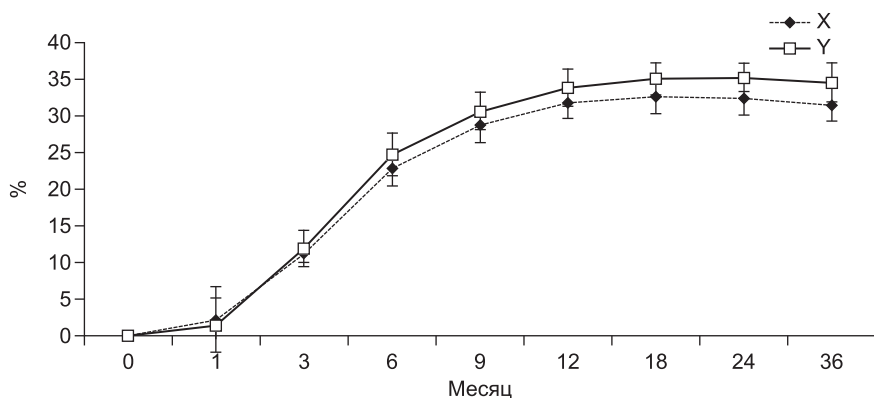


Рис. 2. Динамика ИА специфических АТ в сыворотке крови вакцинированных добровольцев после однократной иммунизации паротитной вакциной сериями с разной специфической активностью ВП в прививочной дозе.

Значения ИА в ИФА представлены, как $M \pm SD$.

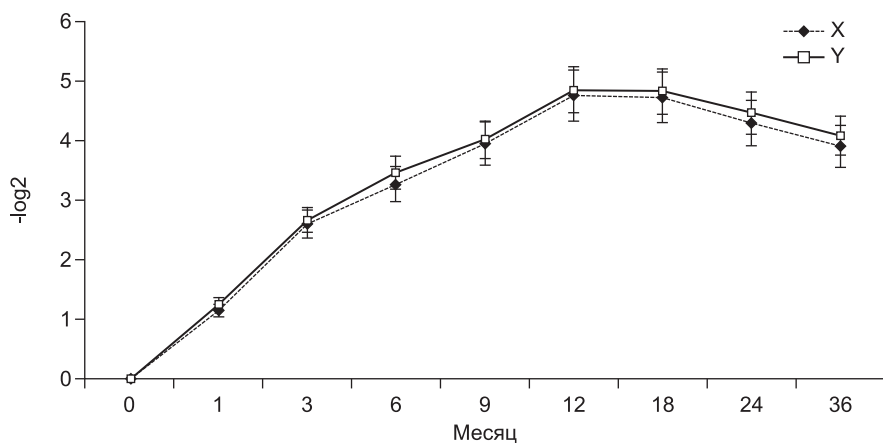


Рис. 3. Динамика титров нейтрализующих АТ к вакцинному штамму ВП «Л-3» в сыворотке крови вакцинированных добровольцев после однократной иммунизации паротитной вакциной сериями с разной специфической активностью ВП в прививочной дозе.

Значения титров АТ в РН представлены, как $GM \pm SD$.

в сыворотке крови всех привитых добровольцев в обеих группах титры в РН к вакцинному штамму ВП «Л-3» были $\geq 3 - \log_2$. Максимальные титры нейтрализующих антител наблюдались на 12 месяце и сохранялись на 18 месяце ($4,76 \pm 0,61 - \log_2$ и $4,86 \pm 0,66 - \log_2$) в группе добровольцев «X» и «Y» соответственно. Затем к 36 месяцу отмечалось достоверное падение НТ к штамму ВП «Л-3» в обеих группах (t -test $p < 0,05$).

С 6 месяца после вакцинации привитые в обеих группах обладали НТ в полном спектре, т.е. ко всем 5 гетерологичным штаммам ВП, использованным в нашем исследовании. Максимальные НТ к гетерологичным штаммам ВП наблюдались через 12 месяцев и сохранялись через 18 месяцев в обеих группах, и составляли $> 2 - \log_2$, $\min 2,42 \pm 0,5 - \log_2$, $\max 3,07 \pm 0,63 - \log_2$ (табл.). При сравнении НТ к соответствующим гетерологичным штаммам ВП между двумя группами привитых добровольцев достоверная разница не выявлена (U -test $p > 0,4$). Ожидаемо НТ к данным штаммам

Титры нейтрализующих антител к пяти гетерологичным штаммам ВП в сыворотке крови вакцинированных добровольцев после однократной иммунизации паротитной вакциной сериями с разной специфической активностью ВП в прививочной дозе

Месяцы		0	1	3	6	9	12	18	24	36	
Генотипы штаммов ВП	Серии вакцин-ны	Нейтрализующие титры в РН (-log ₂) GM±SD									
		«А»	X	0	1,12±0,38	1,68±0,66	2,58±0,71	3,21±0,75	3,67±0,78	3,69±0,58	3,50±0,71
	Y	0	1,18±0,42	1,82±0,63	2,70±0,75	3,24±0,75	3,73±0,76	3,75±0,65	3,53±0,68	3,19±0,62	
«В»	X	0	0	1,41±0,51	2,52±0,67	3,13±0,66	3,55±0,76	3,57±0,67	3,22±0,70	2,85±0,69	
	Y	0	1,02±0,16	1,63±0,58	2,70±0,75	3,25±0,71	3,72±0,75	3,72±0,62	3,37±0,66	3,10±0,71	
«D»	X	0	0	1,23±0,47	2,51±0,72	2,87±0,76	3,34±0,69	3,40±0,78	3,10±0,63	2,76±0,63	
	Y	0	1,02±0,18	1,26±0,47	2,50±0,75	2,90±0,77	3,41±0,66	3,60±0,76	3,24±0,63	3,00±0,66	
«H»	X	0	0	1,23±0,46	2,29±0,47	2,48±0,51	2,77±0,60	2,85±0,58	2,62±0,51	2,32±0,49	
	Y	0	0	1,23±0,46	2,32±0,48	2,62±0,47	2,87±0,57	2,91±0,54	2,68±0,54	2,42±0,51	
«C»	X	0	0	1,26±0,48	2,32±0,49	2,52±0,50	2,90±0,51	2,94±0,57	2,68±0,54	2,35±0,56	
	Y	0	0	1,26±0,47	2,38±0,50	2,61±0,29	3,01±0,51	3,05±0,54	2,90±0,57	2,48±0,54	

Пр и м е ч а н и е. 0 месяц — до вакцинации; «X» — группа добровольцев, привитых серией вакцины со специфической активностью ВП 4,82 lg ТЦД₅₀ в одной прививочной дозе; «Y» — группа добровольцев, привитых серией вакцины со специфической активностью ВП 5,23 lg ТЦД₅₀ в одной прививочной дозе. А — генотип «А», штамм ВП «Enders», В — генотип «В», штамм ВП «Urabe», С — генотип «С», штамм ВП «Dragoon», D — генотип «D», штамм ВП «London-1», H — генотип «H», штамм ВП «Petropov».

ВП в обеих группах добровольцев были достоверно ниже, чем НТ к вакцинному штамму ВП «Л-3» (U-test $p < 0,005$) в течение всего периода наблюдения (табл.). При сравнении НТ к разным штаммам ВП минимальная разница у добровольцев обеих групп наблюдалась между НТ к вакцинному штамму ВП «Л-3» и НТ к штаммам ВП генотипов «А», «В» и «D» (1,3-1,4 раза, t-test $p < 0,05$), а максимальная разница наблюдалась между НТ к вакцинному штамму ВП «Л-3» и НТ к штаммам ВП генотипов «С» и «Н» (1,6-1,9 раза, t-test $p < 0,005$). У всех привитых добровольцев на протяжении всего периода наблюдения не выявлена корреляция между титрами специфических АТ и НТ к штамму «Л-3» ($r = -0,23-0,031$), также как и между титром специфических АТ в ИФА и титрами в РН со всеми 5 штаммами ВП была крайне слабой. Отмечена положительная корреляция между НТ к штамму «Л-3» и НТ к 5 гетерологичным штаммам ВП ($r = 0,63-0,79$) у добровольцев обеих групп на протяжении периода с 12 по 24 месяц после вакцинации. Однако на 36 месяце наблюдения корреляция между НТ к штамму «Л-3» и НТ к ВП генотипов «С» и «Н» достоверно упала до $r = 0,42-0,46$ ($p < 0,05$). В целом, соответствующие коэффициенты корреляции между НТ специфических АТ у привитых добровольцев обеих групп не отличались ($p > 0,03$).

При проведении математического прогнозирования с помощью расчета линейного тренда средние геометрические титры (СГТ) специфических АТ в сыворотке крови опустились бы ниже пороговых значений (1:100) в группе привитых серий «Х» через 6 лет после иммунизации, а в группе привитых серий «У» через 8 лет после иммунизации. При аналогичном расчете линейного тренда НТ к вакцинному штамму ВП «Л-3» опустились бы ниже порогового уровня (<1:4) в группе добровольцев с серией «Х» через 7 лет после иммунизации и через 9 лет после иммунизации в группе добровольцев с серией «У». При расчете линейного тренда НТ к штаммам генотипов С и Н опустились бы ниже уровня пороговых значений через 5 лет после иммунизации у добровольцев обеих групп; НТ к остальным гетерологичным штаммам ВП опустились бы ниже порогового уровня через 6 лет в обеих группах добровольцев. Следует учесть, что данный математический прогноз был проведен для однократно привитых добровольцев без учета вероятности встреч реципиентов с «дикими» штаммами ВП и соответственно их бустерного влияния.

В представленном исследовании обе группы добровольцев имели сходные демографические и анамнестические характеристики. Ни у кого из 60 привитых добровольцев не было выявлено каких-либо значимых поствакцинальных реакций. Полная сероконверсия с учетом не только уровня специфических АТ в ИФА, но и НТ к вакцинному штамму ВП «Л-3» была зарегистрирована у всех добровольцев обеих групп через 3 месяца после вакцинации. Полный спектр нейтрализующих АТ в РН с 5 гетерологичными штаммами ВП был отмечен в сыворотке добровольцев через 6 месяцев после вакцинации. Максимум «функциональной» активности специфических АТ в соответствии с полученными показателями ИА и уровнем НТ в РН с 6 штаммами ВП наблюдался на 12-18 месяцы после вакцинации, при этом сам уровень специфических АТ в ИФА снижался с 12 месяца.

Отсутствие корреляции между уровнем специфических АТ, измеренным в ИФА, и уровнем НТ в РН с вакцинным штаммом ВП, продемонстрированное в настоящем исследовании, было также ранее показано другими исследователями [2, 3, 11]. Данный феномен объясняется, прежде всего, использованием разных антигенов ВП в серологических методиках. Некоторые исследователи предлагают использовать один и тот же антиген ВП и в ИФА, и в РН для определения уровня протективности паротитной вакцины [2, 3, 14]. На наш взгляд, наиболее целесообразно использовать

именно вакцинный штамм ВП как в ИФА, так и в РН. Такой универсальный подход позволил бы более объективно оценить уровень поствакцинального иммунитета.

На данном этапе отсутствует единое мнение относительно уровня протективности специфических АТ к ВП [3]. Большинство исследователей расценивает именно $НТ \geq 3\text{-log}_2$, как «вероятно протективные» [7, 11]. В нашем исследовании НТ к вакцинному штамму ВП на уровне $\geq 3\text{-log}_2$ обеспечивали полный спектр нейтрализующей активности (к 5 гетерологичным штаммам ВП) на уровне $НТ \geq 2\text{-log}_2$ в обеих группах привитых добровольцев. Нейтрализующая активность специфических АТ была разной в зависимости от штамма ВП, используемого при проведении РН. Аналогичные результаты были продемонстрированы ранее [2, 7]. Известно, что вспышки ПВИ среди вакцинированного молодого населения объясняются не только падением иммунитета, но и существующей разницей в антигенной структуре между вакцинным штаммом и циркулирующими «дикими» штаммами ВП [12]. Нейтрализующая активность специфических АТ к наиболее генетически отдаленным штаммам ВП в нашем исследовании была статистически ниже нейтрализующей активности АТ к вакцинному штамму ВП. Поэтому ожидаемо, что при отсутствии контактов НТ с «дикими» штаммами ВП упадут ниже протективного быстрее, чем НТ к вакцинному штамму ВП в РН. При математическом расчете трендов в нашем исследовании оказалось, что НТ специфических АТ к «диким» штаммам ВП оказались бы ниже порогового уровня практически в одно время в обеих группах добровольцев, т.е. независимо от титра ВП в прививочной дозе.

Некоторые исследователи [3, 13] предлагают дополнительно исследовать нейтрализующую активность сыворотки к «диким» штаммам ВП, т.к. именно способность специфических АТ нейтрализовать «дикие» штаммы ВП является маркером протективности паротитной вакцины. На наш взгляд, целесообразно проводить комплексное исследование поствакцинального иммунитета, включая титр специфических АТ в ИФА и их нейтрализующую активность с использованием антигена вакцинного штамма ВП в обоих методах исследования, а также дополнительно определять спектр и уровень нейтрализующей активности специфических АТ к циркулирующим «диким» штаммам ВП. Такое комплексное исследование поствакцинального иммунитета позволит объективно оценить его протективный уровень и даже прогнозировать ситуацию по эпидемическому паротиту в регионе.

В представленном исследовании серии паротитной вакцины, несмотря на значительную разницу в специфической активности штамма ВП «Л-3» в одной прививочной дозе (2,76 раза, U-test $p > 0,005$), обеспечивали формирование специфического иммунитета (по 8 показателям) на одинаковом уровне у 60 однократно привитых добровольцев.

Относительно высокая специфическая активность ВП в прививочной дозе может явиться причиной трансмиссии вакцинного штамма ВП, а в некоторых случаях причиной повышенной «реактогенности» самой вакцины для «чувствительного» реципиента [1, 6]. Производители вакцин против ВП чаще всего гарантируют минимальный эффективный уровень специфической активности ВП в вакцине, не ограничивая ее верхний предел. Исходя из полученных результатов, а также данных ранее проведенных исследований [1, 2, 6] представляется целесообразным контролировать или ограничивать верхний предел специфической активности ВП в прививочной дозе паротитной вакцины. Мониторинг поствакцинального иммунитета после двукратной иммунизации с использованием предложенного в нашем исследовании комплексного подхода позволит сделать более определенный вывод о целесообразности ограничения верхнего предела специфической активности ВП в

прививочной дозе паротитной вакцины. Такое ограничение, на наш взгляд, позволит снизить количество неблагоприятных событий после иммунизации, в том числе трансмиссию вакцинного штамма ВП, а также сделать производство паротитной вакцины более экономичным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Игнатъев Г.М., Кулак М.В., Отрашевская Е.В. и др. Изучение безопасности паротитной вакцины. Журн. микробиол. 2015, 6:43-50
2. Отрашевская Е.В., Букин Е.К., Красильников И.В., Игнатъев Г.М. Состояние специфического гуморального иммунитета после однократной иммунизации паротитной вакциной: данные трехлетнего наблюдения. Вопросы вирусологии. 2011, 3:22-25.
3. Allwinn R., Zeidler B., Steinhagen K. et al. Assessment of mumps virus-specific antibodies by different serological assays: which test correlates best with mumps immunity? Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2011, 10:1223-1228.
4. Atrasheuskaya A.V., Blatun E.M., Kulak M.V. et al. Investigation of mumps vaccine failures in Minsk, Belarus. Vaccine. 2007, 25:4651-4658.
5. Atrasheuskaya A.V., Kulak M.V., Rubin S., Ignatyev G.M. Mumps vaccine failure investigation in Novosibirsk, Russia, 2002-2004. Clin. Microbiol. Infect. 2007, 13:670-676.
6. Atrasheuskaya A.V., Neverov A.A., Rubin A.V., Ignatyev G.M. Horizontal transmission of the L-3 live attenuated mumps vaccine virus. Vaccine. 2006, 24:1530-1536.
7. Cortese M.M., Barskey A.E., Tegtmeier G.E. et al. Mumps antibody levels among students before a mumps outbreak: in search of a correlate of immunity. J. Infect. Dis. 2011, 9:1413-1422.
8. Date A.A., Kyaw M.H., Rue A.M. et al. Long-term persistence of mumps antibody after receipt of 2 MMR vaccinations and antibody response after a third MMR vaccination among a university population. J. Infect. Dis. 2008, 197:1662-1668.
9. Davidkin I., Jokinen S., Broman M. et al. Persistence of measles, mumps and rubella antibodies in an MMR-vaccinated cohort: a 20-year follow up. J. Infect. Dis. 2008, 197:950-956.
10. Dayan G.H., Rubin S. Mumps outbreaks in vaccinated populations; are available mumps vaccine effective enough to prevent outbreaks? Clin. Infect. Dis. 2008, 47:1458-1467.
11. Gouma S., Ten Hulscher H.I., et al. Mumps-specific cross-neutralization by MMR vaccine-induced antibodies predicts protection against mumps virus infection. Vaccine. 2016, 35:4166-4171.
12. Hanna-Wakima R., Yasukawa L.L., Sung P. et al. Immune responses to mumps vaccine in adults who were vaccinated in childhood. J. Infect. Dis. 2008, 12:1669-1675.
13. Jokinen S., Osterlund P., Julkunen I., Davidkin I. Cellular immunity to mumps virus in young adults 21 years after measles-mumps-rubella vaccination. J. Infect. Dis. 2000, 6:861-867.
14. Kenny L., O'Kelly E., Connell J. et al. Mumps outbreaks in a highly vaccinated population: Investigation of a neutralization titre against the current circulating wildtype genotype G5 mumps virus. J. Clin. Virol. 2016, 74:8-12.
15. Kontio M., Jokinen S., Paunio M. et al. Waning antibody levels and avidity: implications for MMR vaccine-induced protection. J. Infect. Dis. 2012, 10:1542-1548.

Поступила 10.06.18

Контактная информация: Отрашевская Е.В.,
115088, Москва, 1 Дубровская ул., 15, р.т. (495)790-77-73 доб. 22-24

ИНТЕРФЕРОНОВЫЙ СТАТУС В ОЦЕНКЕ ТЕРАПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМИ ПРЕПАРАТАМИ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Поликлиника №1 РАН, ³НИИ пульмонологии, ⁴Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Исследовать нарушения интерферонового статуса и оценить клинико-иммунологическую эффективность иммуноактивных препаратов у больных бронхиальной астмой (БА) с обоснованием целесообразности применения их у лиц с иммунокомпрометированным вирусным фоном. *Материалы и методы.* Обследованы 86 пациентов atopической БА, 67 пациентов были с atopической формой БА легкой, среднего и среднетяжелого течения в период ремиссии заболевания, 19 пациентов — в обострении БА. Применяли Иммуновак ВП-4 у пациентов с БА в ремиссии, индуктор интерферона (ИФН) циклоферон — у пациентов в обострении БА. Период наблюдения амбулаторных пациентов составил 1 год, в ходе которого осуществляли мониторинг клинических, аллергологических и иммунологических показателей, включающих оценку интерферонового статуса с определением биологической активности ИФН I и II типов, а также активности и количественного содержания ИФН II типа и IL-4 в сыворотке крови. *Результаты.* У всех пациентов с БА, независимо от степени тяжести заболевания, выявлено выраженное снижение биологической активности ИФН I и II типов, продуцируемых лейкоцитами больных, а также обнаружен сниженный потенциал Th2 клеток к синтезу IL-4 в период ремиссии, неполной ремиссии и особенно в период обострения, обусловленного ОРВИ. *Заключение.* Включение иммуномодулирующих препаратов Иммуновак ВП-4 и циклоферона в комплексную терапию пациентов atopической БА легкой и средней степени тяжести приводит к повышению ИФН-продуцирующей способности лейкоцитов, снижению заболеваемости ОРВИ и числа обострений основного заболевания. Применение синтетических и бактериальных иммуномодуляторов у пациентов с иммунокомпрометированным генезом заболевания позволит снизить число обострений БА и частоту респираторных вирусных инфекций.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 46—54

Ключевые слова: бронхиальная астма, профилактика обострений заболевания, интерфероновый статус, иммуномодулятор Иммуновак ВП-4, индуктор интерферона циклоферон

Т.П.Оспельникова^{1,4}, Н.В.Зарембо², А.Ю.Конищева¹, В.Б.Гервазиева¹, Г.Л.Осипова³, Н.А.Михайлова¹

INTERFERON STATUS IN ESTIMATING THE THERAPY OF BRONCHIAL ASTHMA WITH IMMUNOMODULATING PREPARATIONS

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Policlinic №1 of Russian Academy of Sciences, ³Federal Research Institute of Pulmonology, ⁴Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim: to investigate the violations of the interferon status and to evaluate the clinical and immunological efficacy of immunoactive drugs in patients with asthma with the justification of their use in persons with an immunocompromised viral background. *Materials and methods.* We examined 86 patients with atopical asthma, 67 patients with atopical BA of the lung, medium and moderate course during remission of the disease, and 19 patients with asthma exacerbation. Immunovac VP-4 was used in patients with BA in remission, interferon inducer (IFN) Cycloferon in patients with exacerbation of BA. The observation period of outpatients was 1 year, during which they monitored clinical, allergological and immunological parameters, including the assessment of interferon status with the determination of the biological activity of IFN type I and II, as well as the activity and quantitative content of type II IFN and IL-4 in the blood serum. *Results.* All patients with asthma, regardless of the severity of the disease, showed a pronounced decrease in the biological activity of IFN types I and II produced by the patients' leukocytes, and a reduced

potential of Th2 cells to synthesize IL-4 during remission, incomplete remission, and especially in period of exacerbation caused by ARVI. *Conclusion.* The inclusion of immunomodulating drugs Immunovac VP-4 and cycloferon in the complex therapy of patients with atopic asthma of light and moderate severity leads to an increase in leukocyte IFN-producing ability, a decrease in the incidence of ARVI and the number of exacerbations of the underlying disease. The use of synthetic and bacterial immunomodulators in patients with immunocompromised genesis of the disease will reduce the number of exacerbations of asthma and the frequency of respiratory viral infections.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 46—54

Key words: bronchial asthma, prevention of disease exacerbations, interferon status, immunomodulator Immunovac VP-4, interferon inducer cycloferon

ВВЕДЕНИЕ

Астма является распространенным и серьезным хроническим воспалительным заболеванием дыхательных путей, которой страдает 300 млн человек в мире. и в 2025 году к ним прибавится еще 100 млн людей [8, 13]. В России бронхиальной астмой (БА) страдает до 8% взрослого населения [3]. В настоящее время известны факторы риска обострения БА: вирусные и бактериальные инфекции. Так, более 80% обострений астмы у детей и около 50% обострений астмы у взрослых связаны с вирусными инфекциями верхних дыхательных путей [7], причем, в ряде работ показано, что к обострению заболевания могут приводить не только острые респираторные инфекции, но и активация длительно персистирующих вирусных инфекций [7, 14].

Эпидемическая ситуация в России по острым респираторным вирусным инфекциям (ОРВИ) характеризуется постоянным повышением уровня заболеваемости [4]. В этой связи изменение иммунологической реактивности у больных БА, проявляющееся в снижении местного иммунитета на фоне дисбаланса клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа, недостаточность системы интерферонов (ИФН) создает предпосылки для частых ОРВИ и развития на их фоне обострений БА [7]. Система врожденного иммунитета, включающая, в частности, систему интерферонов, считается одним из первых рубежей защиты организма человека при внедрении вирусов, способствуя их элиминации на ранних этапах [1, 6, 10, 15]. Кроме того, система ИФН играет роль связующего звена между врожденным и приобретенным иммунитетом, обеспечивая пролиферацию и дифференцировку клеток иммунной системы в активации противовирусного иммунитета.

С целью коррекции системы врожденного иммунитета и профилактики острых респираторных заболеваний в медицинской практике используется ряд иммуноактивных препаратов. Это иммуномодуляторы микробного происхождения: ИРС-19, рибомунил, бронхомунал, анатоксин стафилококковый очищенный, а также индукторы интерферона, которые все больше используются в патогенетической терапии и профилактике ОРВИ у больных БА [1-3, 11].

Цель работы — исследовать нарушения интерферонового статуса и оценить клинико-иммунологическую эффективность иммуноактивных препаратов у больных БА с обоснованием целесообразности применения их у лиц с иммунокомпromетированным вирусным фоном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 86 пациентов с atopической БА в возрасте $41,06 \pm 1,87$ лет. Диагноз БА устанавливали согласно рекомендациям ВОЗ (Глобальная стратегия лечения и профилактики БА, GINA). Исследование проводили в условиях аллергологического

кабинета ГКБ № 57 Москвы. 67 пациентов были с atopической формой БА легкого, среднего и среднетяжелого течения в период ремиссии заболевания. Пациенты с обострением БА (n=19) находились на стационарном лечении в ГКБ № 57 с подтвержденными ОРВИ. Период наблюдения амбулаторных пациентов составил 1 год, в ходе которого осуществляли мониторинг клинических, аллергологических и иммунологических показателей. В анамнезе обследованных больных имелись указания на частые острые респираторные инфекции, у 43 (51,8%) пациентов до 4 и более раз в год. У 72 (86,7%) пациентов ОРВИ, как правило, протекали с явлениями бронхоспазма.

Клинико-лабораторные исследования: клинический анализ крови; исследование функции внешнего дыхания (спирография, индивидуальная пикфлоуметрия). Аллергологическое обследование: сбор аллергологического анамнеза, постановка кожных проб с неинфекционными аллергенами (при отсутствии данных в амбулаторной карте), определение уровня общего и специфического IgE. При проведении кожного тестирования использовали неинфекционные аллергены производства «Микроген» (Ставрополь) и «Биомед» им.И.И.Мечникова. Оценку результатов кожных проб осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями Минздрава СССР №10-11/20 от 10.03.85 г. Определение уровня общего IgE и IgE-специфических антител к бытовым, пылевым аллергенам и аллергенам некоторых грибковых и условно патогенных микроорганизмов проводили с помощью непрямого твердофазного метода иммуноферментного анализа, разработанного в лаборатории аллергодиагностики НИИВС им. И.И. Мечникова. За нормальный уровень общего IgE принимали значения ниже 100 кЕ/л.

Метод оценки интерферонового статуса, изначально разработанный в ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи [2], включает определение уровня биологической активности ИФН I, II типов и циркулирующего (сывороточного) ИФН, продуцируемых лейкоцитами человека, по защите от цитопатического действия тест-вируса в чувствительной культуре клеток. За нормативные показатели ИФН I типа (α/β) принимали значения ≥ 640 Ед/мл, ИФН II типа (γ) ≥ 64 Ед/мл, сывороточного ИФН $\leq 2-8$ Ед/мл. Количественное определение цитокинов ИФН- γ и IL-4 в сыворотке крови проводили методом ИФА с помощью тест-систем «ProCon IFN- γ » и «ProCon IL-4» ООО «Протеиновый контур» (г. С.-Петербург, Россия) в соответствии с инструкциями по применению.

Для иммунокоррекции больных БА были применены отечественные иммуноактивные препараты: индуктор интерферона циклоферон и в рамках клинической апробации иммуномодулятор — вакцина Иммуновак ВП-4 [3]. Иммуновак ВП-4 вводили после подписания информированного согласия пациентам БА назально-подкожным способом. Этот метод включал 3 интраназальных и 5-6 подкожных введений препарата согласно инструкции по применению. При интраназальном введении препарат вводили 3 дня подряд с увеличением дозы от 1 до 4 капель. Через 3-5 суток переходили к подкожному введению в дозах от 0,05 до 0,2 мл, соблюдая интервал между инъекциями 3-5 суток.

Циклоферон — синтетический низкомолекулярный индуктор интерферона. Препарат индуцирует высокие титры интерферонов в органах и тканях, содержащих лимфоидные элементы (селезенка, печень, легкие). Основными клетками-продуцентами интерферона после введения циклоферона являются макрофаги, Т- и В-лимфоциты, естественные киллерные клетки [1]. Циклоферон в дозе 0,15 г применяли перорально по 0,3 г / сут. на 1, 2, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 20, 23 дни. Курсовая доза 3,0 г.

При обработке данных использовали общепринятые методы вариационной статистики. Достоверность различия средних величин определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Оценку различия средних величин иммунологических показателей проводили с помощью непараметрических критериев: Вилкоксона — для зависимых выборок и Манна-Уитни — для независимых выборок. Различия считались достоверными, если уровень значимости не превышал 5%, $p < 0,05$. Статистическую обработку осуществляли, используя компьютерную программу Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании системы интерферона были определены количественные параметры интерферонового ответа у пациентов с БА на фоне острой респираторной инфекции. Оценка системы интерферона у больных БА представлялась целесообразной ввиду высокого уровня заболеваемости острыми респираторными инфекциями и возникновения обострений астмы на этом фоне. Количество пациентов в обострении заболевания составило 19 человек, количество пациентов БА в фазе ремиссии заболевания составило 67 человек: с легким течением БА — 23 чел. (12 женщин и 11 мужчин), со средней тяжестью течения БА — 33 чел. (24 женщины и 9 мужчин) и со среднетяжелым течением БА — 11 человек (10 женщин и 1 мужчина). Исследуемые группы пациентов достоверно отличались между собой по количеству дневных и ночных приступов удушья в течение недели, по ОФВ₁, по объему базисной терапии и соответствовали пациентам с легким, средней тяжести и среднетяжелым персистирующим течением БА.

В большинстве случаев у пациентов (65,11%) преобладала сочетанная сенсibilизация к аллергенам пяти групп (аэроаллергены жилищ, эпидермальные, пыльцевые, грибковые и бактериальные аллергены). У 27,9% пациентов аллергия была выявлена к аллергенам 3-4 групп и лишь у 6,96% — к аллергенам двух групп.

У всех больных проведено исследование показателей уровня общего IgE, цитокинов, интерферонового статуса. В период ремиссии в группах пациентов с разной тяжестью течения заболевания отмечен достоверно более высокий уровень общего IgE у больных с легким течением БА по сравнению с группой больных с среднетяжелым течением БА. Это может быть связано с полисенсibilизацией при легкой БА [5]. При обострении БА отмечен достоверно более высокий уровень общего IgE и частота встречаемости его повышенного уровня (94,7%), по сравнению с пациентами средней тяжести течения и среднетяжелым течением БА вне обострения (56,7%). Вероятно, это связано с тем, что острые респираторные инфекции, вызывающие обострение заболевания, снижают барьерную функцию слизистых оболочек по отношению к чужеродным в антигенном отношении соединениям, вследствие чего в организм поступают избыточные количества аллергенов.

В сыворотках крови пациентов с БА выявлено повышенное количественное содержание ИФН- γ , за исключением пациентов с БА средней степени тяжести в ремиссии. Эти данные согласуются с результатами других авторов, выявивших увеличение ИФН- γ и ИФН- λ при экспериментальной риновирусной инфекции при аллергической БА [9].

В то же время, во всех группах пациентов, независимо от степени тяжести заболевания, выявлено выраженное снижение биологической активности интерферонов I и II типов, продуцируемых лейкоцитами больных. У пациентов со стойкой и нестойкой ремиссией БА и у всех пациентов с обострением БА на фоне острой респираторной инфекции выявлена недостаточная биологическая активность II степени ИФН I типа (α/β) и дефицит II-III степени ИФН II типа (γ) ($p < 0,05$). Активность

ИФН I типа была снижена в среднем в 5-6 раз от нижней границы нормы, активность ИФН II типа — в 6-12 раз, причем эти показатели интерферонов достоверно не отличались в группах. Отмечена тенденция к более низкой активности α/β - и γ -ИФН, продуцируемых лейкоцитами больных в фазе обострения заболевания, по сравнению с больными вне обострения.

Несмотря на переносимую респираторную вирусную инфекцию, у пациентов в фазе обострения БА не отмечено увеличения биологической активности сывороточного ИФН, за исключением одного пациента с тяжелым обострением БА, что в результате не обеспечивало необходимый уровень противовирусной защиты клеток. При БА вне обострения была выявлена повышенная биологическая активность сывороточного ИФН у 23 больных, причем, достоверно более частое в группе больных со среднетяжелым персистирующим течением БА, что может косвенно свидетельствовать о наличии персистирующей вирусной инфекции у исследуемой группы пациентов. Обращает на себя внимание то, что у пациентов БА снижен потенциал Th2 клеток к синтезу ИЛ-4 в период ремиссии, неполной ремиссии, и особенно в период обострения, обусловленного ОРВИ.

Вакцинация препаратом Иммуновак ВП-4 начата у 23 пациентов с БА легкой и средней степени тяжести заболевания в период ремиссии. В группе были 9 мужчин и 14 женщин в возрасте 16-61 год (средний возраст $34,65 \pm 3,36$ лет), 10 пациентов с течением БА средней тяжести и 13 — с легким. В группе сравнения были 15 пациентов с atopической БА: 8 мужчин и 7 женщин в возрасте от 17 до 68 лет (средний возраст $39,1 \pm 5,12$ лет). Из них 7 пациентов со средней тяжестью течения заболевания и 8 — с легкой степенью БА. У 2 пациентов вакцинация была прекращена из-за обострения БА, у 1 — из-за появления острой крапивницы, у 3 — в связи с присоединением ОРВИ.

Клиническую эффективность Иммуновак ВП-4 оценивали через год после вакцинации по частоте ОРВИ, частоте обострений БА и объему базисной лекарственной терапии. В течение 6 месяцев проводили мониторинг аллергологических показателей, показателей ИФН статуса, уровня сывороточных ИФН- γ и ИЛ-4, показателей ФВД.

Вакцинация была закончена у 17 пациентов: 9 пациентов с легким и 8 пациентов с течением средней тяжести БА. В группе вакцинированных пациентов и в группе сравнения клинические показатели, данные общего анализа крови, иммунологические показатели исходно были сопоставимы, за исключением уровня ИЛ-4, который был достоверно выше в группе вакцинированных пациентов до их вакцинации.

Исследование интерфероногенеза через 2 месяца у большей части вакцинированных пациентов, по сравнению с исходными данными, показало достоверное повышение биологической активности ИФН I типа, продуцируемого лейкоцитами больных, с $131,8 \pm 25,7$ до $285,8 \pm 74,6$ Ед/мл ($p < 0,05$). Через 6 месяцев сохранялось достоверное повышение активности ИФН- α/β до $237,6 \pm 47,7$ Ед/мл ($p = 0,027$) (табл.). Также была отмечена тенденция к повышению биологической активности ИФН- γ с $15 \pm 3,5$ до $28,71 \pm 7,6$ Ед/мл. В группе сравнения за время наблюдения биологическим методом выявлено снижение активности только сывороточного ИФН и количественного содержания в сыворотке ИФН- γ . Через 6 месяцев наблюдения уровень ИФН- γ был достоверно выше в сыворотках вакцинированных пациентов в сравнении с контрольной группой. Статистически значимых изменений общего IgE, ИЛ-4 за 6 месяцев наблюдения как в группе вакцинированных пациентов, так и в контрольной группе не выявлено. При сравнении степени сенсибилизации гриб-

Иммунологическая характеристика вакцинированных пациентов с БА в динамике лечения Иммунак ВП-4 и циклофероном

Пациенты	Период исследования	Показатели биологической активности интерферонов в Ед/мл (M±m)			Цитокины в сыворотке крови в пг/мл (M±m)		IgE в кЕ/л (M±m)
		Сывороточный ИФН	ИФН I	ИФН II	γ-ИФН	IL-4	Общий IgE
Группа сравнения, (n=15)	исходно	9,33±2,03	122,66±23,8	12,8±2,3	81,15±10,64	11,86±8,51	309,5±181,2
	ч/з 2 месяца	4,66±0,74*	143,33±26,32	26,2±8,31*	37,5±11,6*	6,13±4	305,4±147
	ч/з 1/2 года	4,66±0,84*	208±52,2	16,8±2,34	25±10,88*	6,86±5,49	853,8±453
Группа пациентов, принимающих ВП-4 (n=17)	исходно	6,94±1,42	131,76±25,7	15±3,5	76,12±16	164±75#	596,1±195
	ч/з 2 месяца	5,41±0,88	285,88±74,6*	20,94±5,77	70,41±17,9	42,2±13,4#	437±128
	ч/з 1/2 года	6,94±1,7	237,6±47,7*	28,7±7,6	80,2±17,7#	88,25±73	452,9±122
Группа пациентов, принимающих циклоферон (n=15)	исходно	10,4±2,8	135,3±43,5	10,26±2,17	58,75±14	32,4±31,5	442,8±176
	ч/з 2 месяца	6,26±2,07	342,6±53,4**^	38,66±7,46**	60,69±13,8	26,2±21,1	568,5±244
	ч/з 1/2 года	4,0±0,75	333,3±66,4**	31,7±6,17	62±19,6	21,46±17,3	521±326

Примечание. * Достоверность различий показателей по сравнению с исходной точкой внутри групп, $p < 0,05$; # между соответствующими показателями разных групп, $p < 0,05$; ** между соответствующими показателями внутри группы, $p < 0,05$; ^ между показателями больных, получавших циклоферон, и больных группы сравнения, $p = 0,02$.

ковыми и бактериальными аллергенами вакцинированных пациентов и пациентов группы сравнения исходно, через 2 и через 6 месяцев наблюдения достоверных различий не отмечено. Таким образом, в ходе исследования выявлено усиление эффекторного потенциала клеток врожденного иммунитета у вакцинированных пациентов, что выражалось увеличением биологической активности интерферонов I и II типов, продуцируемых клетками крови.

При анализе показателей заболеваемости ОРВИ и частоты обострений БА отмечено меньшее число заболеваний в группе вакцинированных. Через 1 год после вакцинации у пациентов отмечено достоверное снижение числа ОРВИ до $0,14 \pm 0,02$ /месяц на человека по сравнению с исходными данными ($p = 0,001$) и по сравнению с данными пациентов группы сравнения ($p < 0,025$). Также через год после вакцинации у пациентов отмечено достоверное снижение количества обострений БА до $0,05 \pm 0,01$ /месяц на человека по сравнению с исходными данными ($p = 0,0006$) и по сравнению с данными пациентов группы сравнения ($p < 0,025$).

Через год после вакцинации у 9 (52,9%) из 17 пациентов отсутствовали обострения БА, а также отмечено достоверное уменьшение количества ОРВИ в среднем на 59% на 100 человек/год. У больных с обострениями БА — уменьшение количества обострений БА в год в среднем на 76% на 100 человек/год. Заболеваемость ОРВИ и частота обострений БА в течение года у вакцинированных пациентов были достоверно ниже, чем в группе сравнения ($p < 0,05$).

Таким образом, включение в комплексную терапию пациентов с atopической БА легкой и средней степени тяжести в период ремиссии заболевания поликомпонентной вакцины Иммуовак ВП-4 способствует достоверному снижению заболеваемости ОРВИ и обострений БА, стабильному повышению активности ИФН I типа, продуцируемого лейкоцитами крови, в течение S года после вакцинации ($p < 0,05$), повышению клинической эффективности базисной терапии, что подтверждает роль бактериального иммуномодулятора Иммуовак ВП-4 в активации врожденного иммунитета у пациентов с БА. Далее было установлено, что у 17 из 19 пациентов (89,4%) с обострениями atopической БА ОРВИ были с микст-инфекциями, подтвержденными методом ПЦР (73,7%), а именно, вирусно-микоплазменными — в 63,2% случаев и вирусно-вирусными — в 10,5% при превалировании вирусов гриппа А и аденовирусов [2].

Лечение циклофероном проведено у 15 пациентов с atopической формой БА легкой и средней степени тяжести в фазе нестойкой ремиссии. В группе были 2 мужчин и 13 женщин, средний возраст которых составил $42 \pm 4,66$ лет; 13 пациентов были со среднетяжелым течением БА и 2 — с легким, средняя длительность заболевания пациентов составила $6,4 \pm 2,2$ лет. Лечение циклофероном проводили на фоне базисной терапии ингаляционными ГКС ($113,3 \pm 56$ мкг/сут). В течение S года после курса лечения циклофероном проводили мониторинг аллергологических показателей, интерферонового статуса, уровня сывороточных IL-4 и ИФН- γ . Эффективность применения циклоферона оценивали по частоте ОРВИ, частоте обострений БА через 1 год после лечения, динамике показателей ИФН статуса. Через 2 месяца после лечения циклофероном отмечено достоверное повышение биологической активности ИФН I типа, продуцируемого лейкоцитами больных, с $135,3 \pm 43,5$ до $342,6 \pm 53,4$ Ед/мл. по сравнению с исходными данными и с данными пациентов группы сравнения (табл.). Биологическая активность ИФН II типа по сравнению с исходными данными возросла с $10,2 \pm 2,17$ до $38,66 \pm 7,46$ Ед/мл ($p = 0,002$). Через S года после курса терапии циклофероном сохранялось достоверное повышение по сравнению с исходными данными активности ИФН I типа до $333,3 \pm 66,4$ Ед/мл ($p = 0,04$). Не отмечено достоверного изменения уровня IL-4, ИФН- γ , общего IgE как у пациентов, получавших лечение циклофероном, так и у пациентов группы сравнения. Клинические данные пациентов БА, пролеченных циклофероном, значимо не отличались от данных больных группы сравнения на протяжении года наблюдения.

При сравнении средней частоты заболеваемости ОРВИ и средней частоты обострений БА в месяц у пациентов, получавших циклоферон, и у пациентов группы сравнения через год наблюдения статистически достоверных различий не выявлено. Хотя при сравнении данных пациентов, пролеченных циклофероном, с их исходными данными выявлено статистически достоверное уменьшение частоты обострений БА через год с $0,31 \pm 0,02$ /месяц у человека до $0,13 \pm 0,03$ /месяц у человека ($p = 0,00004$). Если до лечения циклофероном 3-4 и более обострений заболевания в год отмечалось у 11 (73,4%) пациентов, то через год после лечения — у 4 (26,6%) пациентов. Т.е. у 11 (73,4%) пациентов после лечения циклофероном обострения БА в течение года отсутствовали или отмечалось 1-2 обострения в год, что достоверно отличалось от исходных данных ($p = 0,008$). Через год у пациентов, получавших циклоферон, отмечено достоверное уменьшение количества ОРВИ в среднем на 26% на 100 человек/год и уменьшение количества обострений БА на 52% на 100 человек/год.

При перерасчете заболеваемости ОРВИ на 100 человек/год в группе больных, получавших циклоферон, выявлено уменьшение заболеваемости с 413 случаев в год до 306 случаев в год, т.е. на 26%. В то же время, в группе сравнения отмечено увеличение заболеваемости ОРВИ с 366 случаев до 420 случаев на 100 человек/год, т.е. на 14%. Данные в группе больных, получавших циклоферон, и в группе сравнения достоверно отличались между собой ($p < 0,05$). При перерасчете частоты обострений БА в группе больных, получавших циклоферон, на 100 человек/год получено уменьшение частоты обострений с 360 до 173 случаев в год, т.е. на 52%. В группе сравнения отмечено снижение частоты обострений с 346 случаев до 240 случаев на 10 человек/год, т.е. на 31%. Частота обострений в течение года у пациентов, пролеченных циклофероном, была достоверно ниже, чем в группе сравнения ($p < 0,05$).

Учитывая, что циклоферон приводит к статистически достоверному повышению биологической активности ИФН I и II типов, продуцируемых лейкоцитами пациентов при обострении БА, и приводит к снижению числа обострений БА на фоне ОРВИ в течение 2 месяцев после курса терапии, он может быть рекомендован для профилактического приема пациентами в период эпидемических вспышек респираторных инфекций. Включение циклоферона в комплексную терапию пациентов с атопической БА легкой и средней степени тяжести приводит к повышению α/β - и γ -ИФН-продуцирующей способности лейкоцитов, снижению заболеваемости ОРВИ и числа обострений заболевания. В свою очередь, применение синтетических и бактериальных иммуномодуляторов у пациентов с иммунокомпromетированным генезом заболевания позволит снизить число обострений и частоту респираторных вирусных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. М., Медицина, 1996.
2. Никонова А.А., Файзулов Е.Б., Оксанич А.С., Кривцов Г.Г., Борисенко А.С., Соминина А.А., Зверев В.В. Выявление респираторных вирусов человека в биологических образцах методом мультиплексной ПЦР. Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней. 2006, 8:737-741.
3. Осипова Г.Л., Чучалин А.Г., Егорова Н.Б. Иммуноterapia бронхиальной астмы бактериальной вакциной ВП-4. Астма. 2000, 1(1):60-68.
4. Черешнев В.А., Черешнева М.В. Иммунологические механизмы локального воспаления. Медицинская иммунология. 2011, 13(6):557-568.
5. Asarnej A., Hamsten C., Wadén K. et al. Sensitization to cat and dog allergen molecules in childhood and prediction of symptoms of cat and dog allergy in adolescence: A BAMSE/MeDALL study. J. Allergy. Clin. Immunol. 2016. 137(3):813-21.e7. doi: 10.1016/j.jaci.2015.09.052.
6. Cai C., Zhou J., Sun X. et al. Integrated modeling and analysis of intracellular and intercellular mechanisms in shaping the interferon response to viral infection. PLoS One. 2017, 12(10): e0186105. doi: 10.1371/journal.pone.0186105.
7. Deschildre A., Pichavant M., Engelmann I. et al. Virus-triggered exacerbation in allergic asthmatic children: neutrophilic airway inflammation and alteration of virus sensors characterize a subgroup of patients. Respir. Res. 2017, 18(1):191. doi: 10.1186/s12931-017-0672-0.
8. From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2014-2016. Available from: <http://www.ginasthma.org/>.
9. Hansel T.T., Tunstall T.T., Trujillo-Torralbo M-B. et al. A Comprehensive Evaluation of Nasal and Bronchial Cytokines and Chemokines Following Experimental Rhinovirus Infection in Allergic Asthma: Increased Interferons (IFN- γ and IFN- λ) and Type 2 Inflammation (IL-5 and IL-13). EBioMedicine. 2017, 19:128-138. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.033.

10. Hermann M., Bogunovic D. ISG15: in sickness and in health. *Trends Immunol.* 2017, 38:79-93. 10.1016/j.it.2016.11.001.
11. Le Souef P. Viral infections in wheezing disorders. *Eur. Respir. Rev.* 2018, 27 (147). Pii: 170133. doi: 10.1183/16000617.0133-2017.
12. Makris S., Paulsen M., Johansson C. Type I Interferons as Regulators of Lung Inflammation. *Front. Immunol.* 2017, 8:259. doi: 10.3389/fimmu.2017.00259.
13. Masoli M., Fabian D., Holt S., Beasley R. Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 2004, 59(5):469-478. DOI:10.1111/j.1398-9995.2004.00526.x.
14. Radke J.R., Cook J.L. Human adenovirus infections: update and consideration of mechanisms of viral persistence. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2018. Doi: 10.1097/QCO.0000000000000451.
15. Sampson D.L., Fox B.A., Yager T.D. et al. A Four-Biomarker Blood Signature Discriminates Systemic Inflammation Due to Viral Infection Versus Other Etiologies. *Sci. Rep.* 2017, 7(1):2914. doi: 10.1038/s41598-017-02325-8.

Поступила 18.12.18

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*А.Ю. Попова¹, А.Н. Куличенко², А.С. Волынкина², И.В. Кузнецова², А.Т. Подколзин³, Е.В. Чехвалова⁴,
В.Г. Оробей⁵*

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ГЕНОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЕГИОНА СОЧИ В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ ЧЕМПИОНАТА МИРА ПО ФУТБОЛУ FIFA-2018

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва; ²Ставропольский противочумный институт; ³Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; ⁴Сочинский филиал Центра гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае; ⁵Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в г. Сочи

При подготовке к проведению чемпионата мира по футболу FIFA-2018 в 2015-2017 гг. определены генетические особенности региональных штаммов-патогенов в г. Сочи. Типированы штаммы и изоляты нуклеиновых кислот возбудителей инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы — ОКИ: рота-, норо-, астро и энтеровирусов, *Salmonella enteritidis*, природно-очаговых инфекций: хантавирусов, риккетсий группы КПЛ, боррелий. В результате осуществлено комплексное генетическое профилирование актуальных для региона г. Сочи вариантов возбудителей инфекций. Полученная база данных использована для обеспечения молекулярного анализа штаммов-патогенов в период проведения XIX Международного фестиваля молодежи и студентов (2017 г.) и во время проведения чемпионата мира по футболу (2018 г.). Показана перспектива использования данного алгоритма генетического анализа при расшифровке вспышек (случаев) инфекционных болезней на конкретных территориях.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 54—59

Ключевые слова: молекулярно-генетический анализ, острые кишечные инфекции, природно-очаговые инфекции, чемпионат мира по футболу, Сочи

A.Yu. Popova¹, A.N. Kulichenko², A.S. Volynkina², I.V. Kuznetsova², A.T. Podkolzin³, E.V. Chekhvalova⁴, V.G. Orobey⁵

THE APPLICATION OF MOLECULAR GENETIC ANALYSIS AND GENOMIC PROFILING OF INFECTIOUS DISEASES CAUSATIVE AGENTS IN SOCHI DURING THE PREPARATION AND HOLDING OF THE FIFA WORLD CUP 2018

¹Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow; ²Stavropol Research Institute for Plague Control; ³Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; ⁴Center of Hygiene and Epidemiology in Krasnodar Territory (Sochi Branch); ⁵Territorial Department of Rospotrebnadzor in Krasnodar Territory, Sochi, Russia

During the preparation of the FIFA World Cup 2018 in 2015-2017 genetic features of regional pathogenic strains in the city of Sochi are determined. The strains and nucleic acid isolates of bacterial and viral infectious diseases causative agents — acute intestinal infections: rota-, noro-, astro and enteroviruses, *Salmonella enteritidis*, natural focal infections: hantaviruses, *Rickettsia* of tick spotted fevers group, *Borrelia* are genotyped. In result, complex genetic profiling of infection diseases causative agents variants that are actual for the Sochi region has been carried out. The obtained database was used to provide molecular analysis of pathogens during the XIX International Festival of Youth and Students (2017) and during the FIFA World Cup (2018). The perspective of using this algorithm of genetic analysis in description of outbreaks (cases) of infectious diseases in specific areas is shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 54—59

Key words: molecular genetic analysis, acute intestinal infections, natural focal infections, FIFA World Cup 2018, Sochi

Качественное проведение эпидемиологического расследования вспышек и случаев инфекционных болезней, мониторинга их возбудителей, прогнозирование возможных осложнений эпидемиологической обстановки сегодня невозможно без эффективной системы генетического анализа штаммов возбудителей инфекций.

В последние годы в системе эпидемиологического надзора широкое практическое применение получили молекулярно-генетические методы, с помощью которых на основании сравнительного анализа геномных портретов можно установить источник инфекции, дифференцировать эндемичные для данной территории и заносные штаммы, выявить генетические маркеры патогенности. Наибольшее распространение для генотипирования возбудителей инфекционных болезней получили мультилокусный анализ вариабельного числа tandemных повторов (MLVA), мультилокусное сиквенс-типирование (MLST), электрофорез в пульсирующем поле (PFGE), секвенирование участков генома по Сэнгеру. С целью получения полной информации о генетической структуре возбудителя используют полногеномное секвенирование.

Современные технологии генетического анализа применяют для решения следующих основных задач: мониторинг за циркуляцией возбудителей инфекций на определенной территории, в т.ч. определение пространственных и временных особенностей распространения генетических вариантов по территории, оценка динамики эволюционных изменений в популяции; эпидемиологическая расшифровка вспышек (случаев) инфекционных болезней, в т.ч. выявление источника инфекции, региона происхождения штамма, путей заноса, оценка эпидемического потенциала штамма.

Научно-исследовательские организации Роспотребнадзора имеют опыт практического применения методов молекулярно-генетического типирования, в т.ч. при осуществлении коллекционной деятельности.

Для решения задач эпиднадзора за возбудителями инфекционных болезней с использованием методов генетического анализа наиболее эффективен следующий алгоритм работы:

1) накопление сведений о генетическом разнообразии и распространении в мире актуальных для региона возбудителей инфекций, а также патогенов, занос которых возможен на данную территорию;

2) молекулярно-генетический мониторинг за циркуляцией в определенном регионе штаммов возбудителей инфекций с целью получения информации о характерных для региона генетических вариантах (геномное профилирование), создание пополняемых баз данных;

3) применение методов генетического типирования для оперативного анализа при эпидемиологическом расследовании единичных и групповых случаев инфекционных заболеваний, определение происхождения штамма возбудителя инфекции, источника инфекции.

В работе рассмотрены вопросы применения методов молекулярно-генетического анализа штаммов патогенов для решения задач обеспечения биологической безопасности в период подготовки и проведения чемпионата мира по футболу 2018 г. в г. Сочи.

Генетический мониторинг возбудителей инфекционных болезней на территории Сочи в период подготовки к чемпионату мира по футболу в 2015–2017 гг. Основными эпидемиологическими рисками в регионе Сочи являются: наличие активных природных очагов инфекций (ПОИ) — геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) и др., большое число лиц, приезжающих на отдых и различные мероприятия, и как следствие, возможность заноса инфекции как из различных регионов РФ, так и из-за рубежа.

С учетом опыта крупных международных мероприятий, свидетельствующего о преобладающих рисках возникновения вспышек ОКИ и местных рисках, связанных с опасными ПОИ, для накопления информации о генетических особенностях региональных штаммов проводилось молекулярно-генетическое типирование штаммов и изолятов нуклеиновых кислот (НК) возбудителей инфекционных болезней бактериальной и вирусной этиологии, выявленных в данном регионе в 2015–2017 гг. Для определения генетического спектра возбудителей ОКИ проводилось исследование образцов клинического материала (пробы фекалий) от больных, госпитализированных в инфекционные стационары Сочи в период в 2015–2017 гг. С целью генетического типирования возбудителей ПОИ исследовали пулы иксодовых клещей видов *Ixodes ricinus*, *Neamaphysalis inermis*, образцы легкого грызунов и мелких млекопитающих, собранные при проведении эпизоотологического обследования территории Сочи, а также сыворотки крови от лихорадящих больных, выявленных в г. Сочи в указанный период.

В результате определены характерные для региона г. Сочи геноварианты возбудителей ОКИ: рота-, норо-, астро и энтеровирусов, *Salmonella enteritidis*, а также ПОИ: хантавирусов, риккетсий группы КПЛ, боррелий.

РНК-изоляты ротавирусов относились к 7 генотипам: G9[P]8, G4[P]8, G9[P]6, G4[P]6, G2[P]4, G1[P]8, G3[P]8. Выявлены изоляты норовирусов, принадлежащие к 3 генотипам: GII.17, GII.4_Sydney_2012, GII.3, варианты энтеровирусов генотипов Коксаки А4 и Коксаки А19, изоляты астровирусов генотипов HAstV-4 и HAstV-1.

Все исследованные штаммы *S. enterica* обладали идентичным MLVA-профилем 3-10-5-4-1.

На территории г. Сочи установлена циркуляция *Rickettsia helvetica* и *R. conorii*, хантавирусов «Добрава/Белград» и «Адлер», *Borrelia garinii* (ST 251) и *B. lusitaniae*, выявлено 3 новых сиквенс-типа боррелий.

Таким образом, была впервые осуществлена комплексная молекулярно-генетическая характеристика изолятов НК возбудителей ОКИ и ПОИ, циркулирующих на отдельной территории (г. Сочи). На основании результатов генетической идентификации изолятов возбудителей ОКИ и ПОИ проведена оценка их эпидемиологической значимости и определены особенности региональных популяций возбудителей ОКИ и ПОИ.

Варианты норовирусов генотипов GII.4_Sydney_2012 и GII.17, выявленные в регионе Сочи в 2015-2017 гг., обладают наибольшим эпидемическим потенциалом и наиболее часто являются этиологическими факторами крупных вспышек норовирусной инфекции [4, 5, 10]. Соотношение генетических вариантов ротавирусов в популяции г. Сочи (2015-2016 гг.) отличается от других регионов РФ. В регионе Сочи преобладали генотипы G9[P]8 (43,8 %) и G4[P]8 (31,3 %). В РФ доминирует генотип ротавирусов G4[P]8 (36,5-50,5 %), доля генотипа G9[P8] составляет 4,4-10 % [9].

В районе Сочи продолжается циркуляция хантавирусов «Адлер» и «Добрава-Сочи», являющихся эндемичными для этой территории. Заболевание, вызванное вирусом генотипа «Добрава-Сочи», отличается тяжелым течением [8]. Идентифицированные изоляты НК возбудителей иксодового клещевого боррелиоза и риккетсиозов, циркулирующие в регионе Сочи, наиболее генетически близки к европейским штаммам. Так, штаммы *B. garinii* сиквенс-типа ST251 ранее были выявлены в Германии (1994 г., 2008 г.) и Латвии (2007 г.). Впервые описанные сиквенс-типы *B. garinii* и *B. lusitaniae* наиболее генетически близки сиквенс-типам 244, 262, 576, 153, 148, 218 и 630. Варианты *B. garinii* сиквенс-типа 244 ранее были выявлены в Великобритании (2008 г.), Германии (1992 г. и 2011 г.) и России (г. Екатеринбург, 2014 г.), штаммы сиквенс-типов 576 и 262 выделены в Германии в 1992 г. и 2009 г. Варианты *B. lusitaniae* сиквенс-типа 148, 153 и 630 описаны в Сербии в 2010 г. и 2013 г., сиквенс-типа 218 — в Латвии (2007 г.).

R. helvetica, обнаруженная в клещах, собранных на территории г. Сочи, ранее была выделена из клещей *I. ricinus* и *Dermacentor reticulatus* на территории стран Европы: Франции — 1997 г., Хорватии — 2007 г., Швеции — 2006 г. [2, 3, 6].

На территории Лазаревского района Сочи установлена циркуляция *R. helvetica*, в Хостинском районе выявлены боррелии вида *B. lusitaniae* и хантавирус «Адлер» подгруппы II, на территории Адлерского района обнаружены боррелии *B. garinii* и хантавирус «Добрава/Белград» генотипа «Сочи». Территориальная приуроченность генетических вариантов возбудителей ПОИ в регионе Сочи определена с применением программного обеспечения ArcGis 10.1 [1].

Молекулярно-генетический анализ штаммов-патогенов был успешно применен в ноябре 2017 г. в период проведения XIX Международного фестиваля молодежи и студентов для эпидемиологического анализа случая заболевания лихорадкой денге участника фестиваля, прибывшего из Индии. Секвенирована нуклеотидная последовательность участка гена *CpгM* (435 п.н.) изолята РНК вируса денге из крови больного. В результате филогенетического анализа установлена принадлежность исследуемого изолята к генотипу V в пределах серотипа 1. С использованием информации из международной он-лайн базы данных DengueGenographicViewer (DGV), содержащей сведения о мировом распределении геновариантов вируса денге, установлено,

что генотип V имеет космополитное распространение, преобладает в Индии, также в 2016 г. большая часть случаев заболевания лихорадкой денге в Индии была связана с данным генотипом [7]. Сравнение секвенированной нуклеотидной последовательности с последовательностями из базы данных The Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) показало, что исследуемый изолят наиболее близок к изоляту Dengue virus 1 isolate D1/IND/PUNE/IRSHA-06, выделенному в Индии в 2016 г. Таким образом, в результате молекулярно-генетического анализа установлено, что исследуемый изолят РНК вируса денге занесен из Индии, что соответствует данным эпидемиологического анализа.

Применение методов молекулярно-генетического типирования штаммов возбудителей инфекционных болезней человека для обеспечения биологической безопасности в период проведения чемпионата мира по футболу 2018 г. в г. Сочи. В период проведения чемпионата мира по футболу в г. Сочи в 2018 г. была обеспечена готовность к проведению генотипирования возбудителей актуальных для региона природно-очаговых, острых кишечных, а также особо опасных инфекций, накоплены данные о геномных портретах региональных штаммов: возбудителей ОКИ бактериальной и вирусной этиологии (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, ОРВИ (вирусы гриппа); возбудителей, эндемичных для региона, и других природно-очаговых инфекций (ГЛПС, КГЛ, ЛЗН, лихорадка Денге, Зика, Чикунгунья, Желтая лихорадка); возбудителей, являющихся потенциальными агентами биотерроризма (*Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*, *Brucella* spp.);

Осложнений эпидемиологической обстановки в г. Сочи в период проведения матчей чемпионата мира по футболу не наблюдалось. Зарегистрированы спорадические случаи заболевания ОКИ бактериальной и вирусной этиологии и гриппом.

Проведено молекулярно-генетическое типирование РНК-изолята норовируса, выявленного в клиническом материале с достаточной вирусной нагрузкой от больного из Республики Панама. Расшифрована нуклеотидная последовательность фрагмента белка нуклеокапсида размером 227 п.н. Сравнение секвенированной последовательности с данными GeneBank, NogoNET и последовательностями ранее секвенированных изолятов из г. Сочи позволило определить принадлежность выявленного изолята к генотипу GI.4_Sydney_2012, который с 1990 г. является доминирующим в мире и обладает наибольшим эпидемическим потенциалом [4]. Норовирусы этого генотипа широко распространены в регионах Российской Федерации, данный геновариант доминирует в г. Сочи (47 % от всех изолятов норовирусов).

Мероприятия, проведенные в период подготовки к проведению чемпионата мира по футболу FIFA-2018, направленные на получение сведений о генетических особенностях региональных штаммов возбудителей инфекций в г. Сочи, мировом распространении геновариантов патогенов, занос которых возможен на данную территорию, а также обеспечению готовности лабораторной базы к проведению генетического типирования возбудителей инфекций позволили успешно применить методы молекулярно-генетического анализа для эпидемиологического анализа случаев заболевания людей при проведении чемпионата мира по футболу и международного фестиваля молодежи и студентов в г. Сочи. Необходимо отметить, что эффективность применения методов молекулярно-генетического анализа зависит от наличия информации о генетических особенностях как региональных штаммов, так и сведений о мировом генетическом разнообразии и преобладающих геновариантах различных возбудителей на текущий момент в различных регионах мира. Продолжение начатых исследований по изучению генетического спектра возбудителей инфекционных болезней в регионах Российской Федерации позволит уточ-

нить характеристику фоновых генетических вариантов возбудителей ПОИ и ОКИ на отдельных территориях. Полученные данные будут использованы при эпидемиологическом анализе возможных случаев (вспышек) инфекционных болезней для определения источника и путей распространения инфекции. Актуальна разработка программных (компьютерных) платформ для автоматизации эпидемиологического анализа с использованием молекулярно-генетической информации о возбудителях. Создание и внедрение в практику он-лайн платформы, позволяющей осуществлять сравнительный молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей и геномных профилей штаммов-патогенов, накапливать и систематизировать и отображать на карте данные о циркуляции в мире генетических вариантов возбудителей актуальных инфекций, способных вызвать эпидемические осложнения при заносе на территорию страны, и геновариантов, характерных для отдельных регионов России, позволит повысить эффективность эпидемиологического анализа случаев инфекционных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куличенко А.Н., Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Котенев Е.С., Кузнецова И.В., Подколзин А.Т., Зайцева Е.В., Паркина Н.В., Оробей В.Г. Генетическое профилирование актуальных для региона г.-к. Сочи возбудителей природно-очаговых и кишечных инфекций. Бактериология. 2016, 1(1):16-21.
2. Dobec M., Golubic D., Punda-Polic V. et al. Rickettsia helvetica in Dermacentor reticulatus Ticks. Emerging Infectious Diseases. 2009, 15(1):98-100. doi:10.3201/eid1501.080815.
3. Fournier P.E., Grunnenberger F., Jaulhac B. et al. Evidence of Rickettsia helvetica infection in humans, eastern France. Emerging Infectious Diseases. 2000, 6(4):389-392.
4. Gonin P. et al. Genetic Diversity and Molecular Epidemiology of Norwalk-like Viruses. The Journal of Infectious Diseases. 2000, 182:691–697. <<http://dx.doi.org/10.1086/315780>>.
5. Graaf M., Beek J., Vennema H. et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus — End of the GII.4 era? Euro Surveill. 2015;20(26):pii=21178. Article DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.26.21178>.
6. Nilsson K., Elfving K., Pehlgren C. Rickettsia helvetica in Patient with Meningitis, Sweden, 2006. Emerging Infectious Diseases. 2010, 16(3): 490-492. doi:10.3201/eid1603.090184.
7. Pickett B.E., Sadat E.L., Zhang Y. et al. VIPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research. Nucleic Acids Res. 2012, 40:D593-D598.
8. Tkachenko E.A., Witkowski P.T., Radosa L. et al. Adler Hantavirus, a New Genetic Variant of Tula Virus Identified in Major's Pine Voles (Microtus Majori) Sampled in Southern European Russia. Infection, Genetics and Evolution. Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases. 2015, 29:156-163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.018>.
9. Veselova O., Podkolzin A., Petukhov D. et al. Rotavirus Group A Surveillance and Genotype Distribution in Russian Federation in Seasons 2012-2013. International Journal of Clinical Medicine. 2014, 5:407-413. doi: 10.4236/ijcm.2014.57055.
10. Vinje Jan. et al. Development and Application of a Capsid VP1 (Region D) Based Reverse Transcription PCR Assay for Genotyping of Genogroup I and II Noroviruses. Journal of Virological Methods. 2004, 116:109-117.

Поступила 20.02.19

Контактная информация: Волынкина Анна Сергеевна,
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-12

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЗАЩИТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА КАНДИДАТНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЖИВОЙ КОКЛЮШНОЙ ВАКЦИНЫ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

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

Цель. Изучение защитной активности кандидатной рекомбинантной живой коклюшной вакцины (РЖКВ) интраназального применения. *Материалы и методы.* В работе использованы два метода оценки защитной активности коклюшных вакцин, основанные на определении выживаемости выкцинированных мышей: традиционный — после внутримозгового в тестах внутримозгового заражения бактериями *B. pertussis* 18323 и интраназального заражения вакцинированных мышей вирулентными бактериями рода *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. paraptussis* и *B. bronchiseptica*). *Результаты.* Предложен оригинальный метод, характеризующий защитную активность коклюшных вакцин, обусловленную мукозальной составляющей иммунитета. Защитная активность сконструированной авторами живой рекомбинантной коклюшной вакцины интраназального применения, определенная двумя методами, превосходила защитную активность коммерческого препарата АКДС. РЖКВ обеспечивала защиту от заражения мышей природными и рекомбинантными бактериями рода *Bordetella*. *Заключение.* Изученная рекомбинантная живая коклюшная вакцина интраназального применения имеет выраженный защитный потенциал и может быть рекомендована для проведения клинических исследований.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 60—69

Ключевые слова: живая вакцина, интраназальное применение, защитная активность, выживаемость

L.N.Sinyashina, E.G.Semin, A.Yu.Medkova, R.A.Syundyukova, G.I.Karataev

PRE-CLINICAL STUDY OF PROTECTIVE POTENCY OF CANDIDATE RECOMBINANT LIVE PERTUSSIS VACCINE FOR INTRANASAL ADMINISTRATION

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

The aim of present research is studying of protective potency of candidate recombinant live pertussis vaccine (RLPV) for intranasal administration. *Materials and methods.* Two methods of protective potency assessment, based on mice survival estimating, were used: after intracerebral administration of *B. pertussis* 18323 bacteria and after intranasal administration of virulent *Bordetella spp.* bacteria (*B. pertussis*, *B. paraptussis* and *B. bronchiseptica*) to immunized mice. *Results.* An ingenious method of pertussis vaccine protective potency assessment due to mucosal immunity is suggested. Protective potency of constructed RLPV estimated in two tests of intracerebral and intranasal administration was higher than market image drug of DTP vaccine. RLPV provided protection from infection in mice after administration of both wild type and recombinant *Bordetella spp.* bacteria. *Conclusion.* Examined recombinant live pertussis vaccine (RLPV) for intranasal administration has significant protective potential and could be recommended for using in clinical trials.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 60—69

Key words: live pertussis vaccine, intranasal administration, protective potency, survival

ВВЕДЕНИЕ

Коклюш — тяжелое инфекционное заболевание, передающееся воздушно-капельным путем и относящееся к категории управляемых инфекций, контролируемых с помощью вакцинопрофилактики. С начала 1950-х годов вакцинацию против коклюша во всем мире проводят цельноклеточными коклюшными вакцинами (ЦКВ) в составе АКДС. В начале 1990-х годов в ряде экономически развитых стран ЦКВ заменили на менее реактогенные бесклеточные (ацелюлярные) коклюшные вакцины (БКВ) в составе АаКДС. Однако, несмотря на успехи вакцинопрофилактики коклюша, заболеваемость во всем мире неуклонно растет [9]. Все чаще выявляют коклюш у подростков и взрослых, растет число атипичных форм заболевания и, так называемого, бессимптомного носительства. Клинические изоляты возбудителя коклюша содержат измененные новые генотипы бактерий *B. pertussis*, позволяющие нивелировать поствакцинальный иммунитет [1,14]. Краткосрочность протективного иммунитета, индуцированного современными коклюшными вакцинами, также отражается на увеличении заболеваемости в атипичных формах и распространенности коклюша в разных возрастных группах. Сложившаяся эпидемиологическая картина диктуют необходимость совершенствования применяемых коклюшных вакцин, а также создания новых, позволяющих эффективно иммунизировать младенцев и ревакцинировать подростков и взрослых. В НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи разработана инновационная рекомбинантная живая коклюшная вакцина (РЖКВ) для интраназального применения. РЖКВ содержит генетически модифицированные бактерии *B. pertussis* 4MKS, несущие две мутации в опероне *ptx* и точечную мутацию в его промоторной области, а также нокаутную мутацию гена *dnt*. Бактерии *B. pertussis* 4MKS, также как и сконструированные ранее аттенуированные бактерии, продуцируют нетоксичную форму коклюшного токсина (КТ) и не синтезируют дермонекротический токсин (ДНТ) [4,5]. Рекомбинантные бактерии *B. pertussis* 4MKS в результате сайт-направленного мутагенеза промоторной зоны оперона *ptx* приобрели наиболее распространенный в настоящее время в популяции возбудителя коклюша генотип *ptxP3*, характеризующийся повышенной экспрессией КТ в сравнении с бактериями генотипа *ptxP1* [4,6]. Целью настоящей работы было изучение защитной активности кандидатной рекомбинантной живой коклюшной вакцины интраназального применения в тестах внутримозгового и интраназального заражения вакцинированных мышей вирулентными бактериями рода *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактерии *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* культивировали на твердой питательной среде КУА с добавлением 10% дефибринированной крови барана при температуре 35°-37°С в течение 24-36 ч. После интраназального заражения у эвтаназированных мышей извлекали легкие, гомогенизировали в 0,85% растворе хлорида натрия рН 7.2-7.4, инкубировали при температуре 35°С 15 мин и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5-10 мин. По 0,1 мл супернатанта высевали на три чашки Петри с селективной средой. Для выделения ДНК супернатанты гомогенатов легких обрабатывали раствором гуанидинтиоцианата с последующей сорбцией ДНК на магнитном сорбенте фирмы «Promega» США [2]. Использована разработанная нами тест-система для ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) [2]. Защитную активность РЖКВ и субстанции — аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS определяли после однократного интраназального введения трех пятикратных разведений

препарата, начиная с дозы 0,750 МЕ в 0,025 мл 20 мышам. Коммерческий препарат АКДС разводили в соответствии с инструкцией до концентрации 0,750 МЕ в 0,5 мл и вводили внутрибрюшинно однократно 20 мышам. Спустя 17-20 суток после иммунизации мышей заражали интрацеребрально вирулентными бактериями *V.pertussis* 18323. В экспериментах использовали мышей линии Balb/c1 обоего пола весом 10-12 г. Одновременно из этой же партии использовали мышей для титрования ЛД₅₀ штамма *V. pertussis* 18323. Тест считали положительным, если препарат обеспечивал выживаемость более 70 % мышей при заражении их не менее 100 ЛД₅₀ [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Существующие в настоящее время для профилактики коклюша вакцины АКДС и АаКДС применяют парентерально (внутримышечно), и методы изучения их защитной активности предполагают подкожное или внутрибрюшинное однократное введение тестируемых препаратов мышам. Для доклинического исследования живых коклюшных вакцин нами отработан метод интраназального введения бактерий *V. pertussis* лабораторным животным. Для иммунизации и экспериментального заражения суспензию бактерий *V. pertussis* вводили интраназально, используя краткосрочный наркоз, обеспечивающий свободное дыхание животного. Обездвиживание мышей достигалось внутримышечным введением раствора золетила (Франция) в количестве 0,2-0,4 мг. После наркоза каплю суспензии на конце иглы шприца Гамильтон (20-25 мкл) подносили к носу мыши, добиваясь ее полного вдыхания без разбрызгивания. Для определения эффективной дозы было определено количество бактерий *V. pertussis* в респираторном тракте мыши через час после интраназального введения препарата. С этой целью гомогенат легких мышей в разведениях высевали на среду КУА с кровью и параллельно определяли количество геном—эквивалентов *V. pertussis* с помощью ПЦР РВ. Установлено, что через один час после интраназальной инокуляции около 10⁹ бактерий *V. pertussis* методом ПЦР РВ в легких мышей регистрируется около 10⁶ ГЭ *V. pertussis*, а бактериологическим методом 10⁵ КОЕ.

Интраназальное введение РЖКВ проводили по описанной выше методике. Результаты экспериментов представлены на рис. Установлено, что мыши, интраназально иммунизированные РЖКВ в дозе 0,75х10⁹ м.к. (0,75 МЕ), выживали в 100% случаев при заражающей дозе в 300 ЛД₅₀. В среднем 89,7 % выживаемости мышей обеспечивала доза вакцины 0,15 МЕ и 59% — 0,03 МЕ. Таким образом, предполагаемая защитная доза РЖКВ, обеспечивающая выживание более 70% вакцинированных мышей, близка к 0,15 МЕ. В качестве сравнения были выбраны: коммерческий препарат АКДС С1252/ААП/15 НПО «Микроген» и изогенные аттенуированные бактерии *V. pertussis* 4М генотипа рtxP1. АКДС защищала только 85% мышей даже при иммунизации максимальной дозой. Выживаемость при дозе 0,15 МЕ составляла 60%, а при минимальной дозе выживало 10 % мышей, интрацеребрально зараженных вирулентными бактериями *V. pertussis* 18323. Интраназальная иммунизация живыми бактериями *V. pertussis* 4М обеспечивала 60% выживаемости мышей при дозе равной 0,15 МЕ, в то время как тот же уровень защиты обеспечивали бактерии *V. pertussis* 4МКС (РЖКВ) в дозе в 5 раз меньшей — 0,03 МЕ.

Ранее нами были сконструированы рекомбинантные бактерии *V. bronchiseptica* 8220-17, продуцирующие коклюшный токсин (КТ) [6]. КТ, продуцируемый рекомбинантными бактериями *V.bronchiseptica* 8220-17, обладает свойствами нативного КТ, экспрессируемого вирулентными бактериями *V.pertussis*. Следует отметить, что помимо описанных ранее иммунобиологических характеристик, интраназальное введение бактерий *V.bronchiseptica* 8220-17 макакам резус сопровождалось развити-

ем лейкоцитоза и выработкой специфических антител к КТ, взаимодействующих с нативным КТ (не опубликовано).

Бактерии *V.pertussis* 475 выращивали на среде КУА с кровью в течение 24—30 часов, *V.parapertussis* 504 — 18-20 ч, *V.bronchiseptica* 8220-17 — 12-16 ч. Культуру собирали с чашек, суспендировали в 0,85% растворе хлорида натрия до концентрации 120 МЕ ($1,2 \times 10^{11}$ м.к. в мл) и по 25 мкл суспензии в соответствующих разведениях вводили мышам. Для инокуляции использовали исходную культуру и два 3-кратные разведения, содержащие 3×10^9 , 1×10^9 и 3×10^8 МЕ, соответственно. Контролем служили мыши, которым интраназально вводили по 25 мкл 0,85% раствора хлорида натрия. Определение количества бактерий в легких животных через час после введения показало, что при интраназальном введении 3×10^9 м.к. регистрировали от 10^6 до 10^7 ГЭ бактерий, при введении дозы 3×10^8 — высевали порядка 10^5 КОЕ. Рассчитанное из количества инокулированных бактерий рода *Bordetella* значение ЛД₅₀ составляло (0,25-0,47) $\times 10^9$ м.к. Результаты представлены в табл. 1. Наибольшую гибель мышей наблюдали в период с 3 по 17 дни, при введении 3×10^9 м.к. погибало 100% мышей и 80-100% при дозе 10^9 м.к. Доза $0,3 \times 10^9$ м.к. вызывала гибель 60-80% мышей. Инфицированные мыши теряли в весе, изменялся шерстяной покров (выпадение, взъерошенность и т.п.), снижалась двигательная активность (сбивались в кучу, сидели без движения). Через 20 дней состояние выживших мышей приходило в норму. В контрольной группе все мыши оставались живыми. Срок наблюдения 30 суток.

Интраназальную иммунизацию мышей проводили тремя сериями РЖКВ. ЛД₅₀ вирулентных бактерий *V. bronchiseptica* 8220 и 8220-17 (рекомбинантный штамм продуцирующий нативный КТ), *V. pertussis* 475, *V. parapertussis* 504 определены в соответствии с результатами, представленными в табл. 1. Иммунизированных РЖКВ мышей заражали интраназально разрешающей дозой $(3-5) \times 10^9$ м.к., что соответствовало 7-12 ЛД₅₀ для использованных вирулентных бактерий рода *Bordetella*. Результаты эксперимента приведены в табл. 2.

В настоящем сообщении представлены результаты изучения защитной активности РЖКВ интраназального применения.

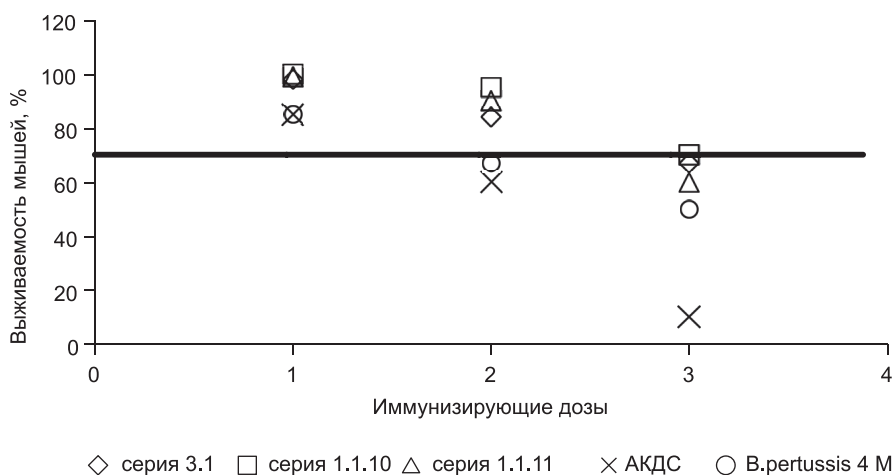
Таблица 1. Определение вирулентности бактерий *V.pertussis* 475, *V.parapertussis* 504 и *V.bronchiseptica* 8220-17

Бактерии	Заражающая доза ($\times 10^9$ м.к.)	Нв/No	ЛД ₅₀ ($\times 10^9$ м.к.)
<i>V. bronchiseptica</i> 8220-17	3,0	0/10	0,25
	1,0	1/10	
	0,3	2/10	
<i>V. pertussis</i> 475	3,0	0/10	0,29
	1,0	0/10	
	0,3	4/10	
<i>V. parapertussis</i> 504	3,0	0/10	0,44
	1,0	2/10	
	0,3	4/10	
<i>V. bronchiseptica</i> 8220	3,0	0/10	0,47
	1,0	1/10	
	0,3	3/10	

Примечание. Нв — количество выживших мышей; No — количество мышей в эксперименте (здесь и в табл. 2).

Таблица 2. Защитная активность РЖКВ в тесте интраназального заражения мышей живыми бактериями *V.pertussis* 475, *V.bronchiseptica* 8220-17 и *V.parapertussis* 504

Препарат	Доза ($\times 10^9$ м.к.)	Нв/No и % выживших мышей		
		В.п. 475	В.б. 8220-17	В.рр. 504
РЖКВ, серия 3.1	0,75	10/10	9/10	10/10
	0,15	10/10	9/10	10/10
	0,03	8/10	7/10	7/10
РЖКВ, серия 1.1.10	0,75	10/10	10/10	10/10
	0,15	9/10	8/10	9/10
	0,03	8/10	8/10	7/10
РЖКВ, серия 1.1.11	0,75	9/10	10/10	10/10
	0,15	10/10	10/10	8/10
	0,03	8/10	8/10	9/10
Вакцина АКДС	0,75	9/10	7/10	10/10
	0,15	7/10	6/10	8/10
	0,03	4/10	3/10	4/10



Защитная активность РЖКВ после внутримозгового заражения мышей вирулентными бактериями *V. pertussis* 18323.

РЖКВ — серии 3.1, 1.1.10, 1.1.11; АКДС — серия С1252/ААП/15; *V. pertussis* 4М — аттенуированные бактерии *V. pertussis* генотипа Ptx P1; горизонтальная линия: контрольный уровень 70% выживания мышей; иммунизирующие дозы: 1 — $0,75 \times 10^9$ м.к.; 2 — $0,15 \times 10^9$ м.к.; 3 — $0,03 \times 10^9$ м.к.

Для оценки защитной активности ЦКВ, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, как правило, используют тест внутримозгового (интрацеребрального) заражения иммунизированных мышей вирулентными бактериями тестового штамма *V. pertussis* 18323 [3,17]. Защитную активность новых препаратов БКВ в Европе и США определяют по иммуногенности — способности индуцировать выработку специфических противокклюшных антител, в сравнении с лицензированными препаратами. В Японии, Китае, Корее для оценки БКВ используют разные модификации теста интрацеребрального заражения (ICN или MICA). Применяется также методика сравнительной оценки скорости выведения вирулентных бактерий *V. pertussis* из легких мышей после интраназального заражения контрольных и вакцинированных животных (INCA) [17]. Именно такой метод использован для оценки протективности живых аттенуированных бактерий *V. pertussis* BPZE1, сконструированных французскими учеными [13]. Основные трудности при определении защитной активности новых вакцинных препаратов состоят в сложности стандартизации предлагаемых методов и сопоставлении полученных результатов [17]. Нам представляется, что метод определения защитной активности коклюшных вакцин в тесте интрацеребрального заражения мышей, несмотря на его трудоемкость, достаточно воспроизводим, хорошо коррелирует с защитной активностью ЦКВ и пригоден для оценки протективности рекомбинантных живых коклюшных вакцин. Для того, чтобы оценить протективность живой вакцины при естественном для коклюша интраназальном введении вирулентных бактерий, нами разработан метод, предполагающий определение выживаемости контрольных и интраназально вакцинированных мышей после их интраназального заражения вирулентными бактериями рода *Bordetella* [6]. Описание подобного метода в современной литературе не встречается.

Проведенные исследования показали, что внутримышечное введение золетила в дозе 0,2-0,4 мг приводит к краткосрочному (5-10 мин) обездвиживанию мышей (крысят) и сохраняет равномерное дыхание животных. В таком состоянии они способны вдохнуть 20-25 мкл суспензии (10^8 - 10^9 МОЕ) в виде капли на конце иглы

шприца «Гамильтон» без разбрызгивания и потери материала. Эвтаназия животных через час после введения препарата показала, что в легких регистрируется около (10^5 - 10^6) ГЭ, что значительно меньше количества инокулированных бактерий. Результат одинаков для вирулентных и аттенуированных бактерий *V. pertussis*, рекомбинантных бактерий *V. bronchiseptica* 8220-17 и природных изолятов *V. bronchiseptica* 8220 и *V. paraptussis* 504. Этот показатель важен для определения дозы препарата РЖКВ, формирующей определенный защитный эффект, и его следует учитывать при оценке результатов как в экспериментах с животными, так и при планировании вакцинирующей дозы в клинических исследованиях РЖКВ. Защитную активность РЖКВ при вакцинации мышей интраназальным способом проверяли в двух тестах. Интрацеребральное заражения мышей вирулентными бактериями *V. pertussis* 18323 продемонстрировало высокую протективность препарата РЖКВ, превосходящую защитную активность коммерческого препарата АКДС серии С1252/ААП/15 НПО «Микроген». Препарат РЖКВ, согласно критериям, применяемым для ЦКВ, может быть использован для иммунизации мышей в дозе 0,15 КОЕ. Полученный нами результат является тем более убедительным после оценки количества коклюшных микробных клеток, выявленных в легких мышей через час после иммунизации РЖКВ. По-видимому, реальная доза живых рекомбинантных бактерий *V. pertussis* 4МКС, формирующая иммунный ответ при интраназальном введении, в сотни (100-1000) раз меньше, чем инактивированных вирулентных бактерий *V. pertussis* в составе АКДС вакцины, вводимой парентерально. Аналогичные результаты описаны нами ранее для генетически аттенуированных бактерий, сконструированных на основе других реципиентов *V. pertussis* [5].

Результаты сравнительного определения защитной активности аттенуированных бактерий *V. pertussis* 4МКС в составе РЖКВ, содержащих новый генотип ptxP3, и изогенных бактерий *V. pertussis* 4М генотипа ptxP1 выявили тенденцию увеличения защитной активности у бактерий *V. pertussis* 4МКС. Действительно, на фоне некоторого общего снижения выживаемости с уменьшением количества МЕ в иммунизирующей дозе выживаемость мышей в пределах 60% обеспечивается дозой, равной 0,15 МЕ для штамма *V. pertussis* 4М (ptx P1) и 0,03 МЕ — *V. pertussis* 4МКС (ptx P3). Этот результат, скорее всего, указывает на то, что пороговая 70% выживаемость мышей после интрацеребрального заражения обеспечивается достоверно меньшей иммунизирующей дозой аттенуированных бактерий *V. pertussis* 4МКС. Следует понимать, однако, что защитная активность аттенуированных бактерий *V. pertussis* является интегральной характеристикой и 2—3-кратное увеличение уровня продукции одного, пусть даже и самого важного, протективного антигена КТ*, может быть недостаточным для значительного усиления защитной активности, измеряемой в мышинной модели. Более полное заключение о потенциале защитной активности рекомбинантных аттенуированных бактерий *V. pertussis* 4МКС в сравнении с изогенными бактериями *V. pertussis* 4М довакцинного генотипа ptx P можно сделать после сравнительного анализа защитной активности нескольких экспериментальных серий РЖКВ и *V. pertussis* 4М, определенных в тестах интрацеребрального и интраназального заражения. Таким образом, препарат РЖКВ интраназального применения обладал защитной активностью, превосходящую таковую у вакцины АКДС в тесте интрацеребрального заражения иммунизированных мышей вирулентными бактериями *V. pertussis* 18323.

Особый интерес представляет определение защитной активности РЖКВ интраназального применения по выживаемости мышей зараженных интраназально вирулентными бактериями. Такой тест в максимальной степени приближен к е-

тественному заражению людей при коклюшной инфекции, но в литературе не описан. Описанные в литературе результаты определения вирулентности бактерий рода *Bordetella* при экспериментальном интраназальном заражении мышей немногочисленны, не содержат описания процедуры инокуляции бактерий, и с нашей точки зрения не могут быть экстраполированы на условия наших экспериментов. Анализ литературы показывает, что разные штаммы бактерий рода *Bordetella* имеют большой разброс значений ЛД₅₀ при интраназальном заражении мышей [7, 8], что связано, вероятно, как со свойствами самих бактерий, так и с используемыми линиями мышей, зависит от способа заражения и учета количества бактерий *Bordetella* в инфицирующей дозе. Так, например, для бактерий *B. bronchiseptica* RB50 ЛД₅₀ составляет около 10⁷, а для *B. bronchiseptica* 253 — около 10⁶ на мышах линии C57BL/6 [7,8]. Поэтому изучению защитной активности РЖКВ в тесте экспериментальной интраназальной инфекции мышей вирулентными бактериями *B. pertussis* 475, *B. bronchiseptica* 8220-17, *B. bronchiseptica* 8220 в наших экспериментах предшествовало определение их вирулентности (ЛД₅₀) на нативных лабораторных мышах Balb/C1. Приведенные в работе результаты показывают, что использованные нами штаммы имели высокую степень вирулентности, вызывающую гибель интраназально инфицированных мышей в дозах равных или меньше 10⁶ м.к., регистрируемых в легких через час после заражения. Также как и в экспериментах с аттенуированными бактериями *B. pertussis*, наблюдали разницу в количестве интраназально инокулированных и зарегистрированных в легких мышей бактерий сразу после инфицирования.

Интраназальное заражение лабораторных мышей бактериями *B. pertussis* 475, *B. bronchiseptica* 8220-17, *B. bronchiseptica* 8220 и *B. parapertussis* 504 приводило к развитию легочной инфекции и гибели животных в первые 17 дней. У выживших особей наблюдали значительную потерю массы тела, изменение шерстяного покрова и нарушение двигательной активности. Необходимо отметить, что использованные для анализа природные и рекомбинантные бактерии рода *Bordetella* отличались продукцией коклюшного токсина. Бактерии *B. pertussis* 475, *B. bronchiseptica* 8220-17 продуцировали нативный КТ, а у *B. bronchiseptica* 8220 и *B. parapertussis* 504 синтез КТ отсутствовал. Тем не менее, мыши, инфицированные всеми использованными штаммами, погибали примерно в одни и те же сроки с характерными клиническими проявлениями заболевания. Общей для всех изученных штаммов *Bordetella* была способность продуцировать аденилатциклазный токсин, дермонекротический токсин, гемагглютинин, пертактин и другие факторы вирулентности. В настоящее время роль каждого из перечисленных факторов вирулентности в патогенезе коклюша изучена недостаточно. Наиболее вероятно, гибель мышей в первые дни после инфекции была обусловлена действием ДНТ. В пользу такого предположения говорят результаты определения остаточной вирулентности, специфической и общей токсичности аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS [6]. Они не проявляли токсических свойств даже при интраназальном введении 10¹⁰ МЕ суспензии мышатам, крысам и взрослым мышам и отличались от вирулентных бактерий *B. pertussis* 475, *B. bronchiseptica* 8220-17, *B. parapertussis* 504 и *B. bronchiseptica* 8220 — отсутствием продукции ДНТ и активного КТ. Таким образом, по-видимому, гибель мышей, инфицированных перечисленными штаммами бактериями рода *Bordetella*, по крайней мере, отчасти обусловлена действием ДНТ на легкие животных.

Основываясь на значениях ЛД₅₀ бактерий *B. pertussis* 475, *B. bronchiseptica* 8220-17, *B. bronchiseptica* 8220 и *B. parapertussis* 504, нами определены заражающие летальные дозы, составляющие (7-12) ЛД₅₀ для определения защитной активности

РЖКВ. Такие исследования представляют интерес как для определения защитного потенциала коклюшных вакцин против близкородственных микроорганизмов, так и для выбора оптимального штамма для тестирования эффективности препаратов. Полученные нами результаты показали, что интраназальная иммунизация РЖКВ защищает мышей от интраназальной инфекции вирулентными бактериями возбудителя бронхосептикоза у животных (*B. bronchiseptica*), паракоклюша (*B. parapertussis*) и коклюша (*B. pertussis*). Показана защитная активность РЖКВ после экспериментальной инфекции мышей вирулентными бактериями *B. pertussis* 475. Этот результат совпадает с выводами аналогичных исследований [10 — 12] и вполне ожидаем, поскольку бактерии рода *Bordetella* близки друг к другу по структуре и последовательности геномов, продукции большого числа общих факторов вирулентности. Они имеют одинаковую регуляцию экспрессии основных генов вирулентности, а бактерии *B. pertussis* и *B. parapertussis* эволюционировали из разных клонов *B. bronchiseptica* [15]. Менее предсказуема выявленная нами защитная активность коммерческого препарата АКДС от интраназального заражения мышей бактериями *B. pertussis*. Этот результат совпадает с результатами тестирования бактериальной нагрузки в носоглотке вакцинированных ЦКВ павианов анубис после их экспериментального заражения вирулентными бактериями возбудителя коклюша. В работе [16] продемонстрирована ускоренная по отношению к невакцинированным животным элиминация бактерий у обезьян, инъекционно вакцинированных ЦКВ.

Зависимость защитной активности от вакцинирующей дозы в наших экспериментах качественно не отличаются при использовании внутримозговом заражении мышей бактериями *B. pertussis* 18323 и их интраназального заражения вирулентными бактериями рода *Bordetella*. Однако были выявлены некоторые количественные отличия. В тесте интраназального заражения бактериями *B. pertussis* 475, *B. parapertussis* 504 и *B. bronchiseptica* 8220-17 защита животных не менее 70% обеспечивалась при иммунизации дозой аттенуированных бактерий *B. pertussis* равной 3×10^7 МЕ в 5 раз меньшей, чем в тесте внутримозгового заражения мышей *B. pertussis* 18323. Процент выживаемости мышей, иммунизированных коммерческим препаратом АКДС вакцины, был выше по сравнению с внутримозговым заражением *B. pertussis* 18323, но более низкий, чем у РЖКВ в обоих этих тестах. Эти результаты согласуются с предположением о способности ЦКВ при парентеральном введении индуцировать некоторый мукозальный иммунный ответ, продемонстрированный недавно в экспериментах с приматами [16].

Так как ДНТ, с одной стороны, согласно существующим представлениям, не является протективным антигеном, а с другой стороны, не синтезируется аттенуированными бактериями *B. pertussis*, справедливо предположить, что высокий уровень защиты мышей после интраназальной иммунизации обеспечивается мукозальной, а не антитоксической составляющей противокклюшного иммунного ответа, защищающего на стадии адгезии и инвазии. Этот вывод согласуется с результатами сравнительного измерения защитной активности в тестах внутримозгового заражения *B. pertussis* 18323 и интраназального заражения. Защита мышей не менее 70% от интраназального инфицирования обеспечивалась иммунизирующей дозой аттенуированных бактерий *B. pertussis* в 5 раз меньшей, чем при использовании теста внутримозгового заражения. Таким образом, предлагаемая нами модель интраназального заражения для оценки защитной активности РЖКВ позволяет определять противобактерийную мукозальную составляющую поствакцинального противокклюшного иммунитета. Более детальное изучение корреляции результатов интраназального и внутримозгового заражения мышей, иммунизированных разными коклюшными

вакцинами, позволит определить применимость предложенной экспериментальной модели. В наших экспериментах не было выявлено существенной разницы в результатах тестирования РЖКВ, полученных при использовании бактерий *B. pertussis* 475, *B. parapertussis* 504 и *B. bronchiseptica* 8220-17. Если этот результат подтвердится в последующих экспериментах, предлагаемый тест и сконструированные нами рекомбинантные бактерии *B. bronchiseptica* 8220-17 могут быть хорошей альтернативой используемому в настоящее время трудоемкому, требующему достаточно высокой квалификации методу внутримозгового заражения мышей прихотливыми, медленно растущими, требующими стандартных сред с добавлением крови бактериями *B. pertussis* 18323. Представленные результаты показали, что препарат РЖКВ интраназального применения защищал мышей от инфицирования вирулентными бактериями других патогенных для человека видов рода *Bordetella*. Наши результаты согласуются с данными доклинического изучения аттенуированных бактерий *B. pertussis* BPZE1, сконструированных французскими исследователями [11,13] и позволяют констатировать, что разработанная кандидатная рекомбинантная живая коклюшная вакцина будет защищать не только от коклюша, но и паракоклюша и бронхосептикоза.

Исследования последнего десятилетия в разных странах, в том числе и в России, показали, что в настоящее время на фоне массовой вакцинации против коклюша штаммы циркулирующих бактерий *B. pertussis* содержат измененные последовательности генов вирулентности — *ptx*, *fga*, *prn*, отличающиеся от таковых в довакцинальном периоде. Высказываются предположения, что одна из причин роста заболеваемости коклюшем связана с циркуляцией возбудителя с новыми генотипами [1, 6, 14]. Для совершенствования современных коклюшных вакцин рассматривается возможность замены вакцинных штаммов довакцинного генотипа на новые, относящиеся к современным генотипам. Рекомбинантные бактерии *B. pertussis* 4MKS с новым генотипом *ptxP3*, сконструированные на основе изогенных аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4M довакцинного генотипа *ptxP1*, сохраняют стабильность генома и заданные биологические характеристики, продуцируют большее количество токсоида [4,6]. Представленные в настоящем сообщении результаты позволяют констатировать, что регуляторная мутация в опероне *ptxP1*, увеличивающая экспрессию оперона *ptx*, привела к усилению защитной активности аттенуированных бактерий *B. pertussis*. Разработанная нами генетическая методология может быть использована для необходимой модификации бактерий *B. pertussis* довакцинных генотипов с целью создания вакцинных препаратов на основе регламентированных производственных штаммов. Использование предполагаемого подхода позволит своевременно реагировать на необходимость замены генотипов в вакцинных штаммах, согласно с превалированием новых генотипов в популяции *B. pertussis*, сэкономить время и средства на разработку эффективных препаратов для профилактики коклюша.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова О.Ю., Пименова А.С., Попова О.П. и др. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 4:22-27.
2. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Синяшина Л.Н. и др. Выявление инсерционных авирулентных *Bvg*- мутантов *Bordetella pertussis* у больных коклюшем, острой респираторной вирусной инфекцией и у практически здоровых людей. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2010, 4:9-13.
3. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунологические лекарственные препараты) под ред. А. Н. Миронова. М., 2012.

4. Семин Е. Г., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю. и др. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа рtхР3. Журн. микробиол. 2018, 4:33-42
5. Синяшина Л.Н., Синяшина Л.С., Семин Е.Г. и др. Конструирование генетически аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis*, утративших активность дермонекротического токсина и продуцирующих измененную нетоксичную форму коклюшного токсина. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2010, 3:31-36.
6. Синяшина Л.Н. Молекулярно-генетическая модификация бактерий рода *Bordetella* для создания рекомбинантных препаратов для профилактики коклюша. Дисс. докт. мед. наук, М., 2017.
7. Ahuja U., Liu M., Tomida S. et al. Phenotypic and Genomic Analysis of Hyper virulent Human-associated *Bordetella bronchiseptica*. BMC Microbiol. 2012, 6 (12):167 doi: 10.1186/1471-2180-12-167.
8. Buboltz A.M., Nicholson T.L., Parette M.L. et al. Replacement of Adenylate Cyclase Toxin in a Lineage of *Bordetella bronchiseptica*. J. Bacteriol. 2008, 190(15):5502-5511.
9. Carbonetti N.H., Wirsing von Kunig C. H., Lan R. et al. Highlights of the 11th International *Bordetella* Symposium: from Basic Biology to Vaccine Development. Clinical and Vaccine Immunology. 2016, 23(11) :842-850.
10. Feunou P.F., Bertout J., Lochet C. T- and B-cell-mediated protection induced by novel, live attenuated pertussis vaccine in mice. Cross protection against parapertussis. PLoS One. 2010, 15; 5(4):e10178. doi: 10.1371/journal.pone. 0010178.
11. Kammoun H., Feunou P.F., Foligne B. et al. Dual mechanism of protection by live attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 against *Bordetella bronchiseptica* in mice. Vaccine. 2012, 31; 30(40): 5864-5870. doi: 10.1016/j.
12. Liko J., Robison S.G., Cieslak P.R. Do Pertussis Vaccines Protect Against *Bordetella parapertussis*? Clin Infect Dis. 2017, 64(12):1795-1797. doi: 10.1093/cid/cix221.
13. Mielcarek N., Debrie A.S., Raze D. et al. Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. PLoS Pathog. 2006, 2(7) :0662-0670.
14. Mooi F.R. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. Infect. Genet. Evol. 2010, 10 (1) :36-49.
15. Park J., Zhang Y., Buboltz A. M. et al. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. BMC Genomics. 2012, 13:545.
16. Warfel J. M., Zimmerman L.I., Merkel Tod J. Comparison of Three Whole-Cell Pertussis Vaccines in the Baboon Model of Pertussis. Clin. Vaccine Immunol. 2015, 11;23(1):47-54. doi: 10.1128/CVI.00449-15.
17. World Health Organization 2011. Expert committee on biological standardization Geneva, 17-21 October 2011.

Поступила 14.11.18

Контактная информация: Синяшина Л.Н.,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (495)193-30-01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.В.Сорокина^{1,2}, Н.К.Ахматова¹, Н.Б.Егорова¹

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ФИГУРНЫХ И ПАРАИНФЕКЦИОННЫХ ЭРИТЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И MNRI

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Академия постдипломного образования ФНЦ ФМБА России, Москва

Цель. Углубленное изучение этиопатогенеза эритем, сравнительное изучение клинической эффективности применения комбинированной терапии с применением иммуномодуляторов при эритемах, изучение динамики иммунологических показателей в результате терапии. *Материалы*

и методы. Обследованы 215 взрослых пациентов с эритемами. Перед началом лечения и через 1,5 месяца после терапии у больных были изучены: экспрессия TLRs на МЛПК и клетках кожи, субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови (e-Bioscience, США) и цитокиновый статус (FlowCytomix Human Th1/Th2 11 plex, BenderMedSystems, Австрия) методом проточной цитометрии (Cytomux FC-500 Beckman Coulter, США); уровень IgG, IgM, IgA в сыворотке крови (ИФА). *Результаты.* Показана этиопатогенетическая и диагностическая значимость вирусов семейства Herpesviridae, установлена бактериальная контаминация разными видами микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *Proteus vulgaris*). Препарат, содержащий антигены условно патогенных микроорганизмов, а также включение и метода нейросенсомоторной интеграции рефлексов (MNRI) способствовала снижению числа и тяжести рецидивов эритем, расширению спектра экспрессируемых Toll-подобных рецепторов; повышению лимфоцитов с иммунофенотипом CD3+, CD4+, CD25+, CD95+; повышению IFN- γ , снижению IL-4; в большей степени снижал уровень общего IgE, чем другие виды терапии. *Заключение.* Включение в терапию больных эритемами иммуномодулятора микробного происхождения и MNRI способствует повышению клинической эффективности и коррелирует с коррекцией иммунологических нарушений.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 69—76

Ключевые слова: эритемы, многоформная эритема, фиксированная эритема, мигрирующая эритема, кольцевидная центробежная эритема, Toll-подобные рецепторы, поликомпонентная вакцина, MNRI

E.V.Sorokina^{1,2}, *N.K.Akhmatova*¹, *N.B.Egorova*¹

EFFICIENCY OF COMBINED THERAPY OF FIGURATUM AND PARAINFECTIOUS ERYTHEMAS WITH THE USE OF IMMUNOMODULATORS OF DIFFERENT ORIGINS AND MNRI

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Academy of Postgraduate Education of FMBA, Moscow, Russia

The aim of the study was to study the etiopathogenesis of erythema, comparative study of the clinical efficacy of combination therapy with the use of immunomodulators in erythema, the study of the dynamics of immunological parameters as a result of therapy. *Materials and methods.* The study included 215 adult patients with erythema. Before treatment and 1.5 months after therapy in patients have been studied: the expression of TLRs on MLPC and skin cells by flow cytometry with the use of the mat for TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 (Caltag Laboratories, USA) using a flow cytometer FC-500 (Beckman Coulter, USA); the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes; the levels of pro-inflammatory and regulatory cytokines in the serum by the method of solid-phase ELISA using test systems company «Biosource» (Austria); the main classes of immunoglobulins (IgG, IgM, IgA) in serum. *Results.* It was shown that these pathogenetic and diagnostic significance of viruses of the family herpesviridae, bacterial contamination by different types of microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *Proteus vulgaris*). A substance containing antigens of conditionally pathogenic microorganisms, and the use of neuro sensorimotor reflex integration (MNRI) contributed to the decline in the number and severity of recurrences of erythema, the extension of the range expressed Toll-like receptors; increase of lymphocytes with immunophenotype CD3+, CD4+, CD25+, CD95+; increase in IFN- γ , decreased IL-4; largely reduced the level of total IgE than other types of therapy. *Conclusion.* The inclusion in therapy of patients with erythema, immunomodulator of bacterial origin and MNRI promotes increase of clinical efficiency and correlates with the correction of immunological disorders.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 69—76

Key words: erythemas, erythema multiforme, fixed erythema, erythema migrans, erythema annular centrifugal, Toll-like receptors, polycomponent vaccine, MNRI

ВВЕДЕНИЕ

Фигурные эритемы составляют многочисленную группу в составе дерматологических заболеваний воспалительного характера. В последние десятилетия отмечается рост частоты тяжелых, хронических, торпидных форм эритем, склонных к рецидивированию. Ведущую роль в этиопатогенезе эритем играют инфекционные агенты, с формированием инфекционно-аллергического генеза заболевания [2,4,7]. Триггерными факторами при фигурных эритемах могут выступать вирусные, бактериальные и грибковые агенты [8]. Поэтому алгоритм лечебных мероприятий при эритемах наряду с симптоматической терапией должен включать выявление и устранение триггерных факторов. Выявление при комплексном клинико-иммунологическом изучении морфологических и функциональных нарушений в системе иммунитета позволяет патогенетически обосновать необходимость и направленность терапии при эритемах. Возможность коррекции выявленных нарушений с помощью микробных антигенов представляет большой практический интерес для оптимизации терапии. Имеющиеся данные о механизме и эффекте действия иммуномодуляторов микробного происхождения позволяют определить стратегию их дифференцированного применения в дерматологии при различных иммунопатологических состояниях [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Иммунологические исследования включали изучение экспрессии TLRs на МЛПК и кератиноцитах в очагах методом проточной цитометрии с применением МАТ к TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 (e-Biosciences, США) с использованием проточного цитометра Cytomix FC-500 (Beckman Culter, США). Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови определяли методом проточной цитометрии, концентрации свободных цитокинов в сыворотках/плазме/супернатантах МЛПК крови при помощи цитометрической тест-системы FlowCytomix Human Th1/Th2 11 plex с использованием МАТ к цитокинам (GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α) (BenderMedSystems, Австрия). Статистическую обработку результатов проводили в рамках параметрической и непараметрической базовой статистики с использованием t-критерия Стьюдента, U-критерия Mann-Whitney, критерия Wilcoxon, применяя стандартный пакет статистических программ Windows 7 (StatSoft 7.0), Excel и WinMdi. Различия рассматривались как значимые при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Под наблюдением находились 215 больных эритемами (88 больных многоформной экссудативной эритемой — МЭЭ, 71 больной фиксированной эритемой — ФЭ, 39 больных мигрирующей эритемой — МЭ и 19 больных эритемой кольцевидной центробежной — ЭКЦ). Всем больным до лечения и через 1,5 месяца после терапии были проведены клиническое, вирусологическое, бактериологическое и иммунологическое исследования.

Проведение ПЦР-диагностики у больных МЭЭ выявило у 44,32%/39 больных ДНК ВПГ1; ДНК ВПГ2 — у 9,1%/8 больных; ДНК ВЭБ — у 18,18%/16 больных; ДНК ВГЧ-6 — у 7,95%/7 больных (включая вирусные ассоциации); у 3,4%/3 больных — ВГЧ-7. Исследование уровня специфических антител к ВПГ1, ВПГ2 и ВГЧ-6 у больных МЭЭ выявило высокие титры IgG-анти HSV1 и IgG-анти HSV2 (400-800 Ед/мл) у 25%/22 и 3,41%/3 больных соответственно; IgG-анти HHV-6 — у 1,14%/1

больного. У больных МЭЭ выявили также антитела к капсидному антигену ВЭБ (IgM-анти VCA EBV) у 15,91%/14 больных. Серопозитивность к раннему антигену ВЭБ (IgG-анти EA EBV) обнаружена у 5,68%/5 больных. Антитела к ядерному антигену (IgG-анти EBNA) к ВЭБ выявлены у 96,14%/85 больных. Наличие у больных МЭЭ одновременно положительных титров антител к раннему (IgG-анти EA EBV) и капсидному (IgM-анти VCA EBV) (5 больных) антигенам на фоне выявления ДНК ВЭБ в слюне является основанием для регистрирования у этих больных реактивации хронической ВЭБ-инфекции, которая в этих случаях (5,7%/5) выступала в роли триггерного фактора для развития рецидивов МЭЭ, и вероятно, для ее первичной манифестации. Согласно полученным данным, ВПГ1, ВПГ2 играли роль триггерных факторов в патогенезе МЭЭ у 72,72%. Нередко рецидивам МЭЭ предшествовали обострения хронических воспалительных заболеваний ЛОР-органов (12,5%/11 больных). У большинства больных ФЭ выявлена бактериальная контаминация (*S. aureus* у 26,76%, *Klebsiella pneumoniae* у 11,26%, *Streptococcus spp.* у 8,45%, *Proteus vulgaris* у 7,04% больных), определившая необходимость применения этиотропных препаратов, среди которых ранее преимущественно назначались сульфаниламидные препараты (45,07% случаев). Обострения ХВЗ ЛОР-органов и органов дыхания и их терапия предшествовали развитию ФЭ у 25,35%/18 больных. При анализе данных, полученных в ходе вирусологических исследований у больных ЭКЦ, вирусы семейства *Herpesviridae* идентифицированы у 15 больных. Исследование сыворотки крови у этих больных методом ИФА выявило титры IgG-анти EA EBV у 12 больных, IgM-анти VCA EBV у 13 больных. Наличие антител к раннему, капсидному и ядерному антигенам (IgG-анти EA, IgM-анти VCA, IgG-анти EBNA) ВЭБ на фоне позитивных ответов ПЦР наблюдали у 63,16%/12 больных в период рецидива ЭКЦ, что является основанием для регистрирования у этих больных реактивации хронической ВЭБ-инфекции. У 5 больных эти показатели сочетались с лимфаденопатией группы заднешейных лимфоузлов, увеличением глоточных миндалин, наличием в общеклиническом анализе крови повышения СОЭ, моноцитоза. У 2 больных ЭКЦ выявлены антитела IgM-анти HHV-6 в средних титрах, высокие титры IgG-анти HHV-6 на фоне позитивных ответов ПЦР. В этих случаях у больных можно говорить о реактивации инфекции, вызванной ВГЧ-6. Таким образом, в группе больных ЭКЦ триггерные факторы выявлены у 63,16%/12 больных, из которых у большинства в роли триггеров выступала активация хронической ВЭБ-инфекции – 52,63%/10 больных, у 10,53%/2 больных — реактивация ВЭБ и ВГЧ-6. У 36,84%/7 больных ЭКЦ триггерные факторы выявлены не были. При обследовании группы больных МЭ IgM к антигенам внешнего поверхностного белка (*OspA*) и компонента флагеллина (*p41*) *Borrelia burgdorferi* были обнаружены у 64,86%/24 больных, внешнего поверхностного белка (*OspC*) у 37,84%/14 больных, антитела IgG к пептидным антигенам (*p100*, *p39* и *p18*) у 24,32%/9, к антигену *VlsE* у 35,13%/13 больных. Продукция антител к *VlsE* в основном детектируется при IgG-ответе, часто раньше типичных IgG-маркеров (*p100*, *p39* и *p18*). Выявленные у 86,47%/32 больных IgM и IgG к флагеллину (*p41*) и пептидному антигену (*OspC*) отражают раннюю стадию заболевания.

Больные эритемами были ранжированы на группы в зависимости от проводимой терапии. Поликомпонентную вакцину ВП-4 (препарат 1) из антигенов условно патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* и *Escherichia coli*) получали 69 больных эритемами по схеме согласно инструкции по применению интраназально-подкожным методом на фоне базисной терапии. Противовирусный и иммуномодулирующий препарат, синтетический индуктор синтеза интерферона — натриевая соль сополимера (1→4) — 6-0-карбоксиметил-β-

D-глюкозы, (1→4)-β-D-глюкозы и (21→24)-2,3,14,15,21,24,29,32-октагидрокси-23-(карбоксиметоксиметил)-7,10-диметил-4,13-ди(2-пропил)-19,22,26,30,31-пентаоксагептацикло [23.3.2.216.20.05.28.08.27.09.18.012.17] дотриаконта-1,3,5(28),6,8(27),9(18),10,12(17),13,15-декаена (препарат 2) получали 46 больных по схеме в таблетках 24 мг 3 раза в день 5 дней, далее 7-дневными циклами 3 недели. Фитопрепарат, тетрагидроксиглюкопиранозилксантен, индуктор интерферона с противовирусным действием (препарат 3), применялся у 17 больных в таблетках по 100-200 мг 3-4 раза в сутки в течение 14-21 дня. 10 больных проходили обследование и лечение с использованием терапевтической программы «Нейро-сенсомоторная интеграция паттернов рефлексов» — MNRI (Masgutova Neuro-Sensory-Motor Reflex Integration). Данная программа включает в себя диагностическую часть и терапевтические процедуры [3,5,6].

Наиболее показательными при оценке клинического эффекта разных видов терапии по отдаленным результатам оказались снижение среднего балла, отражающего степень тяжести заболевания и число больных со стойкой клинической ремиссией. В результате применения ВП-4 (препарата 1) происходит существенное снижение ($p < 0,05$) тяжести течения рецидивов у больных МЭЭ и ФЭ до $6,05 \pm 0,8$ и $1,62 \pm 2,0$ баллов, соответственно; в группах больных МЭ и ЭКЦ до $1,57 \pm 2,7$ и $1,1 \pm 0,4$ ($p > 0,05$). Терапия индуктором интерферона (препарат 2) снижала СБ у больных МЭЭ, ФЭ и ЭКЦ до $7,35 \pm 0,9$; $3,4 \pm 3,5$ и $1,31 \pm 0,95$ ($p > 0,05$), соответственно. Базисная терапия снизила СБ только в группе МЭ до $1,83 \pm 1,97$ ($p > 0,05$). Среди больных, получавших иммунотерапию препаратом 1, стойкая клиническая ремиссия была достигнута у всех 100% больных МЭ, в 84,6% случаев ФЭ, 45,45% МЭЭ и у 28,57% больных ЭКЦ. В результате терапии препаратом 2 ремиссия наблюдалась в течение 2 лет у 65% ФЭ, 15% МЭЭ и 16,67% больных ЭКЦ. Базисная терапия вызвала стойкую ремиссию в 100% МЭ и 52% случаев ФЭ, при МЭЭ и ЭКЦ стойкая ремиссия не была зарегистрирована. Препарат 3, применявшийся в группе МЭЭ, вызывал стойкую ремиссию у 17,64% больных. Значительное клиническое улучшение при терапии ФЭ было достигнуто у 15,4% больных, получавших препарат 1, у 25% больных в группе, получавшей препарат 2, и у 36% больных при применении базисной терапии. В группах больных МЭЭ, получавших иммунотерапию, достоверных отличий по числу больных со значительным клиническим улучшением не наблюдалось: этот показатель составил 36,36%, 40%, 35,29% больных в результате применения препаратов 1, 2 и 3, соответственно. Число больных, у которых было достигнуто значительное клиническое улучшение в результате базисной терапии, составило 22,22%. Таким образом, в результате всех видов терапии стойкая клиническая ремиссия была достигнута у 49,77% больных эритемами (в результате терапии препаратом 1 — у 69,56%, препаратом 2 — у 36,96%, препаратом 3 — у 17,64%, MNRI — у 27,27%, базисной терапии — у 50% больных). Значительное число больных с клинической ремиссией в результате базисной терапии объясняется в основном за счет больных МЭ.

После терапии ВП-4 ВПГ1 и ВЭБ выделяли у 18,18% больных, другие вирусы обнаружены не были. После терапии препаратом 2 выделены ВПГ1 и ВПГ2 у 20%, тогда как ВПГ1 при базисной терапии — у 27,8% больных. Антигены ВГЧ-6 и ВГЧ-7 были обнаружены только в группах, получавших терапию базисными препаратами и препаратом 3. У больных ФЭ после терапии также наблюдали достоверное снижение частоты выявления инфекционных агентов. Установлено снижение частоты выявления вирусных антигенов (ВЭБ с 5,63% до 2,81% больных, ВПГ1 с 18,31% до 11,26% и менее активно ВГЧ-6 и ВГЧ-7), меньшая степень колонизации носоглотки *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *Proteus vulgaris*.

Снижение этих показателей наблюдалось в основном за счет больных в группе, получавшей ВП-4.

Терапия с применением ВП-4 вызывала расширение спектра экспрессируемых TLRs (TLR2, TLR4, TLR3, TLR9) на МЛПК, клетках кожи и эпителиальных клетках (TLR2, TLR4, TLR3, TLR9, TLR8) у больных МЭЭ, ФЭ, ЭКЦ. Отмечалось увеличение числа МЛПК, экспрессирующих TLR4,3,9 (до $22,3 \pm 5,9$; $69,2 \pm 3,6$; $48,4 \pm 5,5$)% и повышение экспрессии на клетках кожи TLR2,4,3,9 до ($10,9 \pm 2,5$, $26,3 \pm 4,2$, $38,2 \pm 3,6$, $18,4 \pm 2,2$)% на фоне снижения TLR8 ($40,6 \pm 4,1$)% и отсутствия влияния на экспрессию TLR7. В результате применения препарата 1 при ФЭ существенно возрос уровень TLR3 (с $24,5 \pm 4,7$ до $73,6 \pm 3,4$)%, TLR4 (с $6,6 \pm 2,2$ до $20,2 \pm 3,2$)%, TLR9 (с $22,2 \pm 4,5$ до $51,9 \pm 4,8$)%. При ЭКЦ наиболее выраженное повышение экспрессии TLRs на МЛПК отмечалось в отношении TLR3 ($35,94 \pm 3,7$ % до лечения, $48,3 \pm 5,8$ % после лечения), ($p < 0,05$), экспрессия TLR9 в результате иммунотерапии повышалась с $26,9 \pm 5,5$ до $39,9 \pm 6,6$ %, ($p < 0,05$), экспрессия TLR2 повысилась с $9,6 \pm 1,5$ до $18,6 \pm 2,1$ %, ($p < 0,05$). На клетках кожи при ЭКЦ в результате применения препарата 1 отмечали значимую экспрессию TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 ($18,6 \pm 2,1$; $20,1 \pm 3,7$; $17,5 \pm 1,3$; $17,8 \pm 5,4$)% по сравнению с уровнем этих показателей до терапии ($p < 0,05$).

Применение индуктора интерферона (препарат 2) у больных МЭЭ вызывает экспрессию TLR9 на МЛПК (до $53,0 \pm 0,45$ %), ($p < 0,05$), при ЭКЦ стимуляцию экспрессии TLR9 (с $26,9 \pm 5,5$ до $38,75 \pm 6,5$ %) ($p > 0,05$) и экспрессию TLR7 и TLR8 на клетках кожи (с $19,8 \pm 3,4$ и $54,9 \pm 6,2$ до $40,0 \pm 2,5$ и $83,1 \pm 4,2$)%, соответственно. Базисная терапия при МЭЭ снижала число клеток с экспрессией TLR3. При ФЭ применение препарата 2 и базисной терапии не вызвало динамики в экспрессии TLRs.

Исследование, таким образом, выявило наибольшую активность в отношении экспрессии TLRs, обеспечивающих первичное распознавание патогена и передачу сигналов управления иммунологическим процессом, препарата микробного происхождения (препарат 1), обладающего широким спектром лигандов PAMPs.

Комбинированная терапия с применением препарата 1 вызывала динамику в содержании субпопуляций лимфоцитов в виде повышения исходно низкого содержания субпопуляций CD95⁺ при всех эритемах до ($42,7 \pm 4,5$; $49,6 \pm 3,7$; $52,4 \pm 4,9$; $34,7 \pm 3,5$)% соответственно ($p < 0,05$), CD3⁺ в группах больных МЭЭ и ЭКЦ (с $54,3 \pm 4,2$ и $55,6 \pm 5,7$ до $68,8 \pm 3,7$ и $69,4 \pm 2,1$)%, $p < 0,05$) и CD25⁺ (с $5,7 \pm 1,5$ и $6,4 \pm 2,4$ до $10,6 \pm 1,7$ и $11,3 \pm 2,1$)%, $p < 0,05$). Другие методы терапии не вызывали динамики в содержании субпопуляций лимфоцитов при всех исследованных эритемах.

При изучении влияния терапии на цитокиновый профиль больных эритемами в ходе терапии выявлено, что наиболее выраженная динамика в уровне цитокинов в сыворотке крови наблюдалась в результате терапии препаратом 1. Повышалась концентрация IFN- γ при всех эритемах (с $37,9 \pm 5,8$; $17,0 \pm 1,3$; $19,2 \pm 3,1$; $46,2 \pm 6,0$ до $62,0 \pm 3,1$; $34,0 \pm 2,9$; $42,8 \pm 2,5$; $63,0 \pm 3,4$) пг/мл соответственно; IL-2 при ФЭ и ЭКЦ (с $11,5 \pm 1,9$ и $16,0 \pm 2,2$ до $17,2 \pm 2,5$ и $23,5 \pm 2,8$) пг/мл соответственно; IL-1b при ФЭ (с $11,2 \pm 1,0$ до $21,1 \pm 3,6$) пг/мл, ($p < 0,05$). Препарат 2 вызывал снижение уровня IL-1b до ($9,5 \pm 0,8$) пг/мл и повышение IL-2 до ($15,1 \pm 0,7$) пг/мл при МЭЭ ($p < 0,05$), у больных ФЭ повышал уровень IFN- γ (с $17,0 \pm 1,3$ до $25,4 \pm 3,5$) пг/мл, $p < 0,05$). Базисная терапия вызывала дальнейшее снижение IFN- γ при МЭЭ и ЭКЦ до ($24,6 \pm 3,0$ и $12,5 \pm 1,0$) пг/мл, $p < 0,05$), соответственно.

Цитокиновый профиль при всех исследованных эритемах был повышен в отношении IL-4. Этому цитокину принадлежит значительная роль в направлении увеличения продукции IgE В-лимфоцитами. При терапии препаратом 1 про-

исходило снижение уровня IL-4 в целом по группе с $13,9 \pm 1,1$ до $12,6 \pm 0,8$ пг/мл. Дифференцированно по отдельным эритемам его динамика показала, что снижение уровня IL-4 в сыворотке крови происходило в результате комбинированной терапии с применением препарата 1 у больных МЭ ($21,8 \pm 4,7$ до $12,1 \pm 3,5$) пг/мл, $p < 0,05$), у больных ФЭ с $12,9 \pm 0,7$ до $10,6 \pm 1,1$ пг/мл. У больных ЭКЦ препарат 1 и базисная терапия способствовали снижению исходно повышенной численности лимфоцитов, экспрессирующих IL-4 внутриклеточно (до $23,1 \pm 7,3$ и $15,2 \pm 4,2$)%, $p < 0,05$). Терапия препаратом 1 и MNRI вызывали снижение уровня IL-5 в сыворотке крови больных МЭЭ (с $17,5 \pm 0,7$ до $14,4 \pm 0,7$ и $11,3 \pm 2,1$) пг/мл соответственно ($p < 0,05$). Также у больных МЭЭ в результате терапии MNRI происходило снижение индуцированной продукции IL-5 (до $106,7 \pm 26,4$) пг/мл и IL-4 (до $94,9 \pm 7,6$) пг/мл. Препараты 1 и 2 у больных ЭКЦ повышали индуцированную численность клеток с экспрессией IFN- γ в 2,7 и 1,8 раза (до $46,2 \pm 3,6$ и $31,3 \pm 2,1$)% ($p < 0,05$), соответственно. Терапия препаратом 2 приводила к увеличению индуцированной численности IL-8-экспрессирующих клеток (до $22,8 \pm 6,0$)%. В группе больных ЭКЦ, получавших иммунотерапию, происходило повышение численности клеток с внутриклеточной экспрессией TNF- α после индукции ФГА до $(36,1 \pm 4,3)$ % и $(41,1 \pm 7,7)$ % соответственно.

Таким образом, в результате всех видов терапии повышается продукция IFN- γ при эритемах как в сыворотке, так и в результате индукции. Наибольшая индукция цитокинов отмечена в группе, получавшей препарат 1. Терапия вызывает снижение уровня IL-4 в сыворотке крови и его индуцированной продукции у больных эритемами.

При оценке гуморального звена иммунитета в результате терапии выявили, что повышение уровня IgA и IgM у больных МЭЭ (до $2,5 \pm 0,4$ и $3,3 \pm 0,4$) г/л и ЭКЦ (до $3,7 \pm 0,1$ и $2,1 \pm 0,03$) г/л, IgA у больных ФЭ вызывала только терапия с применением препарата 1 ($3,7 \pm 0,06$) г/л, соответственно, ($p < 0,05$). При МЭЭ терапия вызвала снижение уровня IgE (с $274,8 \pm 26,4$ до $106,7 \pm 29,3$; $98,6 \pm 17,4$; $124,2 \pm 26,8$) кЕ/л при терапии препаратами 1, 2 и базисными препаратами, у больных ФЭ (с $216,5 \pm 63,6$ до $63,4 \pm 4,8$; $88,2 \pm 6,6$) кЕ/л при терапии препаратами 1, 2 ($p < 0,05$). В группе больных МЭ в результате терапии отмечено снижение исходно высокого уровня общего IgE (с $187,8 \pm 28,4$ до $31,7 \pm 5,8$ и $64,7 \pm 4,9$) кЕ/л, $p < 0,05$). Выявленная динамика содержания IFN- γ и IL-4 свидетельствует о коррекции характерного для эритем дисбаланса в системе Th1/Th2-лимфоцитов в сторону увеличения роли Th1, что приводит к снижению уровня IgE, а также повышению уровня IgA (МЭЭ, ФЭ) и IgG (МЭЭ).

Таким образом, использованные методы лечения с применением иммуномодулирующих препаратов и методики MNRI оказались эффективными. Данные исследования демонстрируют, что больные ЭКЦ требуют особого подхода к оценке их нервно-эмоционального статуса. Все они склонны к вирусно-бактериальным инфекциям, аллергическим процессам. Это является отражением имеющихся у них изменений иммунного статуса, проявляющегося дефицитом клеточных и гуморальных иммунных реакций. Изменение иммунологических параметров у больных ЭКЦ можно считать одним из признаков данного заболевания и учитывать при лечении их обострений с рекомендацией проведения терапии нейро-сенсомоторной интеграции рефлексов как метода социальной и психологической реабилитации этой группы больных.

Как по клиническим показателям (достижению стойкой ремиссии, снижению балла, отражающего тяжесть течения заболевания), так и по иммунологическим показателям (экспрессии TLR3, коррекции в содержании субпопуляций лимфоцитов, спектру синтезируемых цитокинов, снижению общего IgE и увеличению IgA в

крови) лучшие результаты были при использовании препарата ВП-4 (препарат 1). Установлено, что использование иммуномодуляторов широкого спектра действия является необходимым условием достижения стойкого клинического эффекта при терапии исследованных эритем. Доказанная высокая эффективность препарата ВП-4 позволяет рекомендовать иммуномодуляторы широкого спектра действия на иммунную систему для включения в комплексную терапию больных фигурными эритемами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А. Иммунотерапевтическая концепция использования микробных антигенов при атопии и патологии, ассоциированной с условнопатогенной микрофлорой (на примере поликомпонентной вакцины Иммуовак ВП-4) // Медицинская иммунология. 2008, 10 (1):13-20.
2. Коренберг Э.И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегии их профилактики: изменение приоритетов. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013, 5:7-17.
3. Akhmatova N., Akhmatova E. Influence of MNRI on the Immune Status of Children with Down Syndrome. J. Clin. Cell Immunol. 2017, 8:483. doi: 10.4172/2155-9899.1000483. <https://www.omicsonline.org/peer-reviewed/influence-of-mnri-on-the-immune-status-of-children-with-down-syndromep-85149.html> <https://sciforschenonline.org/journals/neurology/JNNB-2-130.php>.
4. Kim K.J., Chang S.E., Choi J.H. et al. Clinicopathologic analysis of 66 cases of erythema annulare centrifugum. J. Dermatol. 2002, 29 (2):61-67.
5. Koberda J.L., Akhmatova N., Akhmatova E. et al. Masgutova Neurosensorimotor Reflex Integration (MNRI) Neuromodulation Technique induces Positive Brain Maps (QEEG) Changes. J. Neurol Neurobiol. 2016, 2(4): doi <http://dx.doi.org/10.16966/2379-7150.130>.
6. Masgutova S.K., Akhmatova N.K., Sadowska L. et al. Neurosensorimotor Reflex Integration for Autism: a New Therapy Modality Paradigm. J. Pediatr. Neurol. Disord. 2016, 2:107. doi: 10.4172/2572-5203.1000107. <https://www.omicsonline.org/open-access/neurosensorimotor-reflex-integration-for-autism-a-new-therapymodality-paradigm-.php?aid=81336>.
7. Pilar Garcia Muret M., Ramon M.P., Gimenez-Arnau A.M. et al. Annually recurring erythema annulare centrifugum: A distinct entity? J. Am. Acad. Dermatol. 2006, 54:1091-1095.
8. Wetter D.A., Davis M.D. Recurrent erythema multiforme: Clinical characteristics, etiologic associations, and treatment in a series of 48 patients at Mayo Clinic, 2000 to 2007. J. Am. Acad. Dermatol. 2010, 62(1):45-53.

Поступила 20.11.18

Контактная информация: Сорокина Екатерина Вячеславовна,
105064, Москва, пер. М.Казенный, 5а, р.т. (495)917-49-00

© Е.Н.ФИЛАТОВА, Л.А.СОЛНЦЕВ, 2019

Е.Н.Филатова, Л.А.Солнцев

СМЕШАННАЯ ТЕХНИКА ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИНФЕКЦИОННОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ ДЕКОМПОЗИЦИИ ВРЕМЕННОГО РЯДА И SARIMA

Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной

Цель. Оценить возможность применения смешанной техники прогнозирования инфекционной заболеваемости на основе методов декомпозиции временного ряда и SARIMA (decSARIMA). *Материалы и методы.* На примере 12 территориальных образований Приволжского федерального округа были проанализированы временные ряды уровня заболеваемости инфекционными пато-

логиями: геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС), острыми инфекциями верхних дыхательных путей (ОРВИ) и сифилисом. Декомпозицию временного ряда уровня заболеваемости проводили методом X13-ARIMA-SEATS. Выделяли тренд и сезонную компоненту, каждую из которых затем моделировали методом SARIMA. Итоговую модель уровня заболеваемости получали путем сложения моделей тренда и сезонной компоненты. *Результаты.* В среднем модели decSARIMA обладали более высокими или схожими характеристиками качества по сравнению с моделями SARIMA без предварительной декомпозиции. Прогнозные значения уровня заболеваемости, полученные методом decSARIMA, характеризовались более узким доверительным интервалом. Целесообразность применения моделей decSARIMA зависела от компонентного состава и динамики временного ряда уровня заболеваемости. Продemonстрировано значительное улучшение качества модели и прогноза уровня заболеваемости ГЛПС. При моделировании и прогнозе уровня заболеваемости ОРВИ и сифилисом включение этапа декомпозиции временного ряда в анализ признано нецелесообразным. *Заключение.* Применение модели decSARIMA позволяет значительно улучшить качество прогноза уровня заболеваемости инфекциями, для которых характерна выраженная сезонность и наличие межгодовых отличий уровня заболеваемости.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 76—83

Ключевые слова: сезонная декомпозиция, SARIMA, X13-ARIMA-SEATS, прогноз, ГЛПС, ОРВИ, сифилис

E.N.Filatova, L.A.Solntsev

MIXED INFECTIOUS DISEASE FORECASTING TECHNIQUE, BASED UPON SEASONAL DECOMPOSITION AND SARIMA

Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia

Aim. To study the possibility of using mixed technique for predicting infectious morbidity based on time series decomposition methods and SARIMA (decSARIMA). *Materials and methods.* Using the data from 12 regions of Volga Federal District (Russia) we analyzed time series of the incidence of infectious pathologies: hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), acute upper respiratory viral infection (ARVI) and syphilis. The decomposition of time series of the incidence rate was carried out using X13-ARIMA-SEATS method. The trend and the seasonal component were separated, each of which was then modeled separately by SARIMA method. The final model of the incidence rate was obtained by adding the trend and the seasonal models. *Results.* On average, decSARIMA models had higher or similar characteristics of model and prediction quality compared to SARIMA models without preliminary decomposition. The prognosis of the incidence rate obtained by decSARIMA method was characterized by narrower confidence intervals. Reasonability of using decSARIMA models depended on composition and dynamics of time series of the incidence rate. A significant improvement in model and prediction quality was demonstrated for HFRS. When modeling and predicting the incidence rate of ARVI and syphilis, the inclusion of decomposition of time series into the analysis was considered inexpedient. *Conclusion.* The usage of decSARIMA model allows to significantly improve the quality of the prognosis of the incidence for infections, which are characterized by pronounced seasonality and the presence of interannual differences in the incidence rate.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 76—83

Key words: seasonal decomposition, SARIMA, X13-ARIMA-SEATS, prognosis, HFRS, ARVI, syphilis

ВВЕДЕНИЕ

Мониторинг и прогноз заболеваемости является одним из важнейших элементов принятия стратегических решений в проведении санитарно-профилактических мероприятий. На сегодняшний день для моделирования эпидемических временных рядов широко применяется сезонная интегрированная модель авторегрессии — скользящего среднего (Seasonal Autoregressive integrated moving average models,

SARIMA, модель Бокса-Дженкинса). С применением SARIMA были получены модели и прогнозы заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом [10], лихорадкой Денге [13], туберкулезом [11], гепатитом А [12] и другими инфекциями [15]. Преимуществами метода SARIMA являются возможность работы с нестационарными временными рядами, учет изменений тренда, а также сезонных и стохастических колебаний ряда, пригодность для составления краткосрочных и долгосрочных прогнозов [1]. Недостатком метода является то, что идентификация моделей SARIMA субъективна и требует высокой квалификации исполнителя, хотя автоматизация процедуры значительно упрощает его применение [8].

Другое более серьезное ограничение применения SARIMA заключается в том, что метод учитывает только линейные закономерности изменения временного ряда [14]. В то же время, на уровень заболеваемости оказывают влияние многие факторы, среди которых климат, биология возбудителя и/или переносчика инфекционного агента, состояние иммунной системы реципиента, социальные отношения и другое. Сочетанное воздействие этих факторов может приводить к нелинейной динамике показателя, а следовательно, и возрастанию погрешности при использовании SARIMA для анализа и прогноза инфекционной заболеваемости [8, 15].

Улучшение качества прогноза возможно путем применения дополнительных процедур обработки временного ряда [1]. При анализе инфекционной заболеваемости популярным является применение методов сезонной декомпозиции [5, 15]. Как правило, при декомпозиции исходный ряд разделяют на тренд, сезонную и случайную компоненты. В определенном приближении можно сказать, что тренд характеризует многолетние изменения заболеваемости, сезонная компонента описывает ее закономерные колебания в пределах календарного года или квартала, а случайная компонента отражает нерегулярные колебания показателя [6]. Каждую составляющую компоненту временного ряда заболеваемости можно использовать для построения предсказательной модели, хотя случайная компонента, как правило, не учитывается [15]. При этом каждая компонента обладает своими отличительными характеристиками, влияющими на идентификацию модели. Вследствие этого ожидаемая точность модели, полученной с помощью декомпозиции, должна быть выше по сравнению с точностью модели, полученной при анализе исходного временного ряда. Как и алгоритм SARIMA, алгоритм декомпозиции временных рядов реализован в пакетах многих статистических программ, что позволяет проводить процедуру первичного анализа и прогнозирования уровня инфекционной заболеваемости в автоматизированном режиме.

Целью данной работы явилась оценка возможности применения смешанной техники прогнозирования инфекционной заболеваемости на основе методов декомпозиции временного ряда и SARIMA.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были проанализированы временные ряды уровня заболеваемости тремя инфекционными патологиями, актуальными для Российской Федерации: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГППС, код МКБ 10 - A98.5), острые инфекции верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации (ОРВИ, J06), сифилис (впервые выявленный) все формы (A50-A53). Данные о первичной заболеваемости для контингента «все жители» были получены из [3]. Использовали месячные значения на интервале 2010-2017 гг. для 12 территориальных образований Приволжского федерального округа (ПФО) в целом по региону и отдельно в регио-

нальной столице (всего 24 территории). Оренбургская область и республика Мордовия не были включены в исследование, поскольку для этих территорий отсутствовали некоторые данные о первичной заболеваемости за анализируемый период.

Алгоритм моделирования был реализован в виде скриптов на языках Python и R с использованием интегрированных сред разработки Spyder и RStudio. Построение модели уровня заболеваемости проводили в три этапа.

На первом этапе проводили декомпозицию временного ряда уровня заболеваемости с выделением тренда, сезонной и случайной компонент. Периодичность временного ряда принималась равной 12 месяцам. Процедура декомпозиции была выполнена с использованием метода X13-ARIMA-SEATS, разработанного Бюро переписи США (US Bureau of the Census, <http://www.census.gov/srd/www/x13as/>). Метод был реализован с применением функции `seas` пакета «seasonal» для языка R [4]. Контроль качества разложения осуществлялся путем применения статистических тестов Бокс-Льюнга на отсутствие автокорреляции остатков и теста Шапиро-Уилка на соответствие распределения остатков нормальному распределению. После декомпозиции проводили оценку динамики компонент и их численного вклада в уровень заболеваемости.

На втором этапе производили раздельное моделирование тренда и сезонной компоненты с применением SARIMA с периодом 12 месяцев. Этап алгоритма был реализован с использованием функции `auto.arima` пакета «forecast» для языка R [7]. Подбор оптимальных параметров модели осуществлялся автоматически в рамках работы функции на основании статистических тестов: тест Дирка-Фуллера для определения порядка интегрирования, тест Осборна для определения сезонности и информационного критерия Акаике для финального выбора модели. Контроль качества разложения осуществляется путем применения статистических тестов Бокс-Льюнга на отсутствие автокорреляции остатков и теста Харке-Бера на соответствие распределения остатков нормальному распределению.

На третьем этапе получали итоговую модель уровня заболеваемости путем сложения моделей тренда и сезонной компоненты. Расчет 95% доверительного интервала предсказанных значений также производили путем суммирования соответствующих значений для моделей тренда и сезонной компоненты. Моделирования случайной компоненты не производили.

Для каждой из 24 территорий оценивали возможность применения `decSARIMA` для построения модели и прогноза для трех исследуемых инфекций. В качестве обучающей выборки использовали данные о первичной заболеваемости за период 2010-2016 гг. без предварительной обработки. Для проверки прогностической способности получаемой модели использовали данные о первичной заболеваемости за 2017 г. Для оценки точности прогноза моделей применяли параметр средней абсолютной масштабируемой ошибки (MASE) [9], при этом в качестве наивного прогноза рассчитывали усредненные помесечные значения уровня заболеваемости.

Проводили сравнение прогнозирующей способности моделей, полученных методом `decSARIMA` и методом SARIMA без предварительной декомпозиции. Для этого для каждого заболевания рассчитывали значения ошибок MASE моделей `decSARIMA` и SARIMA для 24 исследуемых территорий. Далее с применением непараметрического критерия Манна-Уитни для каждого заболевания проводили сравнение двух распределений значений ошибок. Различия распределений ошибок MASE `decSARIMA` и ошибок MASE SARIMA с уровнем значимости $p < 0.05$ считали статистически значимыми. В тексте распределение значений MASE описывали с указанием медианы, 25 и 75 перцентилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были проанализированы временные ряды уровня заболеваемости тремя инфекционными патологиями на 24 территориях ПФО различного масштаба. Для каждой инфекции и каждой территории удалось построить предсказательную модель уровня заболеваемости как методом decSARIMA, так и методом SARIMA без предварительной декомпозиции. При построении моделей decSARIMA и проведении процедуры декомпозиции для различных инфекций были выявлены отличия динамики компонент временных рядов и их вклада в общий уровень заболеваемости. В среднем модели decSARIMA обладали более высокими или схожими характеристиками качества модели и прогноза по сравнению с моделями SARIMA. Медиана значений MASE для всех моделей decSARIMA составила 0,730 (0,555; 1,000), а для всех моделей SARIMA — 0,795 (0,593; 1,090). Также прогнозные значения уровня заболеваемости, полученные методом decSARIMA, характеризовались более узким доверительным интервалом. Преимущество, использования моделей decSARIMA зависело от компонентного состава и динамики компонент временного ряда уровня заболеваемости.

Так, в уровень заболеваемости ГЛПС большой вклад вносили как тренд, так и сезонная компонента. При этом тренд характеризовался наличием межгодовых вариаций с периодами спада и подъема значений. Нам не удалось выявить четко выраженную многолетнюю цикличность тренда, возможно, в связи с недостаточно длительным временным интервалом, использованном в исследовании. Также декомпозиция уровня заболеваемости ГЛПС позволила выделить четко выраженную и стабильную сезонную компоненту, что свидетельствует о наличии внутригодовой (сезонной) цикличности заболеваемости инфекцией. Модели заболеваемости ГЛПС, полученные методом decSARIMA, обладали более высокой точностью по сравнению с моделями SARIMA (рис. 1). При моделировании заболеваемости ГЛПС значение MASE моделей decSARIMA составило 0,822 (0,558; 1,221), а моделей SARIMA — 1,020 (0,832; 1,507). При этом распределения значений MASE моделей decSARIMA и SARIMA статистически значимо отличалось ($p=0,009$).

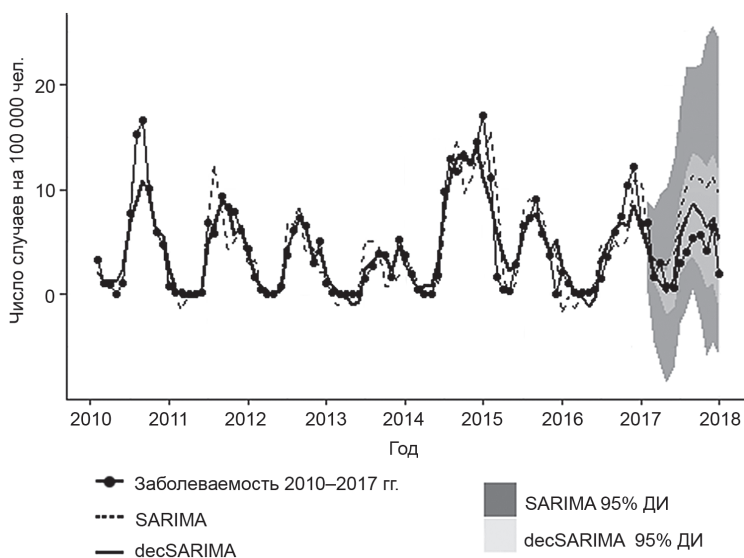


Рис.1 Моделирование и прогноз уровня заболеваемости ГЛПС на территории ПФО (на примере города Уфа).

Также как и в случае ГЛПС, существенный вклад в уровень заболеваемости ОРВИ вносили тренд и сезонная компонента. Сезонная компонента характеризовалась четкой внутригодовой цикличностью, в то время как межгодовых изменений уровня тренда выявить не удалось. В среднем значения тренда сохранялись на высоком, но постоянном уровне. При этом, хотя точность моделей decSARIMA в среднем превышала точность моделей SARIMA (значение MASE моделей decSARIMA составило 0,879 (0,708; 1,121), для моделей SARIMA — 0,931 (0,762; 1,169)) (рис. 2), статистически значимых различий между двумя распределениями MASE выявить не удалось ($p=0,204$).

При декомпозиции временного ряда уровня заболеваемости сифилисом нам не удалось выделить значимую сезонную компоненту. При этом был отмечен относительно весомый вклад случайной компоненты. Таким образом, в уровень заболеваемости сифилисом основной вклад вносили тренд (практически на всех территориях наблюдали нисходящий тренд) и случайная компонента. Применение декомпозиции не давало преимуществ при построении прогностической модели уровня заболеваемости сифилисом. Значение MASE моделей decSARIMA составило 0,586 (0,467; 0,713), а моделей SARIMA — 0,545 (0,447; 0,638). Статистически значимых отличий распределения значений MASE для моделей, построенных двумя методами, выявлено не было ($p=0,360$).

На основании полученных нами данных мы предполагаем, что применение смешанной техники прогнозирования инфекционной заболеваемости на основе методов декомпозиции временного ряда и SARIMA способно улучшить качество моделирования и прогноза уровня инфекционной заболеваемости некоторыми инфекциями. Прежде всего, это инфекции, для которых характерна выраженная сезонность и наличие межгодовых отличий уровня заболеваемости (изменения тренда). В этом случае применение декомпозиции и раздельное моделирование тренда и сезонной компоненты позволяет снизить ошибку модели и прогноза, а также сузить доверительный интервал прогноза.

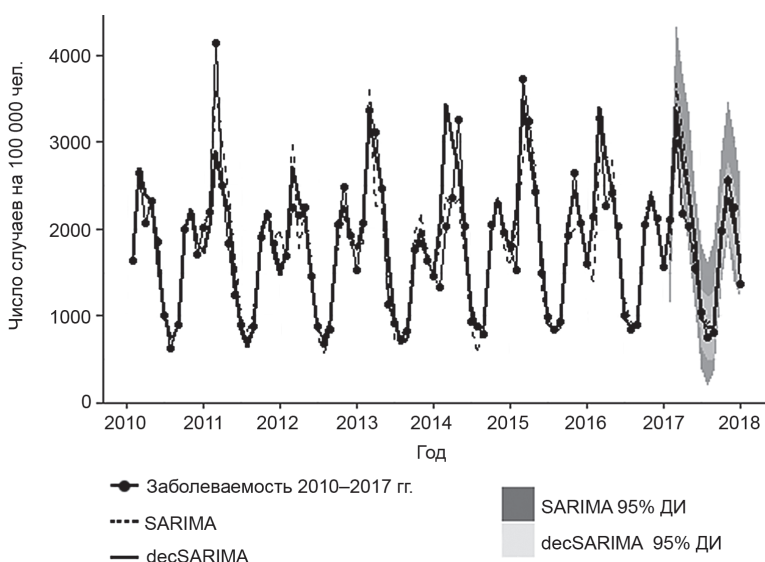


Рис.2. Моделирование и прогноз уровня заболеваемости ОРВИ на территории ПФО (на примере Республики Марий Эл).

Преимущества decSARIMA для моделирования заболеваемости такими инфекциями можно легко объяснить тем, что каждая составляющая временного ряда, полученная в ходе декомпозиции, имеет свои отличные характеристики. Следовательно, попытки описать все компоненты единой функцией неизбежно приведут к возникновению ошибок. Помимо статистического, можно предложить и биологическое обоснование необходимости отдельного моделирования компонент временного ряда заболеваемости, поскольку такой подход учитывает сложность и многофакторность эпидемического процесса.

В то же время, модель decSARIMA является сложной, поскольку представляет из себя сумму двух SARIMA моделей. Это приводит к затруднениям при подборе параметров модели. Определенным образом проблему можно решить за счет создания автоматических алгоритмов обработки данных, в том числе на основе уже имеющихся в широком доступе статистических программ и пакетов. Другим следствием сложности модели decSARIMA является повышенный риск переобучения модели («оверфиттинга»). Переобученные модели идеально описывают тестовую выборку, но дают прогноз с большой ошибкой. Следовательно, для инфекций, временной ряд уровня заболеваемости которыми не демонстрирует выраженную динамику тренда и сезонной компоненты, или они слабо выражены, или сильно выражена случайная компонента, усложнение модели отдельным моделированием тренда и сезонной компонент не дает преимуществ по сравнению с более простыми методами и не является целесообразным.

Следует также отметить, что процедура декомпозиции позволяет разделить исходный временной ряд заболеваемости на компоненты, отражающие различные с биологической точки зрения процессы. В то время, как тренд и случайная компонента характеризуют закономерные изменения показателя, случайная компонента, как правило, отражает непредсказуемые события, например, эпидемические вспышки. С этой точки зрения декомпозиция может рассматриваться как самостоятельный инструмент анализа эпидемического процесса и, в том числе, применяться для выявления сезонности заболевания и/или факторов, воздействующих на разные этапы его протекания [2].

Нами было показано, что применение смешанной техники прогнозирования инфекционной заболеваемости на основе методов декомпозиции временного ряда и SARIMA позволяет значительно улучшить качество прогноза уровня заболеваемости инфекциями, для которых характерна выраженная сезонность и наличие межгодовых отличий уровня заболеваемости. Для инфекций, у которых отсутствует хорошо выраженная внутригодовая и многолетняя цикличность уровня заболеваемости, применение сложной модели decSARIMA для моделирования и прогноза, хоть и представляет определенные преимущества, является нецелесообразным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондратьев М.А. Методы прогнозирования и модели распространения заболеваний. Компьютерные исследования и моделирование. 2013, 5(5):863-882.
2. Филатова Е.Н., Солнцев Л.А., Уткин О.В. Влияние сезонных факторов на динамику уровня заболеваемости инфекционным мононуклеозом в разных возрастных группах (на примере Нижнего Новгорода). Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017, 22(2): 79–85. doi: 10.18821/1560-9529-2017-22-2-79-85.
3. Эпидемиологический Атлас ПФО [Электронный ресурс]. <http://epid-atlas.nniiem.ru/>.
4. Barnett A.G., P.J. Baker P.J., Dobson A.J. Season: Analysing Seasonal Data R Functions. R Package Version 0.3-5. 2014, <http://www.seasonal.website/>.
5. Findley D.F., Martin D.E.K. Some Recent Developments and Directions in Seasonal Adjustment. Journal of Official Statistics. 2006, 21(2):343-365.
6. Hamilton J.D. Time Series Analysis. Cambridge Univ Pres, 1994.

7. Hyndman R. Forecast: Forecasting Functions for Time Series and Linear Models. R Package Version 8.2. 2017, <http://pkg.robjhyndman.com/forecast>.
8. Hyndman R.J., Khandakar Y. Automatic Time Series Forecasting: The Forecast Package for R. *Journal of Statistical Software*. 2008, 27(3). <https://www.jstatsoft.org/article/view/v027i03>. doi: 10.18637/jss.v027.i03.
9. Hyndman R.J., Koehler A.B. Another Look at Measures of Forecast Accuracy. *International Journal of Forecasting*. 2006, 22(4): 679-688. doi: 10.1016/j.ijforecast. 2006.03.001.
10. Li Q., Na-Na G., Zhan-Ying H. et al. Application of an Autoregressive Integrated Moving Average Model for Predicting the Incidence of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012, 87(2):364-370. doi: 10.4269/ajtmh. 2012.11-0472.
11. Rios M., Garcia J.M., Sánchez J.A., Pérez D. A Statistical Analysis of the Seasonality in Pulmonary Tuberculosis. *European Journal of Epidemiology*. 2000, 16(5):483-488.
12. Ture M., Kurt I. Comparison of Four Different Time Series Methods to Forecast Hepatitis A Virus Infection. *Expert Systems with Applications*. 2006, 31(1):41-46. doi: 10.1016/j.eswa.2005.09.002.
13. Wongkoon S., Jaroensutasinee M., Jaroensutasinee K. Development of Temporal Modeling for Prediction of Dengue Infection in Northeastern Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012, 5(3):249-252. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60034-0.
14. Zhang G.P. Time Series Forecasting Using a Hybrid ARIMA and Neural Network Model — *ScienceDirect. Neurocomputing*. 2003, 50:159-175. doi: [https://doi.org/10.1016/S0925-2312\(01\)00702-0](https://doi.org/10.1016/S0925-2312(01)00702-0).
15. Zhang X., Zhang T., Young A.A., Li X. Applications and Comparisons of Four Time Series Models in Epidemiological Surveillance Data. *PLoS ONE*. 2014, 9(2):e91629. doi: 10.1371/journal.pone.0088075.

Поступила 22.01.19

Контактная информация: Филатова Елена Николаевна, к.б.н.,
603950, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71, р.т. (831)469-79-46

ОБЗОРЫ

© Ю.Д.ПАХОМОВ, Л.П.БЛИНКОВА, 2019

Ю.Д.Пахомов, Л.П.Блинкова

БИООПАСНОСТЬ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

В обзоре изложены современные представления о жизнеспособных некультивируемых микроорганизмах — новом направлении исследований в общей и медицинской микробиологии. Анализируется информация о факторах и условиях перехода в некультивируемое состояние и выхода из него. Особый интерес представляют сведения о биоопасности жизнеспособных некультивируемых патогенов, трудно выделяемых рутинными методами в организме, окружающей среде, продуктах питания и т.д. Знания об этом явлении ценны для детекции живых микробов при изучении клинических образцов, уровня жизнеспособных некультивируемых клеток в препаратах вакцин, пробиотиков, музейных культур и др.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 83—91

Ключевые слова: жизнеспособные некультивируемые микробы, условия перехода — выхода, биоопасность

BIOHAZARD CAUSED BY VIABLE BUT NONCULTURABLE MICRO-ORGANISMS

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

In this review we discuss current notions about viable but nonculturable microorganisms — new subject of microbiological research. Information about factors and conditions of formation of nonculturable cells and their resuscitation is analyzed. Of particular interest is information of biohazard of nonculturable cells that are hard to isolate by traditional means from organisms, the environment, foodstuffs etc. Knowledge about this is valuable for detection live microbes from clinical samples, levels of viable but nonculturable cells in vaccine and probiotic preparations, culture collections.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 83—91

Key words: viable but nonculturable microbes, conditions of entry and resuscitation, biohazard

Образование и свойства некультивируемых клеток микроорганизмов. Жизнеспособными, но некультивируемыми клетками микроорганизмов (viable but nonculturable VBNC, ЖНК) называются обратимо потерявшие способность расти на традиционных питательных средах вследствие стрессовых воздействий [1, 2, 17]. Пока не ясно, является ли это некультивируемое состояние (НС) адаптацией к переживанию неблагоприятных условий в течение определенного времени или этапом отмирания культуры. Известны три наиболее рациональных предположения: 1) клетки спонтанно теряют способность давать колонии и подвергаются разрушению [33]; 2) существует программируемая смерть клеток [19]; 3) формирование ЖНК является механизмом переживания неблагоприятных условий, сравнимым со спорообразованием [17]. Вегетативные клетки микроорганизмов способны переходить в НС под действием большого числа факторов, в том числе считавшихся ранее бактерицидными. К таким факторам относятся неоптимальная температура [29] и давление [17], окислительный потенциал среды, [34], соли и ионы тяжелых металлов [15], кислотность среды [45], высушивание [6], облучение светом различных длин волн [25], хлорирование водопроводной воды [11], применение антибиотиков [38], ультразвук [12], воздействие CO₂ [50], лиофилизация [7] и дезинфектанты [17], биологические факторы (экзометаболиты зеленых водорослей, клеток простейших) [1]. ЖНК *Escherichia coli* образуются под действием CO₂ при высоком давлении, причем больше образуется их при 37°C, чем при более низкой температуре, при которой выше отмирание бактерий [48]. Выявлено, что для нормального образования ЖНК микроорганизмов важен весь комплекс стрессовых воздействий, которым они подвергаются в окружающей среде [27]. В некоторых случаях показана зависимость формирования ЖНК от источника выделения [3]. Так, выделенные из пищевых продуктов штаммы *E. coli*, пропущенные и не пропущенные через пищеварительную систему мыши, имели разную степень образования ЖНК при повышенном осмотическом давлении (13% NaCl) и окислительном (0.05% H₂O₂) стрессе [3]. Штамм, прошедший через пищеварительную систему мыши, был более чувствителен к стрессу, чем родительский, выделенный из пищевого продукта, и полностью переходил в НС под действием повышенной концентрации NaCl и перекиси водорода [3]. Для *Vibrio vulnificus* и *V. parahaemolyticus* показано, что ЖНК обладают повышенной устойчивостью к широкому спектру неблагоприятных воздействий, таких как антибиотики, токсичные соли тяжелых металлов, окислительный стресс, повышенная температура, высокое и низкое содержание NaCl, кислотность, кон-

центрация этанола [49]. Помимо водной среды для *Serratia marcescens* образованию ЖНК может способствовать и нахождение микроба в аэрозоле [21]. Присутствие некультивируемых микроорганизмов обнаружено на частицах пыли [20], где факторами для образования ЖНК могли быть высушивание и ультрафиолетовое излучение. Кроме патогенных микроорганизмов наличие НС с сохранением некоторого уровня метаболизма показано, например, для пробиотического микроорганизма *Lactococcus lactis* [18, 36]. Авторы показали, что при лимитировании по углеводам исследуемые штаммы переходят в НС. При этом наблюдается штаммовое разнообразие по времени перехода к некультивируемости (от одной недели до 3 месяцев) в зависимости от особенностей углеводного метаболизма.

Клетки микроорганизмов в НС уменьшаются в размерах, периплазматическое пространство более выражено, в нуклеоиде исчезают темные гранулы, уменьшается количество рибосом [48]. Внешняя мембрана ЖНК *V. cholerae* становится волнистой, утолщается слой пептидогликана, снаружи появляется слой, похожий на капсулу [24]. В клетках *Vibrio parahaemolyticus* цитоплазма разделяется на электронноплотный периферический слой и прозрачный центр [8]. Клеточная стенка становится неплотной, гибкой, после чего следует синтез новой тонкой стенки [43]. Обнаружено, что изменение состава липидов мембраны в условиях стресса играет роль в поддержании мембранного потенциала [35]. Также могут возникать серьезные перестройки в пептидном составе клеточной стенки: у *E. coli* обнаружено, что количество связей между молекулами диаминопимелиновой кислоты увеличилось более чем в три раза, а также повысилось количество мурамилпептидов [49]. Происходило укорочение гликановых цепей по сравнению с клетками экспоненциальной фазы, что обуславливает большую устойчивость микроорганизма к механическим воздействиям. Kusumoto A. et al. [26] установили, что в процессе потери культивируемости *Salmonella enterica* снижается количество стрессового фактора σ^S (RpoS) в клетках, а мутанты с делецией в соответствующем гене переходят в НС быстрее, чем родительские штаммы. Активируется продукция гистоноподобного белка H-NS, который ингибирует продукцию RpoS. Метаболизм в ЖНК не прекращается. У ЖНК происходит синтез *de novo* белков холодового шока и голодания [35]. Trevors et al. (2012) показали меньшее содержание РНК в цитоплазме голодающих бактерий, чем у нормальных микроорганизмов. Синтез белка также претерпевает изменения. Так, у *V. parahaemolyticus* снижение синтеза одних белков и усиление синтеза других подавляет переход клеток в стационарную фазу и способствует переходу в НС [27]. Уровень АТФ остается на высоком уровне, что подтверждает факт жизнеспособности таких клеток [19]. Количество 16S рибосомной РНК меняется незначительно, сохраняются редуктазная и эстеразная активность [28]. На нескольких штаммах *Vibrio vulnificus* *in vitro* и *in situ* показано, что при нахождении клеток в НС сохраняется экспрессия некоторых генов, таких как, например, *groS* и *katG*, хотя транскрипция последнего идет на крайне низком уровне. Выявлено, что *groS* мутанты, не имеющие регуляторного пептида *ppGpp*, быстрее, чем дикий тип, переходят в НС. ЖНК продолжают экспрессию RpoS. Показано, что мутанты без *groS* теряли культуранальность быстрее и отмирали раньше, чем родительские клетки. Поэтому сделан вывод, что экспрессия гена *groS* способствовала персистенции ЖНК [49]. Таким образом, хотя экспрессия и регуляция гена *groS* осложняет переход в НС, долговременное выживание популяции без его экспрессии невозможно. Имеется также другая точка зрения: *ppGpp*, регулируемый белком RelA, может быть индуктором НС и клетки, не имеющие *ppGpp*, становятся ЖНК с меньшей вероятностью [5]. Для ЖНК *E. coli* показано заметное усиление продукции белка внешней мембраны

OmpW, который активирует альтернативный сигма-фактор σ^E (RpoE) [3]. Клетки *E. coli* в НС устойчивы к ультразвуку [48]. Белковый состав клеток также меняется, отмечено торможение синтеза одних белков и увеличение синтеза других. Lai C. J. et al. [27] сравнили белковые профили клеток *Vibrio vulnificus* и *V. parahaemolyticus* в НС, в процессе перехода в НС и с блоком НС. В результате выявлен ряд генов, для которых при переходе в НС наблюдали усиление транскрипции по сравнению с клетками, у которых переход в НС заблокирован (например, факторы элонгации EF-Tu и EF-G, рибосомальный белок S1 и др.). Показано, что при переходе в НС *groS* транскрибируется активнее, чем в экспоненциальной фазе, а затем транскрипция затухает, но остается на детектируемом уровне [27]. Yaron and Matthews [46] показали экспрессию генов в *E. coli*, включая *mobA*, *rfbE*, *stx1*, *stx2* и некоторых генов, относящихся к синтезу 16s rRNA. Продолжающаяся экспрессия генов, контролируемых у ЖНК *E. coli* токсин Шига, гемолизин и адгезин, может приводить к диарее, геморрагическому колиту и гемолитико-уремическому синдрому.

Использование различных методов измерения метаболической активности, а также целостности мембраны позволяет установить жизнеспособность ЖНК [35]. *Legionella pneumophila* при обработке хлорноватистой кислотой переходит в НС. Причем из двух субпопуляций, различающихся по уровню метаболизма, которые выявляются в ранней стационарной фазе роста культуры, устойчивее оказалась более активная субпопуляция. Она, переходя в НС, сохраняет свою активность при небольших дозах кислоты. При формировании НС появляется субпопуляция с очень низкой активностью метаболизма. С повышением концентрации кислоты возрастает доля таких клеток, вплоть до 100% [16].

Выход микроорганизмов из некультивируемого состояния. Первыми термин «реанимация некультивируемых клеток» использовали Roszak et al. [40] для описания реактивации ЖНК *Salmonella enteritidis*. Возможность их возврата к активному росту и размножению является одним из свойств, полученных в периодической культуре ЖНК или покоящихся клеток бактерий (ПК)[1]. Морфология клеток при реверсии также восстанавливается [17]. Основной проблемой при реанимации покоящихся клеток или ЖНК является доказательство того, что происходит реанимация, а не рост недетектируемой активной части популяции [35]. Во многих случаях для успешного выхода микроорганизмов из НС достаточно снятия неблагоприятного воздействия. Например, для *Vibrio parahaemolyticus* и *Vibrio vulnificus*, переходящих в НС при низкой температуре, достаточно инкубации ЖНК при комнатной температуре с последующим посевом культуры на богатую среду [43]. Кроме того, например, для *Vibrio vulnificus* показано, что динамика увеличения числа КОЕ в условиях инкубации при комнатной температуре и отсутствии питательных веществ отражает именно возврат к росту некультивируемых клеток, поскольку увеличение численности с недетектируемого уровня до 5×10^4 за 1 час в данном режиме невозможно за счет деления остаточных активных клеток [44]. Реактивация ЖНК может происходить с помощью видонеспецифичного аутоиндуктора по механизму quorum sensing: добавление культуральной жидкости от *Vibrio vulnificus* и синтетического аутоиндуктора ускоряет выход вибрионов из НС, а ингибирование системы quorum sensing замедляет рекультивацию [1, 4]. Однако *groS* мутанты не способны к реанимации с помощью аутоиндуктора даже при добавлении экзогенного стимулирующего вещества. Значит, этот σ -фактор играет важную роль не только в персистенции ЖНК, но и в их рекультивации. Аугаретян et al. [4] показали, что сигнальная молекула в системе quorum sensing AI-2 может выводить ЖНК *V. vulnificus* из НС. Установлено что клетки *E. coli* могут быть реанимированы на богатой среде при наличии в ней

антиоксидантов (каталаза или пируват натрия) [38]. Хотя существуют различные точки зрения на использование антиоксидантов, Morishige Y. et al. [32] показали, что клетки *Salmonella enteritidis*, введенные в НС с помощью H_2O_2 , восстанавливают культурабельность после добавления пирувата натрия или его аналогов, доказывая, что пируват — одно из ключевых веществ, запускающих синтез макромолекул. *Staphylococcus aureus* не реактивируется при добавлении в среду антиоксидантов, но может быть реактивирован при повышении температуры. Для стафилококковых биопленок реактивирующим фактором служила культуральная жидкость (добавка 50% жидкости к триптическому соевому бульону) от клеток экспоненциальной фазы того же штамма [38]. Эффективными индукторами для выхода из НС оказались фетальная сыворотка, ауксин, витамин К, почвенные вытяжки из живых и убитых инфузорий [1]. Переход в активное состояние, возможно, связан с взаимодействием микроорганизмов с цитокинами организма хозяина [1, 2]. Для *Legionella pneumophila* выявлено, что реанимация возможна при совместном культивировании с *Acanthamoeba castellanii* [16]. *L. monocytogenes* serovar Thompson предположительно рекультивируется в кишечнике нематоды [22]. Для ЖНК некоторых энтеропатогенных микроорганизмов (*V. cholerae*, *E. coli*, *S. flexneri*, *S. enterica*) недавно показана реверсия в вегетативное состояние при совместном культивировании с культурами клеток эукариот, установлено, что такой реактивации способствует выделяемая живыми эукариотическими клетками каталаза [41]. Известны работы по реверсии к пролиферативной активности с использованием мышей [47]. Обнаружено, что у многих бактерий присутствует белок Rpf (Reasucitation Promoting Factor). Выявлено, что ЖНК *S. enterica* serovar Oranienburg могут быть стимулированы определенными концентрациями Rpf белка [49]. Пептидогликангидролазная активность белков семейства Rpf предполагает, что восстановление ПК требует гидролиза клеточной стенки, способствуя выходу из нее факторов, влияющих на пробуждение [23]. К настоящему моменту известно, что вирулентность реанимированных клеток сохраняется или восстанавливается. ЖНК различных микроорганизмов имеют ограниченный срок жизни и ограниченный во времени потенциал возврата к росту и размножению. Так, для *Vibrio cholerae* показано отсутствие возврата ЖНК в вегетативное состояние после 91 дня наблюдений [41].

Опасность жизнеспособных некультивируемых микроорганизмов. Вопрос, являются ли ЖНК опасными, если они не обнаружены рутинными методами, изучен недостаточно. Поскольку многие микроорганизмы способны сохранять активность факторов вирулентности и инфекционность, существует риск для здоровья человека, животных, растений [39]. Показано, что 80% вспышек заболеваний вызваны неидентифицированными агентами, возможно ЖНК [49]. При этом, такие вспышки часто относят к вирусным инфекциям, т.к. бактерии не выделяются [17]. Так, *Vibrio cholerae* в НС вызывал диарею у волонтеров [9]. Этот микроорганизм продолжал секрецию холерного токсина в течение 28 дней после перехода в НС [10]. *L. pneumophila* в НС сохраняла способность проникать в клетки амебы-хозяина, впоследствии представляя опасность для теплокровных [49]. *S. dysenteriae*, сохраняя сниженную токсичность и адгезивность для клеток HeLa, продуцировала токсин Шига, находясь в НС. Существуют исследования, в которых инфицированные *Shigella dysenteriae* рыбы, не имевшие явного контакта с патогеном, не способным существовать в среде [39]. Highmore et al. [22] показали, что обработка хлором *Listeria monocytogenes* и *Salmonella enterica* serovar Thompson как в жидкой среде, так и на листьях салата приводит к быстрому, в течение нескольких минут, образованию ЖНК, которые сохраняют свою патогенность. Для перевода исследованных

авторами микробов в НС на листьях требуется значительно больше хлора. Это, возможно, связано с расположением клеток в устьицах и вокруг них и образованием биопленок совместно с автохтонной микробиотой листа. Патогенность ЖНК *L. monocytogenes* зависит от примененного стрессового воздействия [22]. Для *E. coli* показано формирование ЖНК при замораживании. Следовательно, микроб становится более опасным при наличии циклов замораживания — оттаивания пищевых продуктов, т.к., ЖНК при этом продолжают синтезировать токсин [29]. Штаммы *Legionella* в НС сохраняют инфекционность в отношении *Acanthamoeba* и макрофагов человека даже после года нахождения в голодной среде. На моделях макрофагов показано, что легионеллы восстанавливали способность к размножению внутриклеточно [13]. При использовании медных водопроводных труб образуются ЖНК *P. aeruginosa*, т.к. там присутствуют ионы меди в определенных концентрациях. Клетки могут выходить из НС при снятии стресса, обусловленного медью, например, хелатирующим агентом, восстанавливать цитотоксичность и генотоксичность в отношении клеток человека в течение 14 дней [15]. *S. typhi* также переходит в опасное НС под воздействием ионов меди в течение 12 — 14 дней [47]. Это указывает на то, что при многих вспышках заболеваний не уделяется достаточного внимания существованию некультивируемых патогенов, особенно в виде биопленок [2]. Логично предположить, что неудачи в выделении данного штамма *E. coli* O104:H4 связаны с присутствием клеток возбудителя в НС. *S. aureus* может находиться в НС в биопленках в присутствии ванкомицина хинопристин/дальфопристин и персистировать в составе биопленок, что предположительно сопряжено с рецидивирующими инфекциями [38]. Следовательно, при выборе дезинфицирующего агента необходимо подбирать биоциды, работающие по нескольким направлениям, поскольку окислительные биоциды неэффективны в отношении биопленок. Одними из наиболее действенных средств считаются соединения хлора, например HOCl , для которого показано, что инактивирующие дозы намного меньше, чем, например, для H_2O_2 [17].

Для пивоваренной промышленности важны микроорганизмы *Lactobacillus lindneri* и *Lactobacillus harbinensis* и другие представители рода *Lactobacillus*, наличие которых приводит к порче пива. Они могут переходить в НС при адаптации к пиву, при его ферментации и хранении при низкой температуре или при тепловой обработке. При этом сохраняется способность производить вещества, приводящие к порче пива. Важную роль играет окислительный потенциал пива, в том числе бактерицидные вещества хмеля [30, 31]. Существование ЖНК обнаружено также у эукариотных микроорганизмов. Serpaggi et al. [42] показали, что эукариотные микроорганизмы — дрожжи *Brettanomyces bruxellensis*, вызывающие порчу вина, также могут переходить в НС под действием метабисульфита натрия и сохранять свои свойства по порче вина. *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida stellata* способны переживать обработку сульфитами, переходя в НС [14].

По мнению Blinkova L.P. et al. [7] и Pakhomov et al. [37] ЖНК важны для определения истинной жизнеспособности вакцинных, пробиотических, музейных культур как основных, так и их опасных контаминирующих микроорганизмов.

Таким образом, имеется возможность возникновения ситуации, когда заболевание вызывается жизнеспособными некультивируемыми микроорганизмами. В этом случае затруднен поиск резервуара и возбудителя инфекции, поскольку традиционный культуральный метод выделения микроорганизмов из природных и антропогенных источников (почва, вода, продукты питания, клинические образцы и др.) дает ложноотрицательный результат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Гинцбург Г.А., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М., Медицина, 2005.
2. Романова Ю.М., Горячев С.Н. Современный взгляд на экологию бактерий: некультивируемые формы, персистеры, биопленки. М., АР-Консалт, 2017.
3. Asakura H., Kawamoto K., Haishima Y. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Research in Microbiology*. 2008, 159(9-10):709-717.
4. Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Interspecific Quorum Sensing Mediates the Resuscitation of Viable but Nonculturable Vibrios. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, 80(8):2478-2483.
5. Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends in microbiology*. 2015, 23(1):7-13.
6. Barron J.C., Forsythe S.J. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* 2007, 70:2111-2117. doi: 10.4315/0362-028X-70.9.2111.
7. Blinkova L.P., Martirosyan D., Pakhomov Yu. et al. Nonculturable forms of bacteria in lyophilized probiotic preparations. *Functional Foods in Health and Disease*. 2014, 4(2):66-76.
8. Chen S.Y., Jane W.N., Chen Y.S. et al. Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, 129(12):157-165.
9. Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J. et al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *BioTechnology*. 1985, 3:817-820.
10. Colwell R.R., Brayton P., Tamplin M. et al. Pathogenic potential including production of cholera toxin in viable but nonrecoverable *Vibrio cholerae* O1 in environmental microcosm. *In: S. Kuwahara and, N.F. Pierce (ed.), Advances in research on cholera and related diarrheas*. KTK Publishers, Tokyo, 1988, p. 29-39.
11. De Velasquez O., Noguez M.T.Y. et al. Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images. *Environmental Technology*. 2017, 40(6):744-753.
12. Declerck P., Vansyacker L., Hulsmans A. et al. Evaluation of power ultrasound for disinfection of both *Legionella pneumophila* and its environmental host *Acanthamoeba castellanii*. *Water Research*. 2010, 44:703-710. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.062>.
13. Dietersdorfer E., Kirschner A., Schrammel B. et al. Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Research*. 2018, 141:428-440.
14. Divol B., Lonvaud-Funel A. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis — affected wine. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, 99(1):85-93.
15. Dopp E., Richard J., Dwidjosiswojo Z. et al. Influence of the copper-induced viable but non-culturable state on the toxicity of *Pseudomonas aeruginosa* towards human bronchial epithelial cells in vitro. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2017, 220:1363-1369.
16. Ducret A., Chabaliere M., Dukan S. Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiology*. 2014, 14 (3) doi:10.1186/1471-2180-14-3.
17. Ferro S., Amorico T., Deo P. Role of food sanitizing treatments in inducing the viable but nonculturable state of microorganisms. *Food control*. 2018, 91:321-329.
18. Ganesan B., Stuart M.R., Weimer B.C. Carbohydrate Starvation Causes a Metabolically Active but Nonculturable State in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73(8):2498-2512.
19. Gerdes K., Jacobsen J.S., Franch T. Plasmid stabilization by post-segregational killing. *Genet. Eng.* 1997, 19:49-61.
20. Hara K., Zhang D. Bacterial abundance and viability in long-range transported dust. *Atmospheric Environment*. 2012, 47:20-25.
21. Heidelberg J. F., Shahamat M., Levin M. et al. Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63(9):3585-3588.
22. Highmore C.J., Warner J.C., Rothwell S.D. et al. Viable-but-Nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Thompson Induced by Chlorine Stress Remain Infectious. *mBio*. 2018, 9(2), e00540-18.

23. Keep N.H., Ward J.M., Cohen-Gonsaud M. et al. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth state. *Trends Microbiol.* 2006, 14(6):271-276.
24. Kondo K., Takade A., Amako K. Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique. *FEMS Microbiology Letters.* 1994, 123:179-184.
25. Kramer B., Muranyi P. Effect of pulsed light on structural and physiological properties of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology.* 2013, 116, 596e611.
26. Kusumoto A., Asakura H., Kawamoto K. General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. *Microbiol Immunol.* 2012, 56:228-237.
27. Lai C.J., Chen S.Y., Lin I.H. et al. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology.* 2009, 135(2):118-124.
28. Lahtinen S.J., Ahokoski H., Reinikainen J.P. et al. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable bacteria. *Letters in Applied Microbiology.* 2008, 46(6):693-698.
29. Liu J., Zhou R., Li L. et al. Viable but non-culturable state and toxin gene expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 under cryopreservation. *Research in Microbiology.* 2017, 168:88-193.
30. Liu J., Li L., Li B. et al. First study on the formation and resuscitation of viable but nonculturable state and beer spoilage capability of *Lactobacillus lindneri*. *Microbial Pathogenesis.* 2017, 107:219-224.
31. Liu J., Deng Y., Li L. et al. Discovery and control of culturable and viable but non-culturable cells of a distinctive *Lactobacillus harbinensis* strain from spoiled beer. *Scientific Reports.* 2018, 8, Article number: 11446.
32. Morishige Y., Fujimori K., Amano F. Differential resuscitative effect of pyruvate and its analogues on VBNC (Viable But Non-Culturable) *Salmonella*. *Microbes Environ.* 2013, 28:180–186. doi: 10.1264/j sme2.ME12174.
33. Nyström T. Conditional senescence in bacteria: death of the immortals. *Mol. Microbiol.* 2003, 48(1): 17-23.
34. Oh E., McMullen L., Jeon B. Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. *Front. Microbiol.* 2015, 6 (295). doi: 10.3409/fmicb.2015.00295.
35. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010, 34(4):415-425.
36. Pakhomov Yu.D., Blinkova L.P., Dmitrieva O.V. et al. Non-culturability and Nisin Production of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol. Parasitol.* 2013, 5(1) article 178. doi: 10.4172/2155-9597.1000178.
37. Pakhomov Yu. D., Blinkova L.P., Dmitrieva O.V. et al. Factors for conversion of nonculturable probiotic bacteria into active state. *Journal of Nature Science and Sustainable Technology.* 2016, 10 (1):147-153.
38. Pasquaroli S., Zandri G., Vignaroli C. et al. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013, 68(8):1812-1817.
39. Rahman I., Shahamat M., Choudhury M.A. et al. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type I. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62(1):115-120.
40. Roszak D. B., Grimesa J., Colwell R. R. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* 1984, 30:334-340.
41. Senoh M., Hamabata T., Takeda Y. A factor converting viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to a culturable state in eukaryotic cells is a human catalase. *Microbiology Open.* 2015, doi: 10.1002/mbo3.264.
42. Serpaggi V., Remize F., Recorbet G. Characterization of the «viable but nonculturable» (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology.* 2012, 30(2): 440-447.
43. Su C.P., Jane W.N., Wong H.C. Changes of ultrastructure and stress tolerance of *Vibrio parahaemolyticus* upon entering viable but nonculturable state. *International Journal of Food Microbiology.* 2013, 160(3):360-366.
44. Whitesides M.D., Oliver J.D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63(3):1002-1005.
45. Wong H.C., Wang P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology.* 2004, 96:359-366.

46. Yaron S., Matthews K. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157: H7: investigation of specific target genes. *J. Appl. Microbiol.* 2002, 92:633-640. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01563.x.
47. Zeng B., Zhao G., Cao X. et al. Formation and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Salmonella typhi* *BioMed Research International.* 2013, 2013 article ID 907170.
48. Zhao F., Bi X., Hao Y. Induction of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by High Pressure CO₂ and Its Characteristics. *PLoS One.* 2013, 8(4) e2408.
49. Zhao X., Wang J., Forghani F. et al. Rapid detection of viable *Escherichia coli* O157 by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 23:1708-1716. doi:10.4014/jmb.1306.06003.
50. Zhao X., Zhong J., Wei C. et al. Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Frontiers in Microbiology.* 2017, 8 Article 580.

Поступила 30.11.18

Контактная информация: Пахомов Юрий Дмитриевич, к.б.н.,
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)916-11-52

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Ф.И.Ершов¹, Т.П.Оспельникова^{2,1}, А.Н.Наровлянский¹

ИНТЕРФЕРОНОВЫЙ СТАТУС КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОМАРКЕРОВ ИММУНОПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

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

На протяжении более 60 лет продолжается изучение системы интерферонов (ИФН) как сложной сетевой системы. Открыты ИФН 3 типов: I (α/β), II (γ), III (λ), исследуются их взаимосвязи, механизмы действия, функциональное разнообразие. Практическим выходом изучения функциональной способности лейкоцитов периферической крови человека продуцировать ИФН явился метод определения интерфероновый статус, который позволяет судить об иммунореактивности организма, выявлять чувствительность клеток крови к иммуноактивным препаратам и дает возможность определить тактику лечения при разных формах патологии и прогнозировать исход заболевания. Предложен и научно обоснован усовершенствованный метод ИФН статуса, показатели которого в настоящее время могут считаться характеристиками неспецифических биомаркеров иммунопатологии человека.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 91—99

Ключевые слова: интерфероны I (α/β), II (γ), III (λ) типов, интерфероновый статус, усовершенствованная методика, неспецифические биомаркеры, иммунопатологии человека

F.I.Ershov¹, T.P.Ospelnikova^{2,1}, A. N.Narovlyansky¹

INTERFERON STATUS AS A METHOD OF DETERMINATION OF NONSPECIFIC BIOMARKERS OF HUMAN IMMUNOPATHOLOGY

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

For more than 60 years, the study of interferons (IFN) system has continued, as a complex network system. IFNs of 3 types are discovered: I (α/β), II (γ), III (λ), their interrelations, mechanisms of action, functional diversity are investigated. The practical way out of the study of the functional capacity of human peripheral blood leukocytes to produce IFN was the method of determining the interferon status, which

allows to judge the immunoreactivity of the organism, to detect the sensitivity of blood cells to immunoeffective drugs and makes it possible to determine the tactics of treatment in different forms of pathology and predict the outcome of the disease. An improved method of IFN status has been proposed and scientifically justified, the indicators of which can now be considered as characteristics of nonspecific biomarkers of human immunopathology.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 91–99

Key words: interferons I (α/β), II (γ), III (λ) types; interferon status; improved methodology; nonspecific biomarkers; human immunopathology

Открытие интерферона (ИФН) А. Isaacs и J. Lindenmann в 1957 году считается одним из выдающихся достижений XX века [26]. В результате исследования этого белка за 60 лет был накоплен и осмыслен большой пласт информации, касающийся физико-химических и биологических свойств, строения интерфероновых и регуляторных генов, нуклеотидной последовательности всех основных типов и подтипов ИФН. Были расшифрованы молекулярные механизмы образования и действия ИФН, установлены пути передачи ИФН сигнала, его взаимосвязь с другими цитокинами, механизмами регуляции естественного иммунитета и участием в патогенезе аутоиммунных заболеваний [15, 17, 22, 24, 30–32, 35, 38, 40, 45, 50]. Именно интерфероны стали первыми перспективными источниками рекомбинантных молекул, использованных для создания лекарственных средств (ЛС) с применением современных методов нанобиотехнологии [1, 5, 10, 11, 21, 36, 41].

ИФН видоспецифичны, обладают широким спектром свойств, в т.ч. антивирусными, иммунорегуляторными, антипролиферативными свойствами, и участвуют в регуляции экспрессии клеточных генов организма [29, 34, 47, 51]. Все клетки организма в той или иной степени обладают способностью вырабатывать ИФН. Наиболее сильными продуцентами ИФН являются иммунокомпетентные клетки. Следует отметить, что система ИФН не имеет ни специализированных клеток, ни специализированных органов, и так как каждая клетка может быть заражена вирусом, то она должна иметь систему распознавания и элиминации чужеродной генетической информации. ИФН обнаружены не только в крови, но и в других биологических жидкостях, а также на слизистых оболочках [23, 33]. На сегодняшний день открыто три основных типа ИФН: I, II и III, биологические свойства которых определяются специфическими рецепторами.

У млекопитающих к I типу относятся следующие подтипы интерферонов: α , β , δ (свинья), ϵ , κ , τ (крупный рогатый скот), ω , $\alpha\omega$, ν (кошки), ζ (лимитин). ИФН I типа обеспечивают не только врожденную неспецифическую резистентность по отношению к патогенам, преимущественно вирусам, но и индуцируют последующий специфический адаптивный иммунитет. Ведущая роль ИФН в поддержании противовирусной резистентности организма [49] была установлена еще в середине прошлого века и доказана экспериментальным путем в различных модельных системах с использованием нокаутных животных. Индукторами, стимулирующими образование ИФН- α клетками, могут выступать опухолевые клетки, вирустрасформированные и вирусиндуцированные клетки, незараженные ксеногенные клетки. ИФН- α также может синтезироваться в ответ на индукцию как В-клеточными митогенами, например, липолисахаридом, декстрансульфатом, так и Т-клеточными, в частности фитогемагглютинином (ФГА). Высокоактивными индукторами ИФН- α являются микроорганизмы, в частности бактерии, и их токсины. Однако, и это следует подчеркнуть, классическими индукторами ИФН- α служат вирусы. Индукторами ИФН- β служат все вещества, относящиеся к классу двуспиральных РНК как природного

(выделенные из вирусов, бактерий и дрожжей), так и синтетического происхождения (полирибонуклеотиды). Растительные полифенолы также способны индуцировать ИФН-β.

ИФН-α продуцируется различными видами клеток, однако основным его продуцентом в организме являются лейкоциты, в которых его синтез резко активируется в ответ на вирусную инфекцию организма. В связи с этим, его обычно называют лейкоцитарным интерфероном. Клетками-продуцентами ИФН I типа (α и β) являются дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты, НК-клетки, эозинофилы, тучные клетки. Клетки миндалин, селезенки, костного мозга и лимфы человека способны синтезировать ИФН-α в такой же степени, что и лейкоциты периферической крови. Плазмоцитоподобные дендритные клетки [48] являются основными интерферон-продуцирующими клетками крови и секретируют в больших количествах ИФН I типа (α и β). Макрофаги, выделенные из клеток костного мозга человека, синтезируют ИФН-α в ответ на заражение вирусами или обработку низкомолекулярными соединениями. ИФН-α способны синтезировать практически все иммуноциты. ИФН I типа регулируют участие вспомогательных клеток, обеспечивающих выживание и активацию В-клеток, посредством факторов выживаемости В-клеток, таких как, например, стимулятор В-лимфоцитов, продуцируемый дендритными клетками [27].

Синтез ИФН-β осуществляют многие типы клеток: фибробласты, клетки эпителия и эндотелия, лимфоидные клетки и астроциты, однако, наиболее активными продуцентами ИФН-β являются фибробласты, поэтому его часто называют фибробластным. Основными продуцентами ИФН-β являются клетки фибробластного и эпителиоидного типа, которые отвечают синтезом ИФН в ответ на все индукторы ИФН-β. В продукции ИФН-β могут принимать участие и клетки иммунной системы. Лейкоциты периферической крови в ответ на митогенную стимуляцию, также способны синтезировать ИФН-β. Способностью синтезировать ИФН-β обладают В- и Т-лимфобластоидные линии клеток в ответ на вирусную стимуляцию.

ИФН II типа характеризуется иммунным ИФН-γ [51]. Индукторами ИФН-γ являются Т-клеточные митогены лектины, оксиданты, антилимфоцитарные сыворотки, фрагменты иммуноглобулинов антилимфоцитарных сывороток, специфические антигены и аллоантигены, участвующие в процессе распознавания клеток, большинство микроорганизмов, многие иммуномодуляторы, соли тяжелых металлов. Клетками-продуцентами эндогенного ИФН-γ являются Т-хелперы (CD4), клетки иммунологической памяти (CD45RA), Т-киллеры (CD8), НК-клетки (CD16, CD56), дендритные клетки (CD23, CD35), В-лимфоциты (CD22, CD23), которые его синтезируют при отсутствии вирусного заражения. Основными клетками-продуцентами ИФН-γ являются Т-хелперы I типа. Процесс синтеза ИФН зависит от присутствия вспомогательных клеток, в основном моноцитов и макрофагов, которые сами не вырабатывают ИФН-γ, но в их присутствии его синтез усиливается.

ИФН III типа — ИФН-λ, открытый в 2003 г., состоит из 4 подтипов [23, 25, 30]. Первоначально они были отнесены к интерлейкинам и определены как ИЛ-29 (теперь ИФН-λ1), ИЛ-28А (теперь ИФН-λ2) и ИЛ-28В (теперь ИФН-λ3). Позднее была открыта четвертая форма — ИФН-λ4, которая экспрессируется в небольшом количестве и определена как результат сдвига рамки считывания в гене ИФН-λ3 [25]. В силу особенностей структуры и наличия собственного рецептора ИФН-λ выделены в самостоятельный III тип ИФН. Несмотря на то, что IFN-α и IFN-λ связываются с различными рецепторами, они запускают один и тот же каскад реакций фосфорилирования Jak-STAT и модулируют активность одной и той же группы ИФН-стимулируемых генов (ISGs), что приводит к сходному ответу клеток. Наличие ИФН-λ в ор-

ганизме не является избыточным по отношению к ИФН- α , поскольку они имеют и разную тканевую специфичность, и разное отношение к различным видам вирусов. ИФН III типа обеспечивают защиту кожи, легких и желудочно-кишечного тракта от действия вирусов.

Как отмечалось выше, уже более 60 лет продолжается изучение разнообразных проявлений ИФН. На их основе получены лекарственные препараты ИФН- α , - β , - γ , - λ , и продолжается разработка новых и усовершенствованных форм ЛС для терапии ряда нозологий [1, 5, 10, 11, 21, 41]. Однако, для корректного применения таких ЛС требовались методы оценки ИФН-продуцирующей и ИФН-отвечающей способности клеток организма человека. Практическим выходом изучения функциональной способности лейкоцитов периферической крови человека продуцировать ИФН стала разработка макрометода на выделенных лимфоцитах. Однако, этот метод не получил развития, поскольку требовалось значительное количество крови пациента, большой расход реактивов и комплектующих, и при этом метод отличался трудоемкостью [14, 19].

Описание и переход к микрометоду произошел в 70-80-х годах прошлого столетия [16, 19, 28, 42, 43, 46]. Этот метод был описан как тестирование интерферонового статуса здоровых людей и пациентов с различными заболеваниями [19, 28, 43, 46]. Kirchner N. et al. [28] доказаны преимущества тестирования ИФН микрометодом, который экономит время, реактивы и усилия постановщика.

В России начало изучения системы ИФН связано с именами отечественных основоположников интерферонологии: Соловьева В.Д. [14], Ершова Ф.И. [7,8]. Под их руководством были выполнены научно-практические исследования в направлении изучения интегрального критерия функционального состояния системы ИФН — интерферонового статуса.

Преимущество этого метода состоит в том, что для тестирования функционально-активной продукции ИФН используется цельная кровь в ограниченном объеме. Таким образом, компоненты клеток крови не разделены и, в целом, имитируют организм *ex vivo*. Микрометод требует меньше манипуляций и материалов, может быть полезен для массовых исследований и важен для тестирования в педиатрии [46], к тому же, с возможным использованием крови, взятой днем раньше и сохраненной при 4 °С [28].

Созданию метода интерферонового статуса предшествовало три цикла исследований: В.Д.Соловьева, Т.А.Бектемирова [14], показавших способность лейкоцитов крови продуцировать *in vitro* ИФН в ответ на индукцию вирусом или митогеном — интерфероновая реакция лейкоцитов (ИРЛ). Разработка микрометодов определения концентраций ИФН в крови людей [46]. В дальнейшем были предложены многочисленные модификации микрометода [2, 16, 18, 44]. Подбор культур клеток, наиболее чувствительных к действию человеческих интерферонов: диплоидные клетки тканей эмбриона человека, перевиваемые линии L-клеток, клетки Vero и др. [4, 14, 20, 39].

Методика ИФН статуса включала комплексное определение в крови пациентов уровня продукции ИФН I, II типов и циркулирующего (сывороточного) ИФН [2, 3, 6]. В случае получения данных о снижении продукции ИФН (сниженный интерфероногенез) могло быть сделано заключение о наличии дефектов врожденного иммунитета. Было показано, что состояния с полным или частичным «выпадением» различных звеньев системы ИФН (ИФН- α/β или ИФН- γ) могли являться причиной или следствием острых и хронически рецидивирующих вирусных инфекций. При этом прослеживалась четкая взаимосвязь между показателями ИФН статуса и тяжестью заболевания [2, 6].

При помощи разработанного микрометода широко проводилось тестирование ИФН статуса здоровых людей и больных с различными заболеваниями и было показано, что система ИФН, в основном, может характеризовать врожденный иммунитет организма. В настоящее время этот метод ИФН статуса постоянно совершенствуется и для врачей сохраняется актуальность изучения продукции ИФН клетками крови для характеристики врожденного иммунитета пациента [9, 37]. Причем под термином «ИФН» врачами понимается широкое определение факторов или суммы неспецифических биомаркеров с противовирусной активностью, циркулирующих в крови или продуцируемых форменными элементами крови в ответ как на вирусный индуктор, так и на стандартные митогены.

Внедрение в медицинскую практику иммуноактивных препаратов обуславливает как изучение механизмов действия этих препаратов, так и определение их влияния на врожденный и адаптивный иммунитет, в том числе на процессы продукции ИФН. Исследование «тонких» показателей ИФН статуса с определением чувствительности клеток крови к иммуноактивным препаратам дает возможность обосновать тактику лечения при разных формах патологии и прогнозировать исход заболевания [3, 12]. Оценка выявленных изменений может служить ориентиром в диагностике, лечении и прогнозе заболеваний как вирусной, так и невирусной этиологии. Снижение продукции ИФН I и II типов, которое может быть и причиной, и следствием острых и хронических инфекционных (вирусных, бактериальных, грибковых) и неинфекционных (аллергических, аутоиммунных) заболеваний, свидетельствует о врожденном или приобретенном дефиците/недостаточности системы ИФН. В целом, интерфероновый статус как показатель функциональной активности системы интерферона позволяет судить об иммунореактивности организма.

Показания, при которых необходимо исследование продукции ИФН: острые и хронические формы вирусных инфекций, рецидивирующие оппортунистические инфекции; часто болеющие дети, врожденные и приобретенные дефекты системы ИФН, аллергические и аутоиммунные заболевания, а также клинические испытания препаратов ИФН, индукторов ИФН, цитокинов и иммуномодуляторов. Следует заметить, что результаты исследования функциональной активности ИФН, продуцируемых лейкоцитами крови, необходимо рассматривать в комплексе с остальными лабораторными и клинико-anamnestическими данными.

Исследование параметров активной продукции ИФН используют для подбора препаратов экзогенного ИФН, индукторов ИФН и иммуномодуляторов, а также для оценки эффективности терапии.

Методика определения интерферонового статуса нашла широкое применение в практике лабораторной диагностики нарушений интерфероногенеза при болезнях, ассоциированных не только с вирусными, но и с аллергическими, аутоиммунными, онкологическими и другими иммуноопосредованными патологиями. Это, в свою очередь, способствовало широкому внедрению в медицинскую практику препаратов ИФН, отечественных индукторов ИФН, направленных на восстановление интерфероногенеза и иммунореабилитацию в целом [5, 10, 12].

В целом, определение ИФН статуса используется как интегральный показатель функционального состояния системы ИФН и эффективности проводимого лечения. В России определение ИФН статуса применяется как в научных исследованиях, так и в практике лабораторной диагностики для определения нарушений интерфероногенеза при различных воспалительных процессах.

Методы количественного определения биологической активности иммуноактивных препаратов (препаратов индукторов ИФН, иммуномодуляторов, вакцин) и

оценки ИФН статуса требуют дальнейшего поиска и усовершенствования соответственно требованиям их стандартизации для возможности использования в оказании медико-лабораторных услуг населению.

Следует отметить, что в существующих методах постановки ИФН статуса используются дорогостоящие чувствительные к ИФН клеточные культуры диплоидных фибробластов (ФЛЭЧ, ЛЭЧ, ФЭЧ, М-19, М-22 и др.). Запасы этих культур остались не во всех музеях клеток, а пассажи начинаются только с 20 или 30. К сожалению, пригодный рабочий потенциал культуры клеток фибробластов эмбриона человека составляет ограниченное (6-14) количество пассажей. К тому же, для ведения этих культур требуются питательные среды с добавлением высококачественной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Так как качество ЭТС варьирует от партии к партии, существует постоянная потенциальная возможность контаминации вирусами, микоплазмами, бактериями и др., что делает невозможным стандартизировать процесс ведения клеточных культур.

В результате многочисленных повторных определений ИФН статуса на разных культурах клеток нами было выявлено, что показатели продукции ИФН оставались одинаковыми и воспроизводились как на культуре клеток фибробластов эмбриона человека, так и на культуре клеток почки зеленой мартышки Vero, культивируемых как с использованием ЭТС, так и на бессывороточных питательных средах. В результате этих исследований для определения показателей ИФН статуса была предложена эпителиальная культура клеток почки африканской зеленой мартышки Vero, адаптированная к бессывороточной питательной среде [13], [http://www.fedlab.ru/upload/medialibrary/bc9/Prakt-rek-IFN-status_-FLM_-2018.pdf].

Преимущество использования этой культуры очевидно: бессывороточные среды упрощают очистку и дальнейшую работу с клетками, позволяют точно оценивать клеточные параметры (все процессы обусловлены свойствами клеток, а не побочными эффектами сыворотки), повышают воспроизводимость результатов. К тому же, так как клетки Vero, в отличие от других клеточных культур, не продуцирует свой эндогенный ИФН, то в самой постановке не требуется этапа инактивации вируса NDV (вирусный индуктор ИФН), что существенно сокращает время реакции. Выявленная чувствительность клеток Vero, культивируемых на бессывороточных средах, к ИФН I и II типов, сохраняется при неограниченной способности к пассированию. Таким образом, нами предложена замена дорогостоящей линии клеток фибробластов эмбриона человека на близкородственную культуру клеток Vero (почки зеленой африканской мартышки), адаптированной к бессывороточной питательной среде. Все это дает возможность стандартизации процесса ведения клеточной культуры, снижения себестоимости и перспективности применения метода в оказании массовых медико-лабораторных услуг населению. Исследование активности функциональной продукции ИФН в комплексе с другими лабораторными и клинико-анамнестическими данными помогут оценить правильность тактики лечения и прогнозировать исход заболевания.

Интерфероны, являясь ключевыми участниками противовирусной, противовоспалительной защиты организма человека, представляют собой систему врожденной иммунорезистентности, состоящую из самих белков ИФН, их генов, семейства ферментов и сигнальных путей, тонко и четко взаимосвязанных между собой в норме и при развитии патологии. За прошедшие 60 лет много изучено в этой сложной сетевой системе, однако, еще многое предстоит изучить, используя как известные, так и разрабатываемые для будущего, методы и модели исследования. Определение показателей ИФН статуса используется как интегральный показатель

функционального состояния системы ИФН и эффективности проводимого лечения. В России определение ИФН статуса применяется как в научных исследованиях, так и в практике лабораторной диагностики для определения нарушений интерфероногенеза при различных воспалительных процессах. Методы количественного определения биологической активности иммуноактивных препаратов (препаратов индукторов ИФН, иммуномодуляторов, вакцин) и оценки ИФН статуса требуют дальнейшего поиска и усовершенствования соответственно требованиям их стандартизации для возможности использования при оказании медико-лабораторных услуг населению. Тем не менее, показатели интерфероновой статусы в настоящее время могут считаться характеристиками неспецифических биомаркеров иммунопатологии человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойко А.Н., Бойко О.В., Гусев Е.И. Выбор оптимального препарата для патогенетического лечения рассеянного склероза: современное состояние проблемы (обзор литературы). Журнал неврологии и психиатрии им.С.С.Корсакова. 2014; вып.2, 114(2):77-91.
2. Григорян С.С., Майоров И.А., Иванова А.М., Ершов Ф.И. Оценка интерфероновой статусы по пробам цельной крови. Вопросы вирусологии. 1988; 4:433-436.
3. Григорян С.С., Оспельникова Т.П., Ершов Ф.И. Определение индивидуальной чувствительности людей к индукторам интерферона и другим препаратам (по воздействию на интерфероновый статус). Методические рекомендации. М., НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи, 2000.
4. Государственная Фармакопея РФ, XIII издание. М., 2015. ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток.
5. Ершов Ф.И. Лекарственные средства для лечения вирусных инфекций. Рациональная анти-микробная химиотерапия. М., 2003.
6. Ершов Ф.И., Готовцева Е.П., Носик Н.Н. Интерфероновый статус в норме. Иммунология. 1986, 3:52-54.
7. Ершов Ф.И., Готовцева Е.П., Лаврухина Л.А. Интерфероновый статус при различных заболеваниях. Вопросы вирусологии. 1990, 6:444-448.
8. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. М., Медицина, 1996.
9. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Интерфероны и индукторы интерферонов. В кн.: Иммунотерапия. Под ред. Р.М.Хайтова, Р.И.Атауллаханова, А.Е.Шульженко. М., GEOTAR-Media, 2018:123-147.
10. Интерфероновый статус, препараты интерферона в лечении и профилактике инфекционных заболеваний и реабилитация больных. Под ред. С.С.Афанасьева, Г.Г.Онищенко, В.А.Алешкина, М.С.Афанасьева М., Триада-Х, 2005.
11. Оспельникова Т.П., Носейкина Е.М., Гайдерова Л.А., Ершов Ф.И. Терапевтический потенциал препаратов альфа интерферонов при социально-значимых заболеваниях человека вирусной этиологии. Журн. микробиол. 2016, 5:109-121.
12. Оспельникова Т.П., Григорян С.С., Ершов Ф.И. Новый подход к отбору иммуноактивных препаратов для лечения. Медицинская иммунология. 2001, 3(2):332-333.
13. Оспельникова Т.П., Колодяжная Л.В., Табаков В.Ю., Ершов Ф.И. Способ определения продукции интерферонов как параметров врожденного иммунитета. Патент на изобретение РФ №2657808 от 10.07.2017, опубликован: 15.06.2018.
14. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины. М., Медицина, 1979.
15. Bugge M., Bergstrom B., Eide O.K. et al. Surface Toll-Like Receptor 3 Expression in Metastatic Intestinal Epithelial Cells Induces Inflammatory Cytokine Production and Promotes Invasiveness. J. Biol. Chem. 2017. pii: jbc.M117.784090. doi: 10.1074/jbc. M117.784090.
16. Campbell J.B., Grunberger T., Kochman M.A., White S.L. A microplaque reduction assay for human and mouse interferon. Can. J. Microbiol. 1975; 21(8):1247-1253.
17. Cua D.J., Sherlock J., Chen Y. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature. 2003, 421(6924):744-748.

18. Dahl H. et al. Preventive effect of a nonviral interferon inducer, a bacterial vaccine, on experimental influenza in mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. Microbiol. Immunol.* 1972, 80(3):467-474.
19. Doldi K., Leroux M., Augustin R. et al. Proliferation and interferon production in whole blood samples and isolated lymphocyte preparations. *J. Interferon Res.* 1985, 5(1):55-64.
20. Ferreira P.C., Peixoto M.L., Silva M.A., Golgher R.R. Assay of human interferon in Vero cells by several methods. *J. Clin. Microbiol.* 1979, 9(4):471-475.
21. Flisiak R., Shiffman M., Arenas J. et al. Randomized Study of Peginterferon Lambda-1a Compared to Peginterferon Alfa-2a in Combination with Ribavirin and Telaprevir in Patients with Genotype-1 Chronic Hepatitis C. *PLoS One.* 2016 Oct 17; 11(10):e0164563. doi: 10.1371/journal.pone.0164563. eCollection 2016.
22. Forster S. Interferon signatures in immune disorders and disease. *Immunol. Cell. Biol.* 2012, 90(5): 520-527. doi: 10.1038/icb.2012.12.
23. Hamming O.J., Gad H.H., Paludan S., Hartmann R. Lambda Interferons: New Cytokines with Old Functions. *Pharmaceuticals.* 2010, 3: 795-809; doi:10.3390/ph3040795.
24. Hermann M., Bogunovic D. ISG15: in sickness and in health. *Trends Immunol* (2017) 38:79-93.10.1016/j.it.2016.11.001.
25. Hillyer P., Mane V.P., Schramm L.M. et al. Expression profiles of human interferon-alpha and interferon-lambda subtypes are ligand- and cell-dependent. *Immunol. Cell. Biol.* 2012 Jan 17. doi: 10.1038/icb.2011.109.
26. Isaacs A., Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* (1957) 147:258-67.10.1098/rspb.1957.0048.
27. Kiefer K., Oropallo M.A., Cancro M.P., Marshak-Rothstein A. Role of type I interferons in the activation of autoreactive B cells. *Immunol. Cell. Biol.* 2012, 90(5):498-504. doi: 10.1038/icb.2012.10.
28. Kirchner H., Kleinicke C., Digel W. A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. *J. Immunol. Methods.* 1982, 48(2):213-219.
29. Kopitar-Jerala N. The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. *Front Immunol.* 2017, 8: 873. doi: 10.3389/fimmu.2017.00873.
30. Kotenko S.V., Gallagher G., Baurin V.V. et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 2003, 4(1):69-77.
31. Lee S., Baidridge M.T. Interferon-Lambda: A Potent Regulator of Intestinal Viral Infections. *Front Immunol.* 2017, 8:749. doi: 10.3389/fimmu.2017.00749. eCollection 2017.
32. MacMicking J.D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat. Rev. Immunol.* (2012) 12:367-82.10.1038/nri3210.
33. Mangan N.E., Fung K.Y. Type I interferons in regulation of mucosal immunity. *Immunol Cell Biol.* 2012, 90(5): 510-519. doi: 10.1038/icb.2012.13.
34. McNab F., Mayer-Barber K., Sher A. et al. Type I interferons in infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* (2015) 15:87-103.10.1038/nri3787.
35. Meunier E., Broz P. Interferon-inducible GTPases in cell autonomous and innate immunity. *Cell. Microbiol.* (2016) 18:168-80.10.1111/cmi.12546.
36. Musella M., Manic G., De Maria R. et al. Type-I-interferons in infection and cancer: Unanticipated dynamics with therapeutic implications. *Oncoimmunology.* 2017; 6(5):e1314424. doi: 10.1080/2162402X.2017.1314424. eCollection 2017.
37. Ospelnikova T.P., Morozova O.V., Isaeva E.I. et al. Respiratory Viruses and Proinflammatory Cytokines Imbalance in Adults and Children with Bronchial Asthma. *Journal of Infectious Diseases. Preventive Medicine, an open access journal.* ISSN: 2329-8731. 2016; Volume 4, Issue 2, 1000138. DOI: 10.4172/2329-8731.1000138.
38. Pilla-Moffett D., Barber M.F., Taylor G.A., Coers J. Interferon-inducible GTPases in host resistance, inflammation and disease. *J. Mol. Biol.* (2016) 428:3495-513. 10.1016/j.jmb.2016.04.032.
39. Pitha J., Adams R., Pitha P.M. Viral probe into the events of cellular (in vitro) aging. *J. Cell Physiol.* 1974; 83(2):211-8.
40. Rauch I., Müller M., Decker T. The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAKSTAT* (2013) 2:e23820.10.4161/jkst.23820.
41. Razaghi A., Villacres C., Jung V. et al. Improved therapeutic efficacy of mammalian expressed-recombinant interferon gamma against ovarian cancer cells. *Exp. Cell. Res.* 2017 Aug 10. pii: S0014-4827(17)30425-1. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.08.014.

42. Richmond J.Y., Polatnick J., Knudsen R.C. Microassay for interferon, using [3H]uridine, microculture plates, and a multiple automated sample harvester. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, 39(4): 823-827.
43. Rubinstein S., Familletti P.C., Pestka S. Convenient assay for interferons. *J. Virol.* 1981, 37(2):755-758.
44. Sidwell R.W., Huffman J.H. Use of disposable micro tissue culture plates for antiviral and interferon induction studies. *Appl. Microbiol.* 1971; 22(5):797-801.
45. Sui H., Zhou M., Imamichi H. et al. STING is an essential mediator of the Ku70-mediated production of IFN- λ 1 in response to exogenous DNA. *Sci Signal.* 2017; 10(488). Pii: eaah5054. doi: 10.1126/scisignal.aah5054.
46. Tilles J.G., Finland M. Microassay for Human and Chick Cell Interferons. *Applied Microbiology.* 1968; 16 (11):1706-1707.
47. Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *J. Exp. Med.* (2010) 207:2053—63.10.1084/jem.20101664.
48. Ueno H., Klechevsky E., Morita R. et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* 2007 Oct;219:118-142.
49. Wang S., Sun X., Yi C. et al. Negatively Regulates Type I Interferon Signaling Pathway by Competition Binding IRF3 with CBP/p300. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017, 7:195. doi: 10.3389/fcimb.2017.00195. eCollection 2017.
50. Yoshizumi T., Imamura H., Taku T. et al. RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity. *Sci. Rep.* 2017, 7(1):5379. doi: 10.1038/s41598-017-05808-w.
51. Zha Z., Bucher F., Nejatfard A., Zheng T. et al. Interferon- γ is a master checkpoint regulator of cytokine-induced differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. pii: 201706915. doi: 10.1073/pnas.1706915114.

Поступила 06.08.18

Контактная информация: Оспельникова Татьяна Петровна, к.м.н.,
105064, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

В.И.Тынянова, Е.П.Соколова, В.П.Зюзина, Г.В.Демидова

ТОКСИГЕННОСТЬ YERSINIA PESTIS

Ростовский-на Дону НИИ противочумный институт

Yersinia pestis относится к числу патогенных бактерий, функцию токсина у которых выполняет структурный компонент клеточной стенки — липополисахарид (ЛПС). Для проявления токсического действия полимер должен быть отделен от внешней мембраны клетки и представлен рецепторам иммунокомпетентных клеток макроорганизма в функционально активной форме. В обзоре проанализирована и обобщена информация отечественных и зарубежных исследователей о токсигенных свойствах *Y. pestis*. Представлены результаты собственных экспериментов, которые свидетельствуют о том, что бактерии чумы способны экспортировать ЛПС в окружающую среду. Процесс является естественной функцией живой клетки, реализуется при температуре 37°C и строго зависит от экспрессии генов внехромосомных элементов наследственности *Y. pestis* — *pMT1*, *pCD1*, *pPCP1*. На примере изогенных вариантов вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 и вирулентного штамма *Y. pestis* 231, содержащих различный набор плазмид, установлено, что максимальный вклад в активацию высокотемпературного ЛПС *Y. pestis* и переводу его в экстрацеллюлярную форму вносят белки плазмиды *pCD1*. Значение белка — «мышинного» токсина, кодируемого плазмидой *pMT1*, менее выражено. Участие плазмиды *pPCP1* в проявление токсигенных свойств не обнаружено. Обсуждается роль капсульной субстанции *Y. pestis* и значение

биологически активных факторов макроорганизма в реализации токсического потенциала ЛПС *Y. pestis*. Функциональная взаимосвязь между транслокацией белков, кодируемых плазмидами, и процессом токсигенности *Y. pestis* установлена впервые и отражает биологическую уникальность возбудителя чумы.

Журн. микробиол. 2019, № 3, С. 99—109

Ключевые слова: *Y. pestis*, плазмиды, липополисахарид, токсигенность

V.I.Tyryanova, E.P.Sokolova, V.P.Zyuzina, G.V.Demidova

YERSINIA PESTIS PATHOGENICITY

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

Yersinia pestis belongs to those pathogenic bacteria which produce lipopolysaccharide (LPS) having the function of a toxin. In order to make a toxic effect the polymer must be separated from the cell outer membrane and presented to the immunocompetent cell receptors of the host in the functionally active form. In this review data of russian and foreign investigators on *Y. pestis* toxigenic properties was presented. Results of the authors' own experiments showing that *Y. pestis* is able to export LPS into the surrounding medium are included. This process is a natural function of the living cell, is realized at 37 degrees C and is strictly dependent on the expression of *Y. pestis* genes of extrachromosomal inheritance, pMT1, pCD1, pPCP1. By the use of isogenic variants of *Y. pestis* EV76 vaccine strain and virulent 231 strain containing different plasmid combinations, it was established that maximum contribution in the activation of «high-temperature» LPS and its transformation into extracellular form made the proteins encoded by pCD1. The significance of the «murine» toxin encoded by pMT1 plasmid was less pronounced. The participation of pPCP1 plasmid in the toxic effect was not discovered. The role of *Y. pestis* capsular substance and the significance of biologically active factors in the realization of *Y. pestis* LPS toxic potential is discussed. Functional relationship between translocation of the proteins encoded by plasmids and *Y. pestis* toxigenicity suggests *Y. pestis* biological uniqueness.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 99—109

Key words: *Y. pestis*, plasmids, lipopolysaccharide, toxicity

Известно, что возбудитель чумы — типичный представитель токсикоинфекций, и развитие заболевания при всех клинических формах сопровождается выраженной и прогрессирующей интоксикацией макроорганизма. Основным патогенетическим фактором *Y. pestis*, выполняющим функцию токсина, является структурный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий — липополисахарид (ЛПС) [2, 7, 38]. Этот гетерополимер относится к биологически активным веществам опосредованного действия. Для проявления его токсических свойств необходимо отделение ЛПС от внешней мембраны бактерий и представление рецепторам иммунокомпетентных клеток макроорганизма в свободной функционально активной форме. В опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что целые клетки *Yersinia pestis* и выделенные из них препараты ЛПС обладают различными иммуномодулирующими свойствами [40, 41]. Максимальное воздействие на рецепторный комплекс TLR4/MD2 оказывает свободная форма ЛПС. В то же время, эффект действия ЛПС, связанного с бактериальной клеткой, незначителен. Объясняется это тем, что токсически активная часть ЛПС (липид А) жестко фиксирована физико-химическими связями с биополимерами внешней мембраны бактерий, что исключает его участие в активации фагоцитарных клеток макроорганизма.

Из данных литературы известно, что ЛПС грамотрицательных бактерий в свободной форме в небольших количествах может высвобождаться в среду при делении клеток, при разрушении бактерий в процессе фагоцитоза, под действием комплекса

белков системы комплемента и при действии антибиотиков, а также обнаруживается в составе бактериальных везикул [29]. Особенность патогенных бактерий, токсический компонент которых представлен ЛПС, состоит в том, что источником функционально активной формы ЛПС являются не разрушенные, как это было принято считать ранее, а живые бактерии, которые способны выделять ЛПС клеточной стенки во внешнюю среду, подобно секреции экзотоксинов белковой природы [48].

Предположение о наличии токсина у *Y. pestis* и высокой токсигенности вирулентных штаммов было высказано впервые А. Иерсином сразу же после открытия им этого микроорганизма (цит. по Домарадскому И.В.) [8]. В дальнейшем изучению природы токсина *Y. pestis* было посвящено большое количество научных работ. Однако факт гипертоксичности *Y. pestis*, который не вызывал сомнения у практикующих врачей, долгое время не мог найти экспериментального подтверждения. Результаты многочисленных опытов по выявлению токсической субстанции *Y. pestis* в средах культивирования бактерий и их фильтратах не имели успеха [8]. Объяснить причину неудач удалось относительно недавно после того, как были получены новые сведения о структурно-функциональной организации ЛПС *Y. pestis*. В начале 2000-х годов практически одновременно были опубликованы работы японского исследователя Kawahara К., затем российских ученых Книрель Ю. и др., которые впервые доказали, что синтез ЛПС у *Y. pestis* регулируется температурой, а изменения химической структуры ЛПС при переходе от низко- к высокотемпературному режиму культивирования бактерий чумы направлены не на усиление токсических свойств ЛПС, а напротив, на снижение его биологической активности [4, 35, 37]. Модификация, которую претерпевает ЛПС 37, приводит практически к полной утрате его токсических свойств: препарат малотоксичен или вообще нетоксичен для биопробных животных и является слабым индуктором провоспалительных цитокинов [1, 18, 23, 42]. Низкая биологическая активность ЛПС 37 могла быть причиной отрицательных результатов опытов по выявлению ЛПС *Y. pestis* в среде инкубации бактерий. Тем не менее три- и тетраацилированные формы липида А, свойственные ЛПС 37, являются обязательным условием для проявления вирулентных свойств *Y. pestis* в условиях *in vivo* [42].

Основополагающей работой, которая определила вектор нового направления исследований, послужили данные, опубликованные А.Н. Кравцовым с соавторами в 1993 г. [14]. Этой группой исследователей был описан феномен повышения вирулентных свойств бактерий чумы в условиях *in vitro* под влиянием биологически активного вещества (БАВ), присутствующего в эритроцитах крови и тканях паренхиматозных органов млекопитающих. При этом отмечены два важных момента: для проявления феномена необходима предварительная инкубация клеток при температуре 37°C, а усиление вирулентных свойств имеет фенотипический характер.

В дальнейшем результаты исследования этого явления были изложены в ряде научных публикаций [18, 20—22]. Выяснено, что биологически активное вещество представляет собой низкомолекулярное соединение с выраженными полярными свойствами и относится к классу гликолипидов. Повышение вирулентности бактерий чумы под его влиянием связано с активацией ЛПС, присутствующего в капсульном веществе *Y. pestis*. Как известно, капсула *Y. pestis* представляет собой сложно организованную надмолекулярную структуру, которую формирует специфический белок CafI (F1) [2, 3, 13]. Биологическая особенность капсулы *Y. pestis* заключается в том, что она не имеет жесткой связи с поверхностными структурами клетки, легко отделяется от них и диффундирует во внешнюю среду. Состав капсульного вещества гетерогенен, и, по данным ряда авторов, содержит ЛПС и специфический белок

Y. pestis избирательной токсичности — «мышинный» токсин (МТ) [10, 12, 18, 24]. Однако, несмотря на присутствие обеих токсических субстанций, внутрибрюшинное введение капсульного вещества биопробным животным даже в очень высоких дозах — 100 — 200 мкг на мышь и 1 — 3 мг на морскую свинку — не приводит к их гибели. Если же на капсульную субстанцию, отделенную от клеток, воздействовать биологически активным веществом, то инокулят становится токсичным для обоих видов животных. Летальным эффектом обладает инокулят, содержащий чрезвычайно малые количества токсических веществ (0,052 мкг МТ и 36 мкг ЛПС для мышей и 0,5 мкг МТ и 360 мкг ЛПС для морских свинок) [18, 20]. Переход от биологически инертного к токсически активному состоянию объясняется изменением физико-химических свойств капсульного вещества под влиянием БАВ [21]. Экспериментально установлено, что БАВ уменьшает плотность упаковки полимеров, увеличивает вязкость капсулы и изменяет молекулярную организацию составляющих ее компонентов. Нарушение слабых взаимодействий меняет пространственную ориентацию биополимеров капсульного вещества, в том числе и ЛПС. По нашим данным, модификация ЛПС под влиянием БАВ заключается в трансформации трехмерной структуры полимеров ЛПС в токсически активную форму. В этих же условиях модулятором токсических свойств ЛПС может быть МТ, который образует комплекс ЛПС-МТ, высокотоксичный как для мышей, так и для морских свинок [17]. В обоих случаях — под влиянием БАВ и МТ — модификация ЛПС заключается в формировании токсически активной конформации полимера без изменения его первичной химической структуры. Таким образом, реализация токсического потенциала ЛПС представляет собой цепь последовательных реакций, в которых принимают участие капсульное вещество бактерий, а также факторы микро- и макроорганизма [22].

В настоящей работе мы акцентировали внимание на изучении первого этапа этого процесса — экспорте ЛПС от внешней мембраны клеточной стенки в капсульное вещество бактерий чумы. Вопрос о том, как и каким образом этот процесс осуществляется, не обсуждался и не имеет научного объяснения. В то же время, присутствие ЛПС в составе капсулы могло быть случайным событием или же результатом активного транспорта ЛПС за пределы бактериальной клетки [13, 25, 28]. Анализ данных литературы об экспортирующих системах микроорганизмов и результаты собственных исследований позволили нам предположить, что процесс образования внеклеточной формы ЛПС функционально связан с активностью резидентных плазмид *Y. pestis* — pMT1, pCD1 и pPCP1. Эти внехромосомные элементы наследственности определяют вирулентные свойства *Y. pestis* [2, 15, 23, 26]. Особенность их функциональной организации заключается в том, что белки, кодируемые плазмидами, не принимают участия в метаболических процессах клетки, а транслоцируются на внешнюю поверхность клеточной стенки бактерий или же секретируются в окружающую среду [13, 27, 30, 31, 36, 38, 44, 45]. Такая «внеклеточная» локализация белков позволяет им вступать в непосредственный контакт с молекулярными структурами макроорганизма. В зависимости от биохимических свойств полимеров их взаимодействие инициирует развитие патологических процессов различной направленности. Все это давало основание полагать, что процесс токсигенности *Y. pestis* как свойство патогена синтезировать и выделять ЛПС во внешнюю среду может быть сопряжен с системой экспорта белков, кодируемых плазмидами *Y. pestis*. Для проверки этого предположения была изучена способность штаммов *Y. pestis*, содержащих разный состав плазмид, продуцировать внеклеточную форму ЛПС.

Экспериментальная работа выполнена на вакцинном штамме *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) и высоковирулентном *Y. pestis* 231 LD₅₀=3 + 20 м. к./мышь

(pMT1, pCD1, pPCP1). Из вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 были получены бесплазмидный вариант (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) и варианты, содержащие одну из плазмид: *Y. pestis* EV76 (pMT1); *Y. pestis* EV76 (pCD1); *Y. pestis* EV76 (pPCP1). Отсутствие интеграции плазмид с хромосомной ДНК было подтверждено методом ПЦР с праймерами, комплементарными плазмидным генам *safl* (плазмида pMT1), *lcrV* (плазмида pCD1) и *pla* (плазмида pPCP1). Бесплазмидный вариант штамма *Y. pestis* EV76 депонирован в Государственной Коллекции патогенных бактерий под № КМ 1279 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов). Бесплазмидный вариант вирулентного штамма *Y. pestis* 231 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) любезно предоставлен доктором медицинских наук, профессором А. П. Анисимовым (ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). Выбор вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 для проведения настоящего исследования не случаен. Клетки этого штамма не способны преодолевать неспецифический иммунный барьер макроорганизма и не вызывают гибели животных при внутрибрюшинном введении дозы $1 \cdot 10^8$ м.к./мышь. В то же время, основной патогенетический фактор — эндотоксин — у этого штамма сохранен и его действие проявляется при внутривенном введении бактерий биопробным животным [49, 50] или же в условиях, описанных нами ранее [14, 16].

Для выяснения вопроса о функциональной взаимосвязи между экспрессией генов резидентных плазмид и токсигенными свойствами *Y. pestis* использовали три методических приема тестирования ЛПС, чувствительность которых и принцип действия различен: модель инфекционно-токсического шока, описанная А.Н. Кравцовым и др. [14, 16], модель сенсбилизации биопробных животных D-галактозамином (D-Gal) [5, 32] и LAL-тест (набор E-TOXATE, Sigma, USA) [43]. Первые два метода позволяют судить о присутствии функционально активной формы ЛПС в среде инкубации бактерий по ее токсичности для биопробных животных, но механизмы действия ЛПС на клетки иммунной системы макроорганизма в этих двух случаях различны. Модель, предложенная Кравцовым А.Н., основана на трансформации ЛПС из биологически инертного в токсически активную форму в условиях *in vitro*. Процесс валиден терминальной стадии инфекции и осуществляется под влиянием БАВ, присутствующего в гемолизованных эритроцитах крови и тканях паренхиматозных органов млекопитающих. В условиях макроорганизма токсическое действие ЛПС реализуется через рецепторный комплекс TLR4/MD2 фагоцитозных клеток и инициирует развитие инфекционно-токсического шока [16, 22]. Чувствительность метода, определенная для ЛПС37 вакцинного штамма *Y. pestis* EV76, который в обычных условиях не токсичен для биопробных животных, составляет LD₅₀ 520 + 610 мкг/мышь [18]. В случае с D-галактозамином (D-GalN) механизм токсического действия ЛПС на макроорганизм иной — провоспалительный цитокин TNF- α , синтез которого индуцирует ЛПС, активирует специфические рецепторы апоптоза исключительно клеток печени (FasR/ApoI), что приводит к гибели гепатоцитов и организма в целом. На фоне D-GalN различия токсических свойств препаратов ЛПС 37 нивелируются. Чувствительность к ЛПС37 вакцинного штамма в условиях D-GalN равна 10 — 20 мкг/мышь [5], т. е. выше приблизительно в 100 раз по сравнению с моделью инфекционно-токсического шока. Оба метода высокоэффективны для детекции свободной формы ЛПС *Y. pestis* в условиях *in vivo*.

Универсальной тест-системой, которая в равной мере чувствует как свободную, так и связанную с клеточной стенкой бактерий форму ЛПС является белковый лизат мечехвоста *Limulus polyphemus*, известный в фармакопейной практике как LAL-тест. Его гемолимфа обладает уникальной способностью переходить в гелеобразное состояние при взаимодействии с липидом А граммотрицательных бак-

терий. Ферментативная система, катализирующая эту реакцию, высокоспецифична и высокочувствительна (0, 125 EU/ml). В экспериментах с препаратами ЛПС *Y. pestis* различной степени токсичности мы установили, что пирогенная активность их одинакова, и минимальная концентрация ЛПС37 *Y. pestis* EV76, катализирующая гелеобразование, составляет 10 мкг/мл.

Все эксперименты были выполнены на клетках *Y. pestis*, выращенных на плотной питательной среде при 37 °С в течение 18 — 24 часов. В случае использования модели инфекционно-токсического шока клетки *Y. pestis* инкубировали в гемолизированных эритроцитах крови человека, как описано А.Н. Кравцовым и др. [14]. При использовании LAL-теста и модели D-GalN внеклеточную форму ЛПС тестировали в супернатантах и фильтратах клеток *Y. pestis*, полученных следующим образом. Клетки *Y. pestis*, выращенные при 37 °С в течение 18-24 ч, суспендировали в физиологическом растворе NaCl (1×10^{10} м.к./мл), полученную взвесь инкубировали 3 часа при 37 °С, инактивировали клетки кипячением в течение 30 мин и осаждали центрифугированием при 12000 об./мин в течение 5 мин. Супернатант содержал 1×10^3 — 1×10^4 м.к./мл. Для полного удаления клеток пробы фильтровали через стерильные мембранные фильтры Millex GR (0,22 μ m, «Merck» Millipore Ltd). О присутствии функционально активной формы ЛПС на моделях инфекционно-токсического шока и D-GalN судили по гибели животных в течение первых двух суток наблюдения (в тексте представлены выраженные в процентах крайние значения гибели животных, полученные в серии экспериментов).

Для выяснения принципиального вопроса — играют ли роль резидентные плазмиды *Y. pestis* в образовании внеклеточной формы ЛПС — на первом этапе работы были изучены токсигенные свойства штаммов *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) и *Y. pestis* 231 (pMT1, pCD1, pPCP1), содержащих полный набор плазмид, и их бесплазмидных вариантов: *Y. pestis* EV76 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) и *Y. pestis* 231⁻ (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻). Объектом исследования являлись супернатанты клеток и их бесклеточные фильтраты, полученные в описанных выше условиях. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что токсигенные свойства полноценного и бесплазмидного вариантов *Y. pestis* отличаются друг от друга и эти различия имеют не количественный, а качественный характер. Так, все тест-системы регистрируют ЛПС в супернатантах и фильтратах клеток *Y. pestis* EV 76 и *Y. pestis* 231, имеющих полноценный набор плазмид. На моделях инфекционно-токсического шока и D-GalN это выражалось в гибели 80 — 100% биопробных животных в течение первых двух суток наблюдения. Ферментативный LAL-тест регистрировал в фильтратах вакцинного штамма активность ЛПС, равную 32,05 EU/ml. В то же время, супернатанты и фильтраты бесплазмидных вариантов *Y. pestis* EV76 и *Y. pestis* 231 не токсичны для мышей и реакция с LAL-тестом давала отрицательный результат. На модели биопробных животных столь же четкие различия токсигенных свойств были выявлены между живыми и убитыми кипячением клетками полноценного вакцинного штамма *Y. pestis* EV76. Среда инкубации живых бактерий была токсичной для мышей, а супернатанты и фильтраты, полученные после инкубации инактивированных клеток, токсическим эффектом не обладали. Качественные различия между полноценными и бесплазмидными вариантами *Y. pestis* EV76 подтверждают также результаты опытов по внутривенному введению культур биопробным животным. Введение клеток полноценного вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 в хвостовую вену в количестве $1 \cdot 10^8$ м. кл. вызывало развитие типичного инфекционного процесса. Бесплазмидные варианты *Y. pestis* в тех же условиях не проявляли токсических свойств, и гибели животных не наблюдалось [6, 11, 19].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о функциональной взаимосвязи между резидентными плазмидами и процессом токсигенности *Y. pestis*. Впервые установлено, что клетки *Y. pestis*, содержащие полноценный набор плазмид, способны освобождать ЛПС во внешнюю среду, и этот процесс не связан с разрушением бактерий, а является функцией живых клеток возбудителя чумы. Варианты *Y. pestis*, лишенные внехромосомных элементов наследственности, такой способностью не обладают. Видимо, процесс сопряжен с транслокацией белков, кодируемых плазмидами pMT1, pCD1, pPCP1, на поверхность клетки либо во внешнюю среду. Можно было а priori предположить, что перемещение ЛПС-белкового комплекса изменяет архитектуру внешней мембраны клетки. В этом случае клетки *Y. pestis*, содержащие и не содержащие плазмидные репликоны, могут существенно различаться не только по количественно-качественному составу белков внешней мембраны, но возможно, и по стерической ориентации молекул ЛПС. Для проверки этого предположения изучили способность ферментов LAL-теста реагировать непосредственно с ЛПС клеточной стенки бактерий чумы. Опыты были выполнены на интактных и инактивированных кипячением клетках вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 с полноценным составом плазмид и с его бесплазмидным вариантом. Как выяснилось, ферментативный каскад LAL-теста вступает в реакцию с ЛПС клеточной стенки бактерий, имеющих полноценный набор плазмид. При этом положительная реакция отмечается в пробах как с интактными, так и с инактивированными клетками *Y. pestis* EV76. Чувствительность реакции очень высокая, гелеобразование наблюдается в пробах, содержащих 10 м.к./мл. В экспериментах с бесплазмидным вариантом *Y. pestis* EV76 ЛПС не тестируется ни в свободном, ни в связанном состоянии [19].

Видимо, в клетках *Y. pestis* EV76, лишенных плазмид, стерическое расположение молекул ЛПС типично для грамотрицательных бактерий. Цепи ЛПС формируют упорядоченную структуру со строгой ориентацией полярных/неполярных полюсов полимера. При этом полисахаридная часть направлена на внешнюю сторону бактериальной клетки, а базальная зона и гликолипидная область ЛПС максимально удалены от наружной поверхности и связаны как с цитоплазматической мембраной, так и с пептидогликаном клеточной стенки. При такой ориентации молекул ЛПС доступность липида А (даже в случае R-хемотипа ЛПС) для взаимодействия с белками-ферментами, расположенными за пределами бактериальной клетки, весьма ограничена. У бактерий *Y. pestis*, имеющих стандартный набор плазмид, архитектура клеточной стенки определяется белками, кодируемыми плазмидами pMT1, pCD1 и pPCP1. Видимо, при образовании ЛПС-белкового комплекса в силу стереохимических особенностей полимеров происходит изменение пространственной ориентации молекулы ЛПС. В результате инверсии полярных/неполярных полюсов гликолипидная область ЛПС экспонируется на внешней мембране клеток и стерически становится доступной для взаимодействия с ферментативной системой LAL-теста. Вопрос о молекулярных механизмах этого процесса может быть предметом специальных исследований. В рамках настоящей работы была предпринята попытка оценить роль каждой из плазмид в реализации токсигенных свойств *Y. pestis*.

На модели D-GalN и инфекционно-токсического шока установлено, что токсичность среды инкубации клеток *Y. pestis* EV76, содержащих различный набор плазмид, достоверно отличается друг от друга и варьирует в пределах от 0 до 100%. Так, супернатанты и фильтраты полноценного штамма *Y. pestis* EV76 вызывают 80—100% гибель животных в течение первых двух суток наблюдения. После введения мышам супернатанта/фильтрата *Y. pestis* EV76 (pCD1), содержащего плазми-

ду кальцийзависимости, погибало от 40 до 60 % животных, вариант *Y. pestis* EV76 (pMT1) вызывал гибель 10 — 20% мышей. При введении супернатанта/фильтрата *Y. pestis* EV76 (pPCP1), содержащего только плазмиду пестициногенности, гибели животных вообще не наблюдалось. Супернатант бесплазмидного варианта *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) в аналогичных условиях также не обладает токсическими свойствами [6, 11]. Данные, полученные на модели биопробных животных, полностью совпадают с результатами экспериментов с использованием LAL-теста. Супернатанты/фильтраты клеток *Y. pestis* EV76, содержащих полный набор плазмид, и изогенные варианты штамма *Y. pestis* EV76, имеющие по одной плазмиде — pCD1 или же pMT1, в LAL-тесте дают положительный результат. Согласно результатам ЛАЛ-теста, количество ЛПС в супернатантах *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) равно 32,05(EU/ml), соответственно в супернатантах *Y. pestis* EV76 (pCD1) — 16,02 (EU/ml) и в супернатантах *Y. pestis* EV76 (pMT1) — 8,00 (EU/ml). В супернатантах/фильтратах клеток штаммов *Y. pestis* EV76 с плазмидой pPCP1 и бесплазмидного варианта ЛПС не выявляется [19].

Таким образом, установлено, что отделение ЛПС от клеточной мембраны бактерий во внешнюю среду происходит под влиянием белков, кодируемых плазмидами *Y. pestis*. При этом процесс ЛПС-белковых взаимодействий является основополагающим. В зависимости от химической структуры биополимеров их соединение может изменять функциональную активность как ЛПС, так и белковой молекулы. Наиболее изучен в настоящее время комплекс высокотемпературного ЛПС с Pla белком плазмиды пестициногенности pPCP1, ассоциация которых приводит к ЛПС-зависимому фолдингу Pla [9, 36, 47]. Результаты наших опытов предполагают, что химическая связь между белком Pla и ЛПС в этом комплексе осуществляется через липид А, что блокирует его функционально активные группы. Возможность ассоциации ЛПС с MT была установлена нами ранее. В этом комплексе, в отличие от ЛПС-Pla, связь осуществляется через коровую область ЛПС, в результате чего высокотемпературный ЛПС трансформируется из неактивной в токсически активную форму [17, 18].

Участие белков, кодируемых плазмидой pCD1, в реализации токсического потенциала ЛПС установлено нами впервые. Плазида кальцийзависимости pCD1, как известно, определяет синтез более чем 25 белков различного функционального действия (структурные белки аппарата секреции T3SS, эффекторные Yops и регуляторные белки) [3, 27, 30, 44, 46]. На основании имеющихся данных не представляется возможным сказать, какие из белков взаимодействуют с ЛПС. В настоящий момент можно лишь констатировать тот факт, что белки, кодируемые pCD1, вносят максимальный вклад в активацию высокотемпературного ЛПС *Y. pestis* и способствуют переводу его в экстрацеллюлярную форму.

Обращает на себя внимание тот факт, что в комплексе ЛПС-белок белковый компонент является переменной величиной и может быть представлен Pla, MT и белком/белками pCad. В то время как ЛПС — консервативная часть комплекса и химическая структура высокотемпературного ЛПС играет исключительную роль в формировании внеклеточной формы ЛПС. По данным Montminy S. et al. генетический мутант вирулентного штамма *Y. pestis* KIM1001-pLpxL с конститутивным синтезом гексагональной формы липида А (аналог ЛПС26) утрачивает вирулентные свойства для биопробных животных при наличии всех известных детерминант вирулентности [42]. В то же время, такой же по структуре ЛПС37, выделенный из бактерий аттенуированного штамма *Y. pestis* KIM5-pLpxL, активизирует TLR4/MD2 рецептор и обладает выраженной цитокинпродуцирующей способностью. Видимо,

мутант вирулентного штамма *Y. pestis* KIM1001-pLpxL имеющий ЛПС низкотемпературного строения, утрачивает свойства токсигенности.

Переход ЛПС от связанного к свободному состоянию — это центральный момент патогенетического действия ЛПС, и особая роль в реализации этого процесса принадлежит, по нашему мнению, капсульному веществу *Y. pestis*. Результаты экспериментов ряда исследователей свидетельствуют о том, что капсула является носителем токсина чумного микроба [10, 12, 13, 24]. Предполагаем, что при отделении капсульного вещества от клеток все биомолекулы, находящиеся на поверхности внешней мембраны и не имеющие ковалентной связи с близлежащими полимерами, включая молекулы ЛПС, «стягиваются» вместе с капсулой в окружающую среду. Накопление ЛПС в составе капсульной субстанции происходит пропорционально росту и размножению бактерий в организме инфицированного хозяина. По мере отделения от бактериальной клетки под воздействием литических ферментов и БАВ макроорганизма упорядоченная структура капсулы нарушается. При этом происходит разрыв слабых связей между полимерами и устанавливаются новые межмолекулярные взаимодействия в соответствии с законами биоэнергетики. Токсически активная форма ЛПС в этой гетерогенной системе может быть представлена как комплексом ЛПС-белок макроорганизма (ЛПС-LBP), так и комплексами ЛПС с белками *Y. pestis* (ЛПС-МТ и ЛПС-белок/белки PCD1). Дублирование функции гарантирует надежность системы в целом, в данном случае — токсического эффекта ЛПС. Дальнейшее взаимодействие ЛПС-белковых комплексов с TLR4/MD2 миелоидных клеток макроорганизма канонично и осуществляется по схемам, описанным ранее [22]. Трансформация функциональных свойств ЛПС *Y. pestis* от структурного компонента клеточной стенки бактерий до биологически активного полимера токсического действия, изложенная в настоящем обзоре, может служить ярким примером суммарного эффекта взаимодействия физических и химических факторов макро- и микроорганизмов. Динамику этого процесса можно представить следующим образом: экспрессия генов *Y. pestis* высокотемпературного генотипа [33, 39] —> взаимодействие полимеров, синтез которых детерминирован хромосомными и плазмидными репликациями с образованием ЛПС-белковых комплексов —> транслокация этих комплексов на поверхность клеточной стенки бактерий —> аккумуляция ЛПС в составе капсульного вещества *Y. pestis* и отделение капсулы от бактериальной клетки —> активация ЛПС-белковых комплексов, содержащихся в составе капсульного вещества, биологически активными факторами макроорганизма.

Таким образом, экспериментальные данные, представленные в настоящем обзоре, свидетельствуют о том, что процесс токсигенности *Y. pestis* как способность патогена синтезировать и продуцировать токсин в окружающую среду высокоспецифичен и в полной мере отражает биологическую уникальность *Y. pestis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрюков Б.Г., Сомова А.М., Тимченко Н.Ф. Исследование температурозависимых молекулярных механизмов развития инфекций — ключ к созданию современных профилактических средств. СТМ. 2016, 8(3):137-150.
2. Анисимов А. П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1. Мол. генетика, микробиол. и вирусол. 2002, 3:3-23.
3. Бывалов А.А., Оводов Ю.С. Иммунобиологические свойства антигенов *Yersinia pestis*. Биоорганическая химия. 2011, 37(4):452-463.
4. Гремякова Т. А. Структурно-функциональная вариабельность антигенов *Yersinia pestis* и методология конструирования противочумных иммунопрофилактических препаратов. Автореф. дисс. докт. мед. наук. Оболенск, 2003.

5. Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П., Пасюкова Н.И., Беспалова И.А., Бородина Т.Н., Тынянова В.И. Токсичность различных форм липополисахаридов *Y. pestis* для белых мышей, сенсibilизированных Д-галактозамином. Проблемы особо опасных инфекций. 2014, 4:75-77.
6. Демидова Г.В., Соколова Е.П., Зюзина В.П., Рыкова В.А., Морозова И.В., Подладчикова О.Н., Тынянова В.И. Влияние внехромосомных элементов наследственности на токсические свойства *Yersinia pestis*. Журн. микробиол. 2017, 2:28-33.
7. Дмитриевский А. М. Токсический компонент патогенеза чумного инфекционного процесса: инфекционно-токсический шок. Профилактика и меры борьбы с чумой. Алматы, 1994.
8. Домарадский И.В. Очерки патогенеза чумы М., Медицина, 1966.
9. Евсеева В. В. Платонов М. Е., Копылов П. Х., Дентовская С. В., Анисимов А. П. Активатор плазмидогена чумного микроба. Инфекция и иммунитет. 2015, 5(1):27-36.
10. Желтенков А. И. О токсине чумного микроба и антитоксических противочумных сыворотках. Журн. микробиол. 1946, 3:81-82.
11. Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Рыкова В.А., Бородина Т.Н., Подладчикова О.Н., Тынянова В.И. Роль резидентных плазмид в проявлении токсических свойств липополисахарида чумного микроба. В: Обмен веществ при адаптации и повреждении. Дни молекулярной медицины на Дону. Ростов-на-Дону, РостГМУ. 2016:20-24.
12. Исин Ж.М., Тугамбаев Т.И. Структурно-функциональные свойства и биологическая активность капсульного антигена, «мышинного» токсина и эндотоксина *Yersinia pestis*. Журн. микробиол. 1987, 4:91-98.
13. Кадникова Л. А., Копылов П. Х., Дентовская С. В., Анисимов А. П. Капсульный антиген чумного микроба. Инфекция и иммунитет. 2015, 5(3):201-218.
14. Кравцов А. Н. Тынянова В. И., Зюзина В. Повышение вирулентности бактерий *Yersinia pestis* при инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека. Журн. микробиол. 1993, 4:3-6.
15. Подладчикова О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2017, 3:33-40.
16. Рыжко И. В., Мишанькин М. Б., Тынянова В. И., Цураева Р. И., Молдован И.А. Способ прогнозирования клинической эффективности антибактериальных, вакцинных препаратов, средств пассивной антитоксической иммунотерапии на модели инфекционно-токсической формы чумы у мышей. Патент № 2303821 от 27.07.2007.
17. Соколова Е. П., Марченков В. И., Демидова Г. В., Зюзина В.П., Беспалова И.А., Павлович Н.В., Еременко Н.С., Веркина Л.М., Тынянова В.И. Комплексы «мышинного» токсина чумного микроба с модифицированными формами липополисахарида *Yersinia pestis* и с липополисахаридами других бактерий. Биотехнология. 2001, 4:53-58.
18. Соколова Е. П. Механизмы активации токсических субстанций чумного микроба. Автореф. дис. канд. биол. наук. Ростов-на-Дону, 2002.
19. Соколова Е.П., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Тынянова В.И. Роль резидентных плазмид rMT1, pCD1, pPCP1 *Yersinia pestis* в образовании экстрацеллюлярной формы липополисахарида. Проблемы особо опасных инфекций. 2017, 3:85-89.
20. Тынянова В.И., Демидова Г.В., Зюзина В.П., Плетницкий А.Э., Подладчикова О.Н., Гончаров Е.К., Кубанцева Е.П., Беспалова И.А. Влияние биологически активного вещества, усиливающего токсичность чумного микроба, на физико-химические свойства его капсульной субстанции. Биотехнология. 1996, 8:26-30.
21. Тынянова В.И., Демидова Г.В., Зюзина В.П., Анисимов Б.И., Плетницкий А.Э. Гликолипид — биоактиватор токсических субстанций чумного микроба. Биотехнология. 1999, 2:28-33.
22. Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П. Специфичность иммуномодулирующего действия эндотоксина чумного микроба. Журн. микробиол. 2016, 3:104-112.
23. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.В. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002, 4(3):248-266.
24. Andrews G.P., Heath D.G., Anderson G.W. et al. Fraction I capsular antigen (FI) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. Infect. Immun. 1996, 64(6):2180-2187.
25. Botos I., Majdalani N., McCarthy J.G. et al. Structural and functional characterization of the LPS transporter LptDE from gram-negative pathogens. Structure. 2016, 24(6):965-976.

26. Brubaker R.R. Physiology of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016, 918:79-99.
27. Dewoody R.S., Merritt P.M., Marketon M.M. Regulation of the *Yersinia* type III secretion system: traffic control. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013, 6, 3:4. doi: 10.3389.
28. Dodd D.C., Eisenstein B.I. Dependence of secretion and assembly of type I fimbrial subunits of *Escherichia coli* on normal protein export. *J. Bacteriol.* 1984, 159(3):1077-1079.
29. Eddy J., Gielda L., Caulfield A. et al. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One.* 2014, 9 (9): e 107002.
30. Edgren T., Forsberg A., Rosqvist R., Wolf-Watz H. Type III secretion in *Yersinia*: injectisome or not. *PLoS Pathog.* 2012, 8 (5): e1002669.
31. Eren E., van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2012, 8:23971-23976.
32. Galanos C., Freudenberg M. A., Reuter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1979, 76:5939-5943.
33. Han Y., Fang H., Liu L., Zhou D. Genetic regulation of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016, 918:233-256.
34. Huang H.Z., Nicolich M., Linder L. Current trends in plague research: from genomics to virulence. *Clin. Med. Res.* 2006, 4(3):1189-1199.
35. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H. et al. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect. Immun.* 2002, 70(8):4092-4098.
36. Ke Y., Chen Z., Yang R. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013, Dec; 24(3):106.
37. Knirel Y.A., Linder B., Vinogradov E.V. et al. Temperature dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharides of *Yersinia pestis*. *Biochemistry.* 2005, 44:1731-1743.
38. Knirel Y.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties. *Acta Naturae.* 2012, 4(3):46 — 58.
39. Liu L., Fang H., Yang H. et al. Reciprocal regulation of *Yersinia pestis* biofilm formation and virulence by RovM and RovA. *Open Biol.* 2016, 6 (3).pii:150198.
40. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H. et al. Immunomodulatory properties of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010, 17(1):49-55.
41. Matsuura M. Structural Modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative bacteria evasion of host innate immunity. *Front. Immunol.* 2013, 4:109-113.
42. Montminy S., Khan N., McGrath S. et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *J. Nature Immun.* 2006, 7(10):1066-1073.
43. Munford R. Endotoxemia—menace, marker, or mistake? *J. Leukoc Biol.* 2016 Oct; 100(4):687-698.
44. Pha K., Navarro L. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. *World J. Biol. Chem.* 2016, 7(1):1-13.
45. Runco L.M., Myrczek S., Bliska J.B., Thanassi D.G. Biogenesis of the FI capsule and analysis of the ultrastructure of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 2008, 190 (90):3391-3385.
46. Schneewind O. Classic spotlight: Studies on the low-calcium response of *Yersinia pestis* reveal the secrets of plague pathogenesis. *J. Bacteriol.* 2016, 198(15):2018.
47. Suomalainen M., Lobo L., Brandenburg K. et al. Temperature-induced changes in the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* affect plasminogen activation by the Pla surface protease. *Infect. Immun.* 2010, 78(6):2644-2652.
48. Straus D.C., Atkisson D.L., Garner C.W. Importance of a lipopolysaccharide-containing extracellular toxic complex in infections produced by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection Immun.* 1985, 50(3):787-795.
49. Une T., Brubaker R. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in *Yersinia*. *J. Immunol.* 1984, 133:2226-2230.
50. Yang H., Wang T., Tian G. et al. Host transcriptomic responses to pneumonic plague reveal that *Yersinia pestis* inhibits both the initial adaptive and innate immune responses in mice. *Int. J. Med. Microbiol.* 2017, 307 (1):64-74.

Поступила 26.07.18

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

МЕТОД ИММУНО-ПЦР В ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Иммуно-ПЦР (И-ПЦР) объединяет возможности двух современных диагностических методов: иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Такое сочетание обуславливает 100-10000-кратное увеличение чувствительности по сравнению с аналогичным ИФА. В обзоре рассмотрены основные варианты И-ПЦР, приведены примеры возможного использования метода для ранней и ретроспективной диагностики различных заболеваний.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 110—117

Ключевые слова: иммуно-ПЦР, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, связывающие антитела, детектирующие антитела, ДНК-метка

I.A.Barkova, A.M.Barkov, D.V.Viktorov

METHOD OF IMMUNO-PCR IN DIAGNOSTICS OF BACTERIAL AND VIRAL INFECTIONS

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

Immuno-PCR (I-PCR) combines the capabilities of two modern diagnostic methods of enzyme immunoassay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR), combination these methods causes a 100-10000 fold increase in sensitivity compared to a similar ELISA. The review considers the main variants of I-PCR, gives examples of possible use of the method for early and retrospective diagnosis of various diseases.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 110—117

Key words: immuno-PCR, enzyme immunoassay, polymerase chain reaction, capturing antibodies, detecting antibodies, DNA label

ПЦР-амплифицированный иммуноанализ или иммуно-ПЦР (И-ПЦР) представляет собой метод, сочетающий универсальность иммуноферментного анализа (ИФА) с чувствительностью ПЦР. ИФА является часто используемым методом для обнаружения антигенов (АГ), но он не пригоден при низкой концентрации аналита, ПЦР не может обнаруживать молекулы, не являющиеся нуклеиновыми кислотами [29, 32]. Чувствительность И-ПЦР выше ИФА в 10^2 - 10^4 раза. Дизайн И-ПЦР в основном сходен с ИФА, но вместо антивидового конъюгата, меченого ферментом, используется детектирующее антитело (ДА), меченное фрагментом ДНК (ДНК-метка). Определение ДНК-метки производится методом электрофореза или ПЦР в реальном времени. В зависимости от цели исследования И-ПЦР может проводиться в различных вариантах: прямой И-ПЦР, непрямой И-ПЦР, сэндвич-И-ПЦР и непрямой сэндвич-И-ПЦР, в качестве линкера, соединяющего биотинилированное ДА с биотинилированной репортерной ДНК-меткой, используют стрептавидин. В прямом и непрямом И-ПЦР на лунках микротитровальной пластины сорбируют АГ [8, 20, 39]. В сэндвич- и непрямом сэндвич-И-ПЦР на лунках микротитровальной пластины сорбируют антигенспецифические связывающие (capture antibody) антитела (СА) [10, 28].

Предварительная подготовка конъюгатов ДНК-АТ упрощает проведение реакции, при этом отпадает необходимость в ряде инкубационных этапов и снижается

степень неспецифического связывания реагентов [26]. Стрептавидин-биотиновые конъюгаты подходят для всех форматов И-ПЦР, для их создания преимущественно предлагается использовать олигонуклеотид, биотинилированный с одного конца. Niemeier С.М. et al. впервые описали надмолекулярные комплексы, формируемые из биотинилированных с двух концов фрагментов двухцепочечной ДНК, стрептавидина и антител [33]. Рязанцев Д.Ю. с соавторами усовершенствовали методику получения комплексов на основе относительно коротких (60—70 н.) одноцепочечных олигонуклеотидов, биотинилированных с 5'- и 3'-концов, и стрептавидина. Использование подобных надмолекулярных комплексов позволяет усилить специфический сигнал за счет того, что на одну молекулу ДА приходится десятки, а то и сотни молекул ДНК-метки; кроме этого важно, что такая система универсальна [23, 36].

Эффективным способом конъюгации ДА и ДНК является ковалентное связывание. В качестве линкера может быть использовано химическое соединение, такое как succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), что позволяет уменьшить количество промывок по сравнению с анализом на основе стрептавидин-биотин [20, 38]. В настоящее время стали доступны готовые к использованию ковалентные конъюгаты, производимые фирмами Innova Biosciences, Chimera Biotec, или наборы для их изготовления (Thunder-Link® Innova Biosciences; Imperacer® Chimera Biotec). Компания Chimera Biotec представляет конъюгаты АТ-ДНК, имеющие разнообразную специфичность: антиротавирусные [4], против тау-белка, используемого для диагностики болезни Альцгеймера [22] и др.

Преимуществом сэндвич-И-ПЦР по сравнению с прямым И-ПЦР является отсутствие необходимости прямой сорбции антигена из биологических образцов, что снижает неспецифическое связывание и уровень фонового сигнала [26, 33]. Другим способом решения данных проблем является выбор подходящего блокирующего раствора (бычьего сывороточного альбумина, казеина, обезжиренного молока и др.).

Разработаны модификации И-ПЦР анализа на основе фагового дисплея, магнитных гранул, наночастиц золота. Использование магнитных гранул и наночастиц золота в качестве носителя для СА позволяет более тщательно промывать связанный АГ, а также способствует более быстрому взаимодействию между СА и соответствующим АГ [3, 5, 6, 26, 34]. Фаг дисплей-опосредованный И-ПЦР анализ (Phage display-mediated I-PCR; PD-I-PCR) впервые был описан Guo Y.C. et al. [15]. На поверхности рекомбинантного бактериофага M13 экспонируется одноцепочечный варибельный фрагмент антитела (single-chain; scFv) или белок, специфично взаимодействующий с определяемым агентом. Фаговая ДНК выделяется при нагревании и служит в качестве ПЦР-матрицы для амплификации [21, 30].

В И-ПЦР анализе на основе магнитных гранул (Magnetic bead based I-PCR) СА адсорбируется на магнитных шариках для захвата антигена, а затем используется формат сэндвич-И-ПЦР с использованием стрептавидина в качестве линкера между ДА и репортерной ДНК [6].

Дизайн И-ПЦР анализа с использованием наночастиц золота (Gold nanoparticle I-PCR; GNP-I-PCR): СА, адсорбированные на лунках микротитровальной пластины, связываются с АГ, детекция СА-АГ происходит за счет GNP-зонда. GNP-зонд состоит из ДА, ноночастицы золота, несущей ДНК-метку, которая содержит два фрагмента связывающий и сигнальный. Сигнальная ДНК высвобождается при нагревании и количественно оценивается в ПЦР [9].

И-ПЦР анализ с амплификацией на наночастицах (Nanoparticle-amplified I-PCR (NPA-I-PCR) получил название биобаркодинг (biobarcoding assay). Для его про-

ведения используются одновременно магнитные микрочастицы и золотые наночастицы. Магнитные частицы покрывают SA, а золотые — DA и ДНК-меткой. Анализ проводится в формате «сэндвич», образующиеся при этом иммунокомплексы подвергаются магнитной сепарации, после чего от золотых наночастиц при нагревании отщепляется ДНК-метка и детектируется в ПЦР в реальном времени [34].

Хотя метод И-ПЦР применяют уже почти 25 лет, широкую популярность он приобрел у исследователей лишь с 2009 года, в связи с чем, общее число публикаций невелико [36]. Мы не ставили целью описать все особенности, достоинства и недостатки И-ПЦР, а лишь перечислили основные варианты анализа, применяемые в диагностике бактериальных и вирусных инфекций.

И-ПЦР может явиться высокочувствительным лабораторным тестом для ранней диагностики инфекций, вызванных медленно растущими бактериями, требовательными к условиям культивирования. Уровень токсинов, продуцируемых микроорганизмами, не коррелируется с концентрацией возбудителя, что делает метод И-ПЦР уникальным для высокочувствительного определения токсинов в исследуемом образце.

Chang T.S. и Huang S.H. являются авторами сэндвич И-ПЦР для обнаружения β -глюкуронидазы *Escherichia coli*, которая является специфическим маркером для идентификации *E. coli*. Чувствительность составила 0,00001 пг/мл (эквивалентно 40 молекулам глюкуронидазы в мл), что было в 10^8 раз более чувствительным, чем ИФА [7].

Энтерогеморрагическая *E. coli* O157:H7 является возбудителем пищевой токсикоинфекции у людей. Шига-токсин 2 типа (Stx2) считается главной причиной угрожающего жизни гемолитико-уремического синдрома. He X. et al. разработали варианты И-ПЦР в реальном времени для обнаружения Stx2 в контаминированных образцах окружающей среды. В первом варианте были использованы коммерческие моноклональные антитела, при этом чувствительность анализа составила 0,1 пг/мл при определении токсина в фосфатно-буферном растворе, что было в 10000 раз более чувствительным, чем ИФА. Во втором варианте на основе моноклональных антител Stx2-1 и Stx2-2, разработанных авторами, Stx2 в пробах молока был определен в количестве 0,01 пг/мл [16].

Streptococcus pyogenes является возбудителем острого фарингита, пневмонии, сепсиса, ревмокардита и гломерулонефрита. Liang H. et al. использовали моноклональные антитела к группоспецифическому углеводу клеточной стенки, предел обнаружения И-ПЦР составил 10 бактериальных клеток на лунку [20].

Staphylococcus aureus высвобождает мощный фактор вирулентности, протеин А, который, как известно, ингибирует фагоцитоз посредством связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина. Кроме того, *S. aureus* продуцирует токсины, которые являются членами семейства суперантигенов, такие как токсин синдрома токсического шока (TSST), стафилококковые энтеротоксины А (SEA), В (SEB). Huang S.H. и Chang T.S. описали сэндвич-И-ПЦР для идентификации SEA с пределом обнаружения 10^{-17} г/мл (144 молекулы антигена в мл) [17]. Количественный И-ПЦР анализ для обнаружения SEB в чистой культуре и различных продуктах питания, разработанный Rajkovic A. et al., имел чувствительность менее 10 пг/мл. Это примерно в 10 000 выше, чем предел обнаружения набора для флуоресцентного иммуноанализа «VIDAS SET2» BIOMERIEUX [35]. Fischer A. et al. представили И-ПЦР анализ с использованием линкера N-succinimidyl-S-acetyl-thioacetate (SATA) для выявления SEB и SEA. Чувствительность для SEB составила 0,6 пг, а для SEA 6 пг [14]. Рязанцевым Д.Ю. с соавторами были разработаны надмолекулярные комплексы бисбиотинилирован-

ных олигодеоксинуклеотидов со стрептовидином, которые были использованы в качестве ДНК-метки в тест-системе для определения SEA и TSST. Чувствительность при определении токсинов в супернатантах культур *S.aureus* составила не менее 10 пг/мл, при 100% специфичности [23, 26].

Ботулизм — тяжелое инфекционное заболевание, характеризующееся поражением нервной системы, преимущественно продолговатого и спинного мозга, протекающее с преобладанием офтальмоплегического и бульбарного синдромов. Wu H.C. et al. для обнаружения нейротоксина A *Clostridium botulinum* (BoNT/A) разработали прямой И-ПЦР анализ, в котором SMCC использовали в качестве молекулы линкера для ковалентного связывания моноклональных антител против BoNT/A с репортерной ДНК [38]. Chao H.Y. et al., используя непрямой И-ПЦР и непрямой сэндвич И-ПЦР, зафиксировали предел обнаружения для BoNT/A до 50 фг в обоих тестах, что в 10^4 - 10^5 раз чувствительнее ИФА. Такая чувствительность была достигнута использованием моноклональных антител с высокой аффинностью к BoNT/A в качестве СА [8]. Сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск) в 2014 году зарегистрирован «Набор реагентов для определения ботулинистического нейротоксина типа А методом И-ПЦР» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1424). Предел обнаружения для BoNT / А составлял 100 фг [19].

За последние два десятилетия во всем мире отмечается увеличение заболеваемости туберкулезом. Вовремя начатая специфическая терапия позволяет избежать распространения заболевания и летальных исходов. Mehta P.K. et al. разработали непрямой сэндвич-анализ И-ПЦР для выявления специфических антигенных мишеней *Mycobacterium tuberculosis* (ESAT-6 — ранний секреторный антиген; CFP10 и CFP21 — белки культурального фильтрата 10 и 21; белок, выделенный из различных штаммов MPT-64) в биологических образцах пациентов с легочным и внелегочным туберкулезом, с помощью которого можно обнаружить до 0,1 фг очищенных антигенов *M. tuberculosis*, что превышает чувствительность аналогичного ИФА в 10^7 раз [28].

Метод И-ПЦР незаменимым в такой интересной отрасли науки, как палеомикробиология, которая позволяет выявить возбудителей давно минувших пандемий, их временное и географическое распространение, отслеживать генетическую эволюцию микроорганизмов. История человечества насчитывает три пандемии чумы: Юстинианская (541-750 гг.), средневековая «Черная смерть», поразившая Европу в 1346 — 1353 гг., чума конца XIX — начала XX веков считается третьей особо крупной пандемией. Зубная пульпа оказалась более надежным источником ДНК, чем кости скелета. Однако, как показали исследования, ДНК микроорганизмов более подвержена загрязнению, химическим модификациям, чем белковые последовательности. В 2013 г. французскими учеными впервые был описан И-ПЦР анализ для обнаружения *Yersinia pestis* в пульпе зубов, извлеченных из древних захоронений. Предел обнаружения чумного антигена в фосфатном буферном растворе был в 70 раз выше, по сравнению с ИФА, специфичность составила 100% [27].

Мелиоидоз обычно диагностируется путем выделения и идентификации *Burkholderia pseudomallei* из мокроты, мочи, образцов крови и экссудатов ран. Клинические диагностические тесты включают агглютинацию, непрямую геммагглютинацию, фиксацию комплемента, иммунофлуоресцентный анализ и ИФА.

Соорег A. et al. описали ультрачувствительное обнаружение антител с использованием И-ПЦР-анализа на основе «Tus-Tet-lock» [11, 31] и ИФА. В качестве антигена были использованы фракции из штамма *B. pseudomallei* K96243, выделенные с помощью авторской методики экстракции. Данные методы позволяли обнаружи-

вать антитела в сыворотках, которые были отрицательны в реакции гемагглютинации [9].

Группой ученых из Индии были разработаны методы ИФА и И-ПЦР для детекции возбудителя сибирской язвы. Моноклональные антитела против белка EA 1 (extractable antigen) использовались в качестве СА. После инкубации с исследуемыми штаммами в вегетативной или в споровой форме лунки планшета промывали фосфатно-солевым буферным раствором для удаления несвязанных клеток. В каждую лунку добавляли 100 мл горячего раствора Tris-Cl (10 мМ) для удаления связанных клеток. 10 мкл образца, содержащего клетки, использовали для выполнения дуплексной ПЦР, с двумя наборами праймеров к факторам вирулентности *Bacillus anthracis* протективному антигену и капсуле. Данный И-ПЦР анализ с использованием моноклональных антител к белку EA1, разработанных в настоящем исследовании, позволял обнаруживать 10 и 100 КОЕ/мл бактериальных клеток и спор соответственно [25]. При помощи вышеописанных методов была успешно расследована вспышка сибирской язвы среди крупного рогатого скота в природных национальных парках Индии в январе 2013 года [18].

Особенностью сибиреязвенной инфекции является протекающий практически бессимптомно ранний этап синтеза компонентов сибиреязвенного токсина и последующий быстрый переход инфицированного организма в так называемую «точку невозврата», при которой эффективность традиционно применяемой терапии антибиотиками не способна скомпенсировать развитие токсической патологии. Сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск) разработаны и внедрены в практику ряд И-ПЦР тест-систем для диагностики сибирской язвы: «Набор реагентов для определения летального фактора возбудителя сибирской язвы методом И-ПЦР» (РУ № РЗН 2014/1470); «Набор реагентов для определения протективного антигена возбудителя сибирской язвы методом И-ПЦР» (РУ № РЗН2014/1464). Тест-системы сконструированы в формате сэндвич-И-ПЦР, комплекс белка токсина с биотилированным ДА выявляют с использованием нековалентного конъюгата фрагментов ДНК с нейтравидином, служащим матрицей для проведения ПЦР-амплификации с флуоресцентной детекцией сигнала в режиме реального времени. По изменению уровня флуоресценции в соответствующих лунках планшета или пробирках стрипа против контрольных определяют присутствие токсинов в исследуемых образцах. Способы определения летального фактора и протективного антигена сибирской язвы характеризуется высокой чувствительностью (0,1 пМ) и специфичностью, позволяющей провести диагностику на ранних стадиях заражения сибирской язвой, своевременно начать антибиотикотерапию инфицированного [1, 2].

Преимущества универсального метода И-ПЦР позволили ему найти свое место в диагностике вирусных инфекций. В число маркеров инфицирования вирусом гепатита В входят поверхностный антиген (HbsAg), коровый антиген (HВсAg), е-антиген (HВеAg), антитела к данным антигенам и вирусная ДНК. Концентрация HВсAg в сыворотке прямо пропорциональна уровню вирусной ДНК и может быть использована для определения вирусной нагрузки. Maia M. et al. были первыми исследователями, разработавшими сэндвич-И-ПЦР анализа для обнаружения HВсAg с очень высокой чувствительностью 0,5 пг HВсAg в образцах сыворотки крови [24]. Monjezi R. et al. предложили определение HВсAg методом И-ПЦР с использованием технологии фагового дисплея на основе рекомбинантного бактериофага M13. Полученная система позволяет достоверно определять до 10 нг HВсAg в образцах сыворотки, что примерно в 10 000 раз более чувствительно, чем в ИФА [30].

Обнаружение антигена Р24 ВИЧ-1 позволяет диагностировать заболевание на ранней стадии. Р24 циркулирует в крови и/или секвенируется в иммунных комп-

лексах и тканях в отсутствие вирионов. Максимальная чувствительность ПЦР с обратной транскрипцией составляет 50 копий вирусной РНК на 1 мл. Barletta J. et al. разработали И-ПЦР в реальном времени для обнаружения антигена Р24, позволяющему определять 20 вирионов в 1 мл. Позднее Barletta J. et al. (2009) модифицировали свой метод, используя магнитные гранулы, который имел предел обнаружения 10-100 молекул антигена Р24, что соответствует менее одному вириону на мл, что имеет не только академический интерес, но также применимо при изучении патогенеза ВИЧ и сроков назначения антиретровирусной терапии [6].

Ротавирусная инфекция является наиболее частой причиной диареи у детей. Для этого заболевания свойственно острое начало, умеренно выраженные симптомы гастроэнтерита или энтерита, частое сочетание кишечного и респираторного синдромов в начальном периоде болезни. Количественный И-ПЦР анализ был разработан Adler M. et al. для раннего выявления ротавирусного антигена VP6. Однако чувствительность И-ПЦР оказалась аналогичной пределу обнаружения ротавирусных частиц в ОТ-ПЦР, описанной ранее — 100 вирусных частиц/мл. Вероятно, отсутствие повышения чувствительности является следствием использования разных образцов для анализа: в случае И-ПЦР — образцы кала, ОТ-ПЦР — пробы воды [4].

Норовирусы (NV) вместе с ротавирусами являются основной причиной развития кишечных инфекций у детей, всего 10-100 частиц вируса достаточно для заражения человека. Чувствительный И-ПЦР в реальном времени был разработан Tian P. и Mandrell R. для обнаружения белка капсида NV в образцах кала и пищи с пределом обнаружения 100 очищенных вирусоподобных частиц, что оказалась в 10 раз выше, чем в ПЦР [37].

Вирус гриппа относится к семейству ортомиксовирусов, которые разделяют на три серологические группы: А, В и С. Впервые в Гонконге (1997 г.) зарегистрирована вспышка вируса птичьего гриппа H5N1 (грипп типа А) у людей (18 заболевших, 6 летальных исходов). Поэтому быстрая идентификация вируса имеет важные клинические и эпидемиологические последствия. Deng M.J. et al. опубликовали данные о И-ПЦР анализе для обнаружения сверхнизкой концентрации вируса птичьего гриппа и болезни Ньюкасла в образцах аллантоидной жидкости яиц и в мазке из трахеи домашней птицы. Этот анализ мог обнаружить до 10^{-4} 50% яичной инфекционной дозы (EID_{50}) в мл вируса птичьего гриппа, что, по меньшей мере, в 10^2 раз чувствительнее по сравнению с ОТ-ПЦР и в 10^3 по сравнению с ИФА [12]. Позднее эти же авторы разработали И-ПЦР анализ с использованием магнитных частиц в качестве адсорбционной поверхности с применением стрептавидина в качестве линкера между ДА и репортерной ДНК. Для обоих вирусов наблюдался предел обнаружения до $10^{-4} EID_{50}$ в мл, что может обеспечить массовый скрининг [13].

Таким образом, И-ПЦР является высокочувствительным и специфичным методом, превосходящим ИФА и ПЦР. Он может использоваться для обнаружения вирусных и бактериальных антигенов и антител в минимальном количестве, что позволяет использовать его для ранней диагностики заболеваний, когда возможно более успешное проведение антибактериальной терапии и специфического лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козырь А.В., Колесников А.В., Хлынцева А.Е., Белова Е.В., Шемякин И.Г. Способ определения наличия протективного антигена сибирской язвы на основе иммунодетекции, сопряженной с полимеразной цепной реакцией. Патент на изобретение № 2470307, 20.12.2012.
2. Козырь А.В., Колесников А.В., Хлынцева А.Е., Белова Е.В., Шемякин И.Г. Способ определения летального фактора сибирской язвы на основе иммунодетекции, сопряженной с полимеразной цепной реакцией. Патент на изобретение № 2486524, 27.06.2013.

3. Adams N.M., Jackson S.R., Haselton F.R. et al. Design, synthesis, and characterization of nucleic-acid functionalized gold surfaces for biomarker detection. *J. Langmuir*. 2012, 28:1068-1082.
4. Adler M., Schulz S., Fisher R., Niemeyer C.M. Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR («Imperacer») method with endpoint and real-time detection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, 333:1289-1294.
5. Adler M., Wacker R., Niemeyer C.M. Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies. *J. Analyst (London)*. 2008, 133:702-718.
6. Barletta J., Bartolome A., Constantine N.T. Immunomagnetic quantitative immuno-PCR for detection of less than one HIV-1 virion. *J. Virol. Methods*. 2009, 157:122-132.
7. Chang T.C., Huang S.H. A modified immuno-polymerase chain reaction for the detection of β -glucuronidase from *Escherichia coli*. *J. Immunol. Methods*. 1997, 208:35-42.
8. Chao H.Y., Wang Y.C., Tang S. et al. A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *J. Toxicon*. 2004, 43:27-34.
9. Chen L., Wei H., Guo Y. et al. Gold nanoparticle enhanced immuno-PCR for ultrasensitive detection of Hantaan virus nucleocapsid protein. *J. Immunol. Methods*. 2009, 346:64-70.
10. Chye S.M., Lin S.R., Chen Y.L. et al. Immuno-PCR for detection of antigen to *Angiostrongylus cantonensis* circulating fifth-stage worms. *Clin. Chem*. 2004, 50:51-57.
11. Cooper A., Williams N., Morris J. et al. ELISA and immuno-polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of melioidosis. *J. Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2013, 75:135-138.
12. Deng M.J., Xiao X.Z., Zhang Y.M. et al. A highly sensitive immuno-PCR assay for detection of H5N1 avian influenza virus. *Mol. Biol. Rep*. 2011, 38:1941-1948.
13. Deng M., Long L., Xiao X. et al. Immuno-PCR for one step detection of H5N1 avian influenza virus and Newcastle disease virus using magnetic gold particles as carriers. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2011, 141:183-189.
14. Fischer A., von Eiff C., Kuczius T. et al. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. *J. Mol. Med*. 2007, 85:461-469.
15. Guo Y. C., Zhou Y. F., Zhang X. E. et al. Phage display mediated immuno-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2006, 34, e62.
16. He X., McMahon S., Skinner C. et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against Shiga toxin 2 and their application for toxin detection in milk. *J. Immunol. Methods*. 2013, 389:18-28.
17. Huang S.H., Chang T.C. Detection of *Staphylococcus aureus* by a sensitive immuno-PCR assay. *Clin. Chem*. 2004, 50:1673-1674.
18. Kingston J., Saugata M., Uppalapati S.R. et al. Anthrax Outbreak Among Cattle and its Detection by Extractable Antigen 1 (EA1) Based Sandwich ELISA and Immuno PCR. *Indian J. Microbiol*. 2015, 55(1):29-34.
19. Kolesnikov A.V., Kozyr A.V., Ryabko A.K., Shemyakin I.G. Ultrasensitive detection of protease activity of anthrax and botulinum toxins by a new PCR-based assay. *FEMS Pathog. Dis*. 2016, 74:1-10.
20. Liang H., Cordova S.E., Kieft T.L. et al. A highly sensitive immuno-PCR assay for detecting Group A *Streptococcus*. *J. Immunol. Methods*. 2003, 279:101-110.
21. Liu X., Xu Y., Xiong Y. et al. VHH phage-based competitive real time immuno-polymerase chain reaction for ultrasensitive detection of ochra toxin A in cereal. *Anal. Chem*. 2014, 86:7471-7477.
22. Luk C., Compta Y., Magdalinou N. et al. Development and assessment of sensitive immuno-PCR assays for the quantification of cerebrospinal fluid three- and four-repeat tau isoforms in tauopathies. *J. Neurochem*. 2012, 123:396-405.
23. Maerle A.V., Ryazantsev D.Y., Dmitrenko O.A., Petrova E.E., Komaleva R.L., Sergeeva I.V., Trofimov D.Yu., Zavriev S.K. Detection of *Staphylococcus aureus* Toxins Using Immuno-PCR. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2014, 40:526-531.
24. Maia M., Takahashi H., Adler K. et al. Development of a two-site immuno-PCR assay for hepatitis B surface antigen. *J. Virol. Methods*. 1995, 52:273-286.
25. Makam S., Majumder S., Kingston J. et al. Immuno capture PCR for rapid and sensitive identification of pathogenic *Bacillus anthracis*. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2013, 29(12):2379-2388.
26. Malou N., Raoult D. Immuno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies. *Trends Microbiol*. 2011, 19:295-302.
27. Malou N., Tran T.N., Nappes C. et al. Immuno-PCR — a new tool for paleomicrobiology: the plague paradigm. *PLoS ONE*. 2012, 7, e31744.

28. Mehta P.K., Kalra M., Khuller G.K. et al. Development of an ultrasensitive polymerase chain reaction-amplified immunoassay based on mycobacterial RD antigens: implications for the serodiagnosis of tuberculosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, 72:166-174.
29. Mehta P.K., Raj A., Singh N. et al. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012, 66: 20-36.
30. Monjezi R., Tan S.W., Tey B.T. et al. Detection of hepatitis B virus core antigen by phage display mediated TaqMan real-time immuno-PCR. *J. Virol. Methods.* 2013, 187:121-126.
31. Morin I., Askin S.P., Schaeffer P.M. IgG-detection devices for the Tus-Ter-lock immuno-PCR diagnostic platform. *J. Analyst.* 2011, 136:4815-4821.
32. Niemeyer C.M., Adler M., Wacker R. Detecting antigens by quantitative immuno-PCR. *Nat. Protoc.* 2007, 2:1918-1930.
33. Niemeyer C.M., Adler M., Pignataro B. et al. Selfassembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1999, 27:4553-4561.
34. Perez J.W., Vargis E.A., Russ P.K. et al. Detection of respiratory syncytial virus using nanoparticle amplified immuno-polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 2011, 410:141-148.
35. Rajkovic A., Moualij B., Uyttendaele M. et al. Immunoquantitative real-time PCR for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72:6593-6599.
36. Ryazantsev D.Y., Petrova E.E., Kalinina N.A., Valyakina T.I., Grishin E.V., Zavriev S.K. Application of supramolecular DNA streptavidin complexes for ultrasensitive detection of several toxins by immuno-PCR. *Global J. Analytical Chemistry.* 2012, 3:e17.
37. Tian P., Mandrell R. Detection of norovirus capsid proteins in faecal and food samples by a real time immuno-PCR method. *J. Appl. Microbiol.* 2006, 100:564-574.
38. Wu H.C., Huang Y.L., Lai S.C. et al. Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immunoPCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 2001, 32:321-325.
39. Zhang W., Bielaszewska M., Pulz M. et al. New immuno-PCR assay for detection of low concentrations of Shiga toxin 2 and its variants. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 46:1292-1297.

Поступила 27.07.18

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Ю.Н.Тараканова¹, А.Д.Дмитриев¹, Д.А.Дмитриев¹, В.Ф.Лавров^{1,2}, Ю.С.Массино¹, А.А.Печелюшко¹,
О.Л.Сезал¹*

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ: ИСТОРИЯ, ТЕОРИЯ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

¹НИИ вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова, ²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва

Имуноферментный твердофазный анализ (ИФА) играет значительную роль в развитии ряда важных направлений биологии и медицины, в том числе для диагностики опасных инфекций. В настоящем обзоре освещается история изобретения твердофазного ИФА, его дальнейшее усовершенствование и применение. Особый акцент сделан на факторах, влияющих на взаимодействие между антителами и антигенами на твердой фазе и их использовании для увеличения аналитической чувствительности твердофазного ИФА, включая сэндвич-метод определения антигенов.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 117—125

Ключевые слова: иммуноферментный твердофазный анализ, аналитическая чувствительность, моноклональные антитела, аффинность, авидность, сэндвич-метод

THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA): HISTORY, THEORY AND APPLICATION

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) play a significant role in the development of many important fields of biology and medicine, including the detection of the dangerous infections agents. In the present review there is described the history of ELISA's invention, further improvement of this method and application in modern biology and medicine. The special accent is made on factors influencing antibody-antigen interactions on the solid phase and their use to increase the analytical sensitivity of the method.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 117—125

Key words: enzyme-linked immunosorbent assays, analytical sensitivity, monoclonal antibodies, affinity, avidity, sandwich ELISA

Иммуноферментный анализ (ИФА) уже свыше 50 лет играет значительную роль в развитии ряда важных направлений биологической и медицинской науки. ИФА успешно используется в лабораторной диагностике инфекционных, онкологических, эндокринных болезней, заболеваний иммунной системы. С его помощью осуществляется контроль качества и безопасности продуктов питания, мониторинг вредных факторов окружающей среды [1, 23]. Во многих научных публикациях значение ИФА часто сравнивается с другими важнейшими вехами развития биологической науки XX столетия, в том числе, с открытием антибиотиков, расшифровкой структуры ДНК и генома человека [23]. ИФА был разработан в конце 60-х — начале 70-х годов XX века в результате творческого продолжения и качественных изменений ряда важнейших теоретических и практических достижений в области иммунохимии, которые возникли в близкий по времени предшествующий период. Говоря об открытиях, подготовивших условия для разработки ИФА, необходимо отметить, что они тесно связаны с разработкой другого не менее важного метода диагностики — радиоиммунологического анализа (РИА), что позволило качественно повысить эффективность иммунохимического анализа, основанного на взаимодействии антител с антигенами. Вместе с тем, РИА был не лишен серьезных недостатков, которые заключались в работе с опасными для здоровья радиоактивными изотопами. Еще одним «узким местом» РИА являлась необходимость разделения связавшихся с антителами и «свободных» антигенов. В начале 70-х годов две группы исследователей продемонстрировали, что антитела возможно ковалентно связать с такими ферментами, как щелочная фосфатаза, β -глюкозоксидаза и пероксидаза хрена, с помощью реакции с глютаровым диальдегидом или другими методами. Полученные конъюгаты успешно использовались в световой, флуоресцентной и электронной микроскопии для иммуногистохимического окрашивания структур, содержащих анализируемые антигены [11, 16]. Эти эффекты были замечены и успешно использованы двумя группами ученых в Швеции и Нидерландах для замены в иммунохимическом анализе радиоактивной метки на ферментную [16]. Особенно большой вклад в разработку ИФА внесла шведская исследовательница Eva Engvall, предложив использовать пассивную адсорбцию антител или антигенов на поверхность 96-луночных планшетов, чтобы проводить реакции на твердой фазе. Именно Engvall предложила термин ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), в русскоязычной литературе «твердофазный ИФА» [11]. Благодаря этому предложению процедуры отделения им-

мунных комплексов от несвязавшихся реагентов существенно упростились. Следует отметить, что приблизительно в это же время был разработан и внедрен в практику метод твердофазного РИА [11, 16]. Важнейшее значение для развития ИФА сыграло открытие в 1975 году Kohler и Milstein метода получения с помощью гибридомной технологии моноклональных антител (МКА) [15]. Данное открытие впоследствии удостоилось присуждения Нобелевской премии в области физиологии и медицины и позволило, во-первых, решить задачу получения практически неограниченного количества однородных антител, во-вторых, этот метод позволил получать МКА к отдельным эпитопам на молекуле белка. Это создало условия для конструирования сэндвич-метода определения антигенов — одного из наиболее широко используемых на практике вариантов ИФА.

Принцип работы сэндвич-метода состоит в следующем. На поверхность твердой фазы прикрепляются МКА, распознающие один из эпитопов анализируемого антигена. После добавления образца, содержащего антиген, на поверхности «твердой фазы» образуются иммунные комплексы (ловящие антитела — антиген). После отмывок добавляют детектирующие МКА, направленные к другому эпитопу антигена. Эти антитела связаны с ферментом, в качестве которого чаще всего выступает пероксидаза хрена. В результате образуются тройные комплексы — «сэндвичи», в которых молекула антигена оказывается «зажатой» между двумя молекулами МКА к разным эпитопам. Для визуализации этих комплексов добавляют субстрат фермента, который дает цветную реакцию; интенсивность окрашивания регистрируется на спектрофотометре. При этом интенсивность реакции пропорциональна концентрации определяемого антигена в инкубационной смеси. Путем сравнения интенсивности окрашивания калибровочной кривой с интенсивностью окрашивания в анализируемом образце определяют концентрацию тестируемого антигена. Образующиеся на твердой фазе комплексы могут иметь различную конфигурацию. В частности, благодаря бивалентному взаимодействию антител с молекулами антигена, в сэндвич-методе могут образовываться очень прочные циклические комплексы [9, 13]. Показано, что будучи энергетически более выгодными, чем линейные комплексы, образуемые при моновалентном взаимодействии антитела с антигеном, циклические структуры формируются даже при низкой концентрации антигена [9]. При этом аналитическая чувствительность метода многократно увеличивается [9, 13]. Иммуноферментные тест-системы (ИФТС), сконструированные по принципу сэндвич-метода, позволяют достигать высокой аналитической чувствительности и специфичности, так как в них распознаются два различных эпитопа белковой молекулы и возможно образование прочных циклических комплексов.

После открытия ИФА, разработка методов тестирования антигенов проводилась преимущественно в отдельных научных группах и лабораториях. Вскоре к этому процессу подключились биотехнологические компании, которые поставили производство ИФТС на индустриальную основу. По своей чувствительности и специфичности многие современные методы ИФА не уступают, а в некоторых случаях даже превосходят РИА. Наиболее распространен формат ИФА, выполняемый в 96-луночных пластиковых планшетах. Вместе с тем, развиваются и новые направления ИФА, которые используют новые подходы и материалы. В частности, во многих из них образование и определение сигнала основано не на ферментных реакциях, а на других физико-химических взаимодействиях [20]. Назначение этих модернизированных методов, во-первых, связано с увеличением их чувствительности и специфичности, во-вторых — с возможностью автоматизации процесса и, в-третьих, с мультиплексностью, что близко к методу «биочипов» [23]. Также разрабатываются и

выпускаются сложные системы, которые представляют собой разновидности микроэлектрофореза и микроиммуноблоттинга с детекторами [24]. Простейший вариант таких проточных систем — это известные тесты на беременность (определение хорионического гонадотропина), построенные по принципу сэндвич-методов, в которых используются наночастицы золота, связанные с детектирующими антителами.

Тем не менее, наиболее часто используемым на практике вариантом ИФА до настоящего времени остается классический твердофазный метод, выполняемый в 96-луночных пластиковых планшетах. Это, в частности, подтверждают оценки развития индустрии и рынка ИФА, проводимые специальными маркетинговыми компаниями в области биотехнологий. Существует несколько вариантов классического твердофазного ИФА. Они различаются объектами определения — антиген или антитело. Соответственно, из этого следует, какой из компонентов иммобилизуется на твердой фазе. Методы могут быть основаны на принципе конкуренции определяемого антигена и меченых реагентов, или на принципе сэндвича. Для тестирования низкомолекулярных веществ применяют конкурентные методы ИФА [1]. Для определения антигенов белковой природы, несущих несколько антигенных детерминант, распознаваемых различными МКА, наиболее часто используют сэндвич-метод, который нашел широкое применение при выявлении в лабораторных условиях маркеров ряда инфекционных заболеваний, в частности, поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). С помощью данного метода осуществляется массовый скрининг донорской крови на наличие маркеров многих опасных вирусных инфекций [1, 11, 16, 23].

В развитии твердофазного ИФА практика нередко опережала теорию [4]. Тем не менее, именно практика стимулировала теоретические работы, и несколько ведущих ученых в области иммунохимии специально посвятили свои работы подробному анализу и описанию физико-химических процессов в твердофазных ИФА [12]. В России наиболее известным и достаточно полным руководством такого рода является монография под ред. акад. А.М. Егорова [1]. Как подчеркивается в руководствах и статьях, описывающих физико-химические процессы в твердофазных ИФА, эти реакции могут быть представлены в той же терминологии, что и реакции в растворах, с использованием сходных математических уравнений [4]. С другой стороны, они характеризуются рядом важных отличительных особенностей. Это своеобразие связано с протеканием реакций на разделе твердой и жидкой фаз. Особый интерес представляет связь процессов, протекающих в твердофазных системах ИФА с таким параметром, как аналитическая чувствительность метода. При конструировании новых ИФТС первоочередной задачей является достижение высокой аналитической чувствительности. Как показывает практика, это создает важнейшую предпосылку для создания в итоге наиболее эффективных ИФТС, обладающих высокой специфичностью, и снижает минимально определяемую концентрацию антигена [22]. Для математического выражения «аналитической чувствительности» используют два параметра. В 90-е годы даже разгорелась дискуссия, какой из них предпочтительнее [10, 19]. Однако на самом деле оба параметра в практическом смысле полезны, могут быть связаны между собой и являются принятыми способами количественной характеристики чувствительности ИФА [19]. Первый параметр — это «наклон» калибровочной кривой или коэффициент кривой связывания (тангенс угла наклона линейного участка кривой к оси концентраций) [19]. Второй — это так называемая «минимальная, достоверно определяемая концентрация антигена» [10].

Усовершенствования «традиционного» 96-луночного формата ИФА, касающиеся чувствительности и специфичности метода, можно условно разделить на два основ-

ных направления. Первое связано с усилением регистрируемого сигнала. Наиболее часто используемой в ИФА ферментной меткой является пероксидаза хрена, затем идет щелочная фосфатаза, реже используют β -галактозидазу. Но в современных и более дорогостоящих ИФТС существует тенденция заменять субстраты, дающие цветное окрашивание, на вещества, генерирующие более сильные флуоресцентные и хемилюминесцентные сигналы [1]. Наряду с этим широко используют биотин-стрептавидиновые комплексы. В простом варианте это меченные биотином детектирующие МКА, которые взаимодействуют со стрептавидином, который ковалентно связан с пероксидазой хрена. Такие антитела в существенно меньшей степени утрачивают свою антигенсвязывающую активность, чем после конъюгации с ферментом [1].

В силу коммерческих причин фирмы-производители часто не раскрывают детали усовершенствований ИФА. Однако о приоритетных направлениях разработок можно узнавать по большому потоку научных публикаций на эту тему. В частности, анализ литературы свидетельствует, что в качестве одного из перспективных подходов для усиления сигнала в ИФА в настоящее время рассматривают использование конъюгатов детектирующих МКА с наночастицами [19]. Такие частицы, как например, нанозолото, позволяют увеличивать количество метки, связанной с детектирующими антителами, а также их avidность при взаимодействии с антигеном в сэндвич методе. Развиваются методы, сочетающие принцип ИФА с технологией рекомбинантных ДНК, когда для амплификации сигнала используют ПЦР [18]. Вторым подходом к увеличению аналитической чувствительности ИФА является получение антител, обладающих более высоким аффинитетом и специфичностью, а также использование таких методов иммобилизации антител на твердой фазе, которые способствовали бы сохранению их биологической активности. Как отмечается во многих работах, с точки зрения аналитической чувствительности важнейшим этапом при конструировании твердофазного ИФА является создание «первого этажа» или «фундамента», на котором держится вся конструкция, а именно эффективно работающего слоя «улавливающих» иммобилизованных антител [4]. Обычно указывают на два важнейших фактора: на аффинность иммобилизованных антител и их поверхностную концентрацию на твердой фазе. Роль этих факторов подтверждается в ряде работ с помощью математических и экспериментальных моделей [21]. Одна из них, наиболее простая и наглядная, предлагается в работе Peterman [21]. Показано, что в условиях избытка рецептора над лигандом взаимодействие антигенов и антител в твердофазном ИФА можно представить в виде следующего математического выражения: $L_b = KR_f / (1 + KR_f) \times L_t$; где: L_b — молярная концентрация сайтов лиганда, связанных с рецептором (L_b); L_t — суммарная концентрация эпитопов лиганда, R_f — молярная концентрация свободных сайтов рецептора, K — константа ассоциации (аффинность).

В этом случае мы имеем обычный калибровочный график $Y = kX$, показывающий зависимость количества связанного лиганда (ось Y) от его концентрации в образце (ось X). В такой простой форме часто представляют результаты измерений в сэндвич-методах определения антигенов в твердофазных ИФА. Аналитическая чувствительность в такой упрощенной модели ИФА, определяемая как коэффициент графика k будет определяться выражением $KR_f / (1 + KR_f)$. Из приведенного уравнения следует, что аналитическая чувствительность зависит от аффинности антител (K) и количества антигенсвязывающих сайтов антител (R_f) на твердой фазе.

В работе Zhang S. et al. [25] с помощью математической модели был проведен анализ изменения минимальной детектируемой дозы в сэндвич-методе определения антигенов в зависимости от аффинности иммобилизованных антител. Приведенные

расчеты демонстрируют, как повышая аффинность антител на твердой фазе можно значительно увеличить чувствительность метода. Кроме того, помимо собственно иммунохимических факторов в работе кратко обсуждаются технологические подходы повышения аналитической чувствительности метода за счет усиления сигнала детекции путем использования хемилюминесцентных и флуоресцентных реакций, наночастиц и т.п. Как правило, в соответствии с теоретическими расчетами в руководствах по применению и конструированию твердофазных ИФА, в сэндвич-методе рекомендуется прикреплять к твердой фазе антитела, имеющие наиболее высокую аффинность [22]. Что же касается поверхностных концентраций антител на твердой фазе, то в реальности картина осложняется тем, что при адсорбции на поверхность пластиковых планшетов большинство из них теряет свою антигенсвязывающую активность [4]. Это подробно изучалось в работах группы Butler [4, 5]. В частности, было обнаружено, что после адсорбции свою активность утрачивают до 70% ПКА и 75-99% МКА [5]. Потеря активности антител может быть связана как с их денатурацией при контакте с твердой фазой, так и с «неправильной» ориентацией в результате адсорбции. Считается, что наиболее, если не единственно эффективной ориентацией антител, является их прикрепление к твердой фазе с помощью Fc-фрагмента так, чтобы переменные области были обращены в раствор, оставаясь свободными для «улавливания» антигена [17]. Большой вклад в изучение ориентации молекул на твердой фазе вносят современные физико-химические методы анализа структуры и состава поверхностей, например, атомно-силовая микроскопия, масс-спектрометрия вторичных ионов и др. [17].

Таким образом, количество образуемых при данной дозе антигена иммунных комплексов зависит от поверхностной концентрации (плотности) биологически активных молекул антител на твердой фазе и их аффинности. Чем больше иммунных комплексов находится на твердой фазе, тем сильнее выявляемая реакция, тем выше аналитическая чувствительность метода. Следует отметить, что в подобных исследованиях принято различать истинную аффинность как характеристику связывания одного антигенсвязывающего сайта антитела с соответствующим эпитопом на молекуле антигена, и avidность, характеризующую общую прочность связывания молекул антигенов и антител в иммунных комплексах [8]. Можно предположить, что конфигурация иммунных комплексов зависит от плотности активных адсорбированных молекул, а значит от этого же зависит и степень их avidности. Например, при более высокой плотности МКА на твердой фазе могут создаваться стерические возможности для образования бивалентных комплексов между иммобилизованными антителами, антигенами и детектирующими антителами. Циклические иммунные комплексы обладают более выраженной avidностью, по сравнению с линейными, о чем уже говорилось ранее. Гибкость молекул антител, определяемая их шарнирной областью, также может влиять на образование высокоavidных циклических комплексов [13]. Возможно, этот фактор следует учитывать при конструировании ИФТС, в составе которых будут IgY птиц, в отличие от антител млекопитающих, не имеющих шарнирного участка [2]. Образование циклических комплексов способствует повышению аналитической чувствительности метода [9, 13]. Поэтому важнейшим этапом при создании подобных твердофазных систем являются усилия, направленные на увеличение числа активных, правильно ориентированных молекул антител на твердой фазе. При этом возможность прикрепления антител к твердой фазе ограничена образованием монослоя. Следовательно, количество адсорбируемых молекул нельзя увеличить просто за счет увеличения их концентрации в адсорбционном буфере, используемом при иммобилизации антител.

В большинстве случаев сохранившейся активности антител, адсорбированных на твердой фазе, оказывается достаточно для анализа образца [4]. Но в ситуациях, когда нужна особо высокая чувствительность, проблема повышения доли активных антител существенно актуализируется. С учетом фактора инактивации антител при пассивной адсорбции был предложен ряд альтернативных способов иммобилизации, которые были направлены на увеличение доли биологически активных антител на твердой фазе. В их основе лежит создание промежуточных звеньев между поверхностью полистирола и МКА, которые защитили бы иммобилизованные молекулы антител от денатурации и обеспечили пространственную ориентацию, оптимальную для распознавания и захвата антигена. Suter и Butler в целях лучшего сохранения активности иммобилизованных МКА при конструировании сэндвич-методов твердофазных ИФА предложили прикреплять антитела к пластику с помощью биотин-авидиновых мостиков [4]. До сих пор практикуется использование коммерческих плашек с уже прикрепленным стрептавидином. Среди других известных методов иммобилизации антител на твердой фазе следует упомянуть использование в качестве первого слоя антивидовых антител [4]. Наряду с этим применяются специально обработанные коммерческие пластиковые планшеты, обеспечивающие образование ковалентных связей между активированными молекулами на поверхности пластика и антителами [10]. Но следует учитывать, что на практике эти методы оказываются более затратными по времени и средствам, чем пассивная адсорбция, а результат иммобилизации часто непредсказуем. Поэтому пассивная адсорбция остается наиболее часто используемым методом иммобилизации антител при конструировании сэндвич-методов. Именно с нее советуют начинать конструирование сэндвич-метода в специальных руководствах [4]. В этой связи, особый интерес представляют приемы, позволяющие повысить эффективность этого метода.

К числу наиболее существенных факторов, влияющих на сохранение биологической активности антител, можно отнести состав и физико-химические свойства адсорбционных буферов. Однако вопросу о влиянии рН на биологическую активность адсорбированных антител в специальной литературе уделено мало внимания. В руководствах по ИФА для адсорбции антител традиционно рекомендуется использовать в качестве оптимальных буферные растворы с рН 7.5 и 9.5 [14]. Однако в некоторых немногочисленных работах описаны поликлональные и моноклональные антитела, для сохранения антигенсвязывающей активности которых использовали буферные растворы с более низким или более высоким значением рН [6]. В нашей лаборатории в процессе конструирования сэндвич-метода определения HBsAg были получены и использованы МКА, адсорбция которых в буферных растворах с рН 2.8 позволяла значительно увеличить аналитическую чувствительность метода [7]. Обнаруженный феномен побудил нас провести более углубленное исследование, цель которого заключалась в получении ответов на несколько важных вопросов. Являются ли описанные в нашей работе [7] «кислотоустойчивые» МКА к HBsAg неким редким явлением или это отражение более общих свойств антител, важных с теоретической и практической точек зрения. И каковы механизмы повышения аналитической чувствительности ИФА при использовании адсорбционных буферов с «жестким» значением рН для иммобилизации подобного рода МКА. В частности, связано ли это явление с изменением общего числа адсорбированных на «твердой фазе» молекул антител или это отражает более высокую сохранность их антигенсвязывающей активности в «экстремальных» условиях.

Для ответа на поставленные вопросы нами был проведен сравнительный анализ изменений поверхностной концентрации и антигенсвязывающей активности МКА

после их адсорбции на твердой фазе при различных значениях рН буферов [3]. В дополнение к традиционным показателям рН иммобилизации (7.5 и 9.5) прямая адсорбция антител проводилась в т. н. «жестких» условиях (рН 1.0; 2.8 и 11.9), которые теоретически могли бы способствовать инактивации МКА. В процессе выполнения данной работы нами была проанализирована активность 28 МКА. Эффективность связывания адсорбированных антител с меченым антигеном оценивали по тангенсу угла наклона линейного участка кривых связывания с антигенами. В результате было выявлено, что шесть МКА (21.5%) показали статистически значимое увеличение антигенсвязывающей активности (проявлявшееся в возрастании аналитической чувствительности метода) после адсорбции в буферных растворах с рН 2.8 и рН 11.9, по сравнению с более «мягкими» условиями адсорбции в растворах с рН 7.5 и 9.5. Анализ связывания ^{125}I -НВsAg с адсорбированными антителами позволил сделать вывод, что наблюдаемое нами увеличение аналитической чувствительности метода было обусловлено лучшим сохранением антигенсвязывающей активности этих МКА после их иммобилизации в буферах с нефизиологическими («жесткими») значениями рН, по сравнению с адсорбцией в буферных растворах с физиологическими значениями рН. При этом общее количество IgG на твердой фазе не увеличилось. Так, после адсорбции в «жестких» условиях антигенсвязывающую активность сохраняли около 20% антител, а после иммобилизации при рН 7.5 — всего 6%. Наблюдаемые различия в сохранении антигенсвязывающей активности МКА при адсорбции в буферных растворах с различными значениями рН, вероятно, могут быть связаны с отличиями в заряде и степени гидрофобности вариабельных участков легких и тяжелых цепей МКА. Эти особенности, по-видимому, определяют ориентацию и конформационное состояние молекул при различных условиях адсорбции. Полученные результаты могут оказать существенную пользу при оптимизации твердофазного ИФА. Таким образом, можно сделать вывод, что аналитическая чувствительность сэндвич-метода определения антигена зависит многих факторов. Однако если иметь ввиду факторы, определяемые собственно взаимодействиями антител и антигенов, то важнейшим условием является возможность формирования на твердой фазе монослоя иммобилизованных антител, которые могли бы эффективно захватывать из раствора молекулы определяемого антигена, обеспечивая, таким образом, стерические предпосылки для образования высокоavidных иммунных комплексов с детектируемыми антителами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М., Высшая школа, 1991.
2. Печелюлько А.А., Тараканова Ю.Н., Дмитриев Д.А. и др. Сравнительный анализ эффективности использования антител птиц и млекопитающих с сэндвич-методом определения НВsAg. Прикладная биохимия и микробиология. 2017, 53(1):104-114.
3. Тараканова Ю.Н., Дмитриев А.Д., Массино Ю.С. и др. Влияние рН адсорбционных буферов на количество и антигенсвязывающую активность моноклональных антител, иммобилизованных на поверхность полистироловых планшетов. Прикладная биохимия и микробиология. 2017, 51(4):424-433.
4. Butler J.E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *In: Methods in molecular medicine: Molecular Diagnosis of Infectious Diseases*. Eds.: Decker J. and Reischl U. Humana Press Inc., 2004, p. 333-372.
5. Butler J.E., Ni L., Brown W.R. et al. The immunochemistry of sandwich ELISAs. VI. Greater than 90% of monoclonal and 75% of polyclonal anti-fluorescein capture antibodies (CABs) are denatured by passive adsorption. *Mol. Immunol.* 1993, 30(13):1165-1175.

6. Cuvelier A., Bourguignon J., Muir J.F. et al. Substitution of carbonate by acetate buffer for IgG coating in sandwich ELISA. *J. Immunoassay*. 1996, 17(4):371-382.
7. Dmitriev A.D., Tarakanova J.N., Yakovleva D.A. et al. Monoclonal antibodies requiring coating buffer with low pH for efficient antigen capture in sandwich ELISA: the rarities or practically important phenomena? *J. Immunoassay. Immunochem.* 2013, 34(4):414-437.
8. Dmitriev D.A., Massino Y.S., Segal O.L. Kinetic analysis of interactions between bispecific monoclonal antibodies and immobilized antigens using a resonant mirror biosensor. *J. Immunol. Methods*. 2003, 280(1-2):183-202.
9. Ehrlich P.H., Moyle W.R. Specificity considerations in cooperative immunoassays. *Clin. Chem.* 1984, 30(9):1523-1532.
10. Ekins R., Edwards P. On the Meaning of «Sensitivity». *Clin. Chem.* 1997, 43(10):1824-1831.
11. Engvall E. The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical Chemistry*. 2010, 56(2):319-320.
12. *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay* (first edition). Ed.: Butler J.E. Boca Raton, FL, CRC Press, 1991.
13. Jackson A.P., Siddle K., Thompson R.J. A monoclonal antibody to human brain-type creatine kinase. Increased avidity with mercaptans. *Biochem J.* 1983, 215(3):505-512.
14. Jordan W. Part 155. Antigen Measurement Using ELISA. In: *The Protein Protocols Handbook* (Second edition). Ed.: Walker J.M. Humana Press Inc., 2002, p. 1083-1087.
15. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975, 256:495-497.
16. Lequin R.M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* 2005, 51(12):2415-2418.
17. Liu F., Dubey M., Takahashi H. et al. Immobilized Antibody Orientation Analysis using Secondary Ion Mass Spectrometry and Fluorescence Imaging of Affinity-generated Patterns. *Analyt. Chem.* 2010, 82(7):2047-2058.
18. McDermed J.E., Sanders R., Fait S. et al. Nucleic acid detection immunoassay for prostate-specific antigen based on immuno-PCR methodology. *Clin. Chem.* 2012, 58(4):732-740.
19. Pardue H. L. Counterpoint The inseparable triad: analytical sensitivity, measurement uncertainty, and quantitative resolution. *Clinical Chemistry*. 1997, 43(10):1831-1837.
20. Pei X., Zhang B., Tang J. et al. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Anal. Chim. Acta.* 2013, 758(3):1-18.
21. Peterman J.H. Immunochemical considerations in the analysis of data from non-competitive solid-phase immunoassays. In: *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay* (first edition). Ed.: Butler J.E. Boca Raton, FL, CRC Press, 1991, p. 47-65.
22. Porstmann T., Kiessig S.T. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J. Immunol Methods*. 1992, 150(1-2):5-21.
23. Wu A.H. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta.* 2006, 369(2):119-124.
24. Yu Z.T., Guan H., Cheung M.K. et al. Rapid, automated, parallel quantitative immunoassays using highly integrated microfluidics and AlphaLISA. *Sci. Rep.* 2015, 5:11339.
25. Zhang S., Garcia-D'Angeli A., Brennan J.P. et al. Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general. *The Analyst*. 2013, 139(2):439-445.

Поступила 29.01.19

Контактная информация: Тараканова Юлия Николаевна,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)674-55-01

СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Захарова Ю.В., Леванова Л.А., Штернис Т.А., Сухих А.С., Марковская А.А.* Характеристика биологических свойств бифидобактерий при микрoэкологических нарушениях кишечника у ВИЧ-инфицированных детей 3
- Zakharova Yu.V., Levanova L.A., Shternis T.A., Sukhikh A.S., Marcovskaya A.A.* Characteristics of bifidobacteria biological properties in gut microflora disorders in HIV-infected children
- Катаева Л.В., Вакарина А.А., Колотова О.Н., Посоюзных О.В., Ташланова В.В., Карпухина Н.Ф., Бычкова Л.А.* Возрастные особенности видового разнообразия лактобацилл толстого кишечника у жителей Тюмени 10
- Kataeva L.V., Vakarina A.A., Kolotova O.N., Posoyuznykh O.V., Tashlanova V.V., Karpukhina N.F., Bychkova L.A.* Age features of species diversity lactobacill of large intestine in residents of Tyumen
- Бержец В.М., Бабахин А.А., Петрова Н.С., Васильева А.В., Хлгатын С.В., Емельянова О.Ю.* Новые формы клещевых аллергоидов 15
- Berzhets V.M., Babakhin A.A., Petrova N.S., Vasileva A.V., Khlgatyan S.V., Emelyanova O.Yu.* New forms of home dust mite allergoid
- Лухверчик Л.Н., Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И., Жукина М.В., Кабаргина В.Ю., Бобкова М.Р., Казеннова Е.В., Зверев В.В.* Влияние антиретровирусной терапии на изменения спектра специфических антител к индивидуальным антигенам ВИЧ-1 у лиц, инфицированных различными субтипами вируса. 22
- Lukhverchik L.N., Alatortseva G.I., Nesterenko L.N., Dotsenko V.V., Amiantova I.I., Zhukina M.V., Kabargina V.Yu., Bobkova M.R., Kazennova E.V., Zverev V.V.* Antiretroviral therapy effect on specific antibodies spectrum changes to HIV-1 individual antigenes from persons infected with different virus subtypes
- Носик М.Н., Рыжов К.А., Кравченко А.В., Севостьянихин С.Е., Куимова У.А., Потанова А.Б., Собкин А.Л.* Анализ уровня распространенности первичной резистентности ВИЧ-1 к антиретровирусным препаратам на территории Москвы и Московской области 27
- Nosik M.N., Ryzhov K.A., Kravchenko A.V., Sevostyanihin S.E., Kuimova U.A., Potapova A.B., Sobkin A.L.* Analysis of prevalence of HIV-1 primary resistance to antiretroviral drugs in the territory of Moscow and Moscow region
- Зубков А.В., Кузьмина Н.С., Мазурина С.А., Бутова Л.Г., Рахматулина Н.М., Сибгатулина Н.А., Гервазиева В.Б.* Метод определения sIgE к тиреопероксидазе в сыворотке крови больных с аутоиммунными и аллергическими заболеваниями. 31
- Zubkov A.V., Kuzmina N.S., Mazurina S.A., Butova L.G., Rahmatulina N.M., Sibgatulina N.A., Gervazieva V.B.* The method to detect sIgE to thyroid peroxidase in cases of the patients with autoimmune and allergic diseases

- Отрашевская Е.В., Кулак М.В., Букин Е.К., Игнатев Г.М.* Состояние специфического иммунитета после однократной иммунизации паротитной вакциной «Ленинград-3» с разным содержанием антигена. 37
- Otrashevskaya E.V., Kulak M.V., Bukin E.K., Ignatev G.M.* Specific humoral immunity after immunization with vaccine contained Leningrad-3 (L-3) mumps virus strain of different potency
- Оспельникова Т.П., Зарембо Н.В., Конищева А.Ю., Гервазиева В.Б., Осипова Г.Л., Михайлова Н.А.* Интерфероновый статус в оценке терапии бронхиальной астмы иммуномодулирующими препаратами. 46
- Ospelnikova T.P., Zarembo N.V., Konischeva A.Yu., Gervazieva V.B., Osipova G.L., Michailova N.A.* Interferon status in estimating the therapy of bronchial asthma with immunomodulating preparations
- Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Волынкина А.С., Кузнецова И.В., Подколзин А.Т., Чехвалова Е.В., Оробей В.Г.* Применение молекулярно-генетического анализа и геномного профилирования возбудителей инфекционных болезней региона Сочи в период подготовки и проведения чемпионата мира по футболу FIFA-2018 54
- Popova A.Yu., Kulichenko A.N., Volynkina A.S., Kuznetsova I.V., Podkolzin A.T., Chekhvalova E.V., Orobey V.G.* The application of molecular genetic analysis and genomic profiling of infectious diseases causative agents in Sochi during the preparation and holding of the Fifa World Cup 2018
- Синяшина Л.Н., Семин Е.Г., Медкова А.Ю., Сундюкова Р.А., Каратаев Г.И.* Доклинические исследования защитной активности препарата кандидатной рекомбинантной живой коклюшной вакцины интраназального применения 60
- Sinyashina L.N., Semin E.G., Medkova A.Yu., Syundyukova R.A., Karataev G.I.* Pre-clinical study of protective potency of candidate recombinant live pertussis vaccine for intranasal administration
- Сорокина Е.В., Ахматова Н.К., Егорова Н.Б.* Эффективность применения комбинированной терапии фигурных и параинфекционных эритем с использованием иммуномодуляторов различного происхождения и MNRI 69
- Sorokina E.V., Akhmatova N.K., Egorova N.B.* Efficiency of combined therapy of figuratum and parainfectious erythemas with the use of immunomodulators of different origins and MNRI
- Филатова Е.Н., Солнцев Л.А.* Смешанная техника прогнозирования инфекционной заболеваемости с применением методов декомпозиции временного ряда и Sarima 76
- Filatova E.N., Solntsev L.A.* Mixed infectious disease forecasting technique, based upon seasonal decomposition and Sarima

ОБЗОРЫ (REVIEWS)

- Пахомов Ю.Д., Блинкова Л.П.* Биоопасность жизнеспособных некультивируемых микроорганизмов. 83
- Pakhomov Yu.D., Blinkova L.P.* Biohazard caused by viable but nonculturable microorganisms
- Ершов Ф.И., Оспельникова Т.П., Наровлянский А.Н.* Интерфероновый статус как метод определения неспецифических биомаркеров иммунопатологии человека 91
- Ershov F.I., Ospelnikova T.P., Narovlyansky A.N.* Interferon status as a method of determination of nonspecific biomarkers of human immunopathology

<i>Тынянова В.И., Соколова Е.П., Зюзина В.П., Демидова Г.В.</i> Токсигенность <i>Yersinia pestis</i>	99
<i>Тунуанова V.I., Sokolova E.P., Zyuzina V.P., Demidova G.V.</i> <i>Yersinia pestis</i> pathogenicity	
<i>Баркова И.А., Барков А.М., Викторов Д.В.</i> Метод иммуно-ПЦР в диагностике бактериальных и вирусных инфекций	110
<i>Barkova I.A., Barkov A.M., Viktorov D.V.</i> Method of Immuno-PCR in diagnostics of bacterial and viral infections	
<i>Тараканова Ю.Н., Дмитриев А.Д., Дмитриев Д.А., Лавров В.Ф., Массино Ю.С., Печелюлько А.А., Сегал О.Л.</i> Твердофазный иммуноферментный анализ: история, теория и практическое использование	117
<i>Tarakanova Yu.N., Dmitriev A.D., Dmitriev D.A., Lavrov V.F., Massino Yu.S., Pechelyulko A.A., Segal O.L.</i> The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): history, theory and application	

ПОЗДРАВЛЯЕМ

**1 АПРЕЛЯ 2019 Г. ОТМЕТИЛ СВОЕ 90-ЛЕТИЕ
Д.М.Н., ПРОФЕССОР, АКАД. РАН,
КРУПНЫЙ ИНФЕКЦИОНИСТ И ЭПИДЕМИОЛОГ,
47 ЛЕТ РУКОВОДИВШИЙ ЦНИИЭ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
ПОКРОВСКИЙ ВАЛЕНТИН ИВАНОВИЧ.**

**ПОЗДРАВЛЯЕМ ЮБИЛЯРА,
ЖЕЛАЕМ ЕМУ КРЕПКОГО ЗДОРОВЬЯ!**