

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

СОЮЗ ПЕДИАТРОВ РОССИИ

ООО «С-ИНФО»

# ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

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

*Двухмесячный научно-практический журнал*

*Основан в 1924 г.*

3

май—июнь

МОСКВА 2018

«С-ИНФО»

## **СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:**

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

Адрес редакции и издателя:  
121059, Москва, ООО «С-инфо», а/я 88,

**Зав. редакцией Л.В.Иваничева**

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

Каталоги по доподписке на II полугодие 2018 г.:

Каталог «Агентство Роспечать»: индекс 71 436;  
объединенный каталог «Пресса России»: индекс 10 277.

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

---

Подписано в печать 17.05.18. Выход в свет 13.06.18.  
Формат 70x108 1/16. Печать офсетная.

---

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

© Е.Г.ТЮЛЕНЕВА, Э.А.МОСКВИТИНА, 2018

*Е.Г.Тюленева, Э.А.Москвитина*

### **ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МИГРАЦИИ НАСЕЛЕНИЯ В ВОЗМОЖНОСТИ ЗАНОСА ХОЛЕРЫ В СУБЪЕКТЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Определение степени потенциальной эпидемической опасности миграции населения в возможности заноса холеры в субъекты Российской Федерации с (без) международными пунктами пропуска на воздушном, морском, автомобильном и железнодорожном транспорте как составляющей при определении эпидемического потенциала территории. *Материалы и методы.* Использованы данные Управлений Роспотребнадзора по 83 субъектам Российской Федерации, в том числе по 61 субъекту с международными пунктами пропуска на воздушном, морском, автомобильном и железнодорожном транспорте, с учетом связей со странами, неблагополучными по холере, и в 22 — без международных пунктов пропуска (2011 — 2015 гг.). Использованы демографические показатели для характеристики интенсивности и определения степени потенциальной эпидемической опасности миграции населения. *Результаты.* В 83,6% субъектов установлен миграционный прирост населения при межгосударственной миграции различными видами транспорта. Разработан алгоритм эпидемиологической оценки и определена степень потенциальной эпидемической опасности (СПЭО) миграции населения в возможности заноса холеры для 83 административных территорий. Из 61 субъекта с пунктами пропуска в 17 установлена высокая СПЭО миграции населения, в 39 — повышенная и в 5 — низкая; в 22 субъектах без международных пунктов пропуска — 8, 12 и 2 соответственно. *Заключение.* Полученные результаты свидетельствуют о наличии эпидемиологических рисков, связанных с миграцией населения.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 3—10

Ключевые слова: миграция населения, международные пункты пропуска, заносы, холера

*E.G.Tyuleneva, E.A.Moskvitina*

### **EPIDEMIOLOGICAL ASSESSMENT OF POPULATION MIGRATION IN THE POSSIBILITY OF CHOLERA IMPORTATION INTO RUSSIAN FEDERATION CONSTITUENTS**

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

*Aim.* Determination of potential epidemic hazard degree of migration in the possibility of cholera importation into the RF constituents with (without) the international border crossing points by air, sea, road and rail transport, as a component when determining the epidemic potential of the territory. *Materials and methods.* The data of the Rospotrebnadzor Directorates for 83 Russian Federation constituents, including 61 subjects with air, sea, road and rail transport border crossing checkpoints, taking into account the links with countries affected by cholera, and in 22 without international checkpoints (2011 — 2015) were used. The analyses of demographic indicators for characterizing intensity and determination the potential epidemic hazard degree of migration was carried out. *Results.* The increase in population due to interstate migration by various

transports was determined in 83,6% subjects. The algorithm of epidemiological assessment was developed, with calculating the potential epidemic hazard degree (PEHD) of population migration in the possibility of cholera importation into 83 administrative subjects. The highest PEHD of migration was determined in 17 of 61 subjects with checkpoint sets; in 39 — higher than normal and in 5 — low; in 22 subjects without international checkpoints — in 8, 12 and 2, respectively. *Conclusion.* The obtained results indicate the presence of epidemiological risks associated with migration.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 3—10

Key words: migration, border crossing checkpoint, importation, cholera

## ВВЕДЕНИЕ

Заносы холеры и других инфекционных болезней, в том числе регламентированных Международными медико-санитарными правилами (2005 г.), в различные страны с последующими вспышками и эпидемиями обусловлены межконтинентальной, межгосударственной и внутригосударственной миграцией населения [6, 13]. Подтверждением этому является история начала семи пандемий холеры в странах Азии (с 1961 г.), Африки, Европы, в том числе России (с 1970 г.), Южной и Центральной Америки (с 1991 г.), Карибского бассейна (с 2010 г.), обусловленных заносами инфекции при миграция населения различными видами международного транспорта из стран, неблагополучных по холере. Миграция населения рассматривается Б.Л. Черкасским [14] как один из основных социальных факторов эпидемиологического риска с переходом из потенциального в реальный риск при активизации эпидемического процесса, определяя его генез. Миграция населения как одна из составляющих использовалась при районировании территории России по типам эпидемических проявлений [8]. Демографические показатели, характеризующие миграционные процессы населения, наряду с другими использованы при определении эпидемического потенциала административных территорий (территорий риска) Ростовской области при холере [5]. Оценка миграции населения в Ставропольский край из других регионов Российской Федерации, из стран СНГ и Балтии, а также из государств дальнего зарубежья использована в комплексе с санитарно-гигиеническими и природно-климатическими факторами для оценки и определения риска распространения холеры [2]. При дифференциации территории Забайкальского края на основе систематизации эпидемиологических рисков вероятность заноса опасных инфекционных болезней с эндемичных территорий рассматривается как внешний эпидемиологический риск, связанный с особенностями транспортной инфраструктуры и миграционных потоков населения [7]. Учитывая неблагополучную эпидемиологическую обстановку по холере в мире, неблагоприятный прогноз для России в плане возможных заносов инфекции [6], определение выраженности миграционных процессов с оценкой эпидемической опасности миграции населения представляет научный интерес на современном этапе седьмой пандемии холеры.

Цель работы — определение степени потенциальной эпидемической опасности миграции населения в возможности заноса холеры в субъекты Российской Федерации с (без) международными пунктами пропуска на воздушном, морском, автомобильном и железнодорожном транспорте как составляющей при определении эпидемического потенциала террито-

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки миграции населения использованы данные Управлений Роспотребнадзора по 83 субъектам (область, край, республика, автономный округ, город федерального значения) Российской Федерации, в том числе по 61 субъекту с международными пунктами пропуска на воздушном (ВПП), морском (МПП), автомобильном (МАПП) транспорте и в 22 — без международных пунктов пропуска (2011 — 2015 гг.). Использованы также сведения о миграции населения через международные пункты пропуска на железнодорожном транспорте (ППЖД) Управления Роспотребнадзора по железнодорожному транспорту по 15 субъектам. Сведения о миграции населения в Республике Крым взяты из [9]. При характеристике миграции населения брали показатели, характеризующие выраженность миграционных процессов населения: коэффициент интенсивности миграционного оборота (КИМО) — отношение суммы прибывших и убывших к численности населения в субъекте на 100 тыс. населения ( $0/0000$ ); коэффициент интенсивности чистой миграции (КИЧМ) — отношение сальдо миграции к численности населения ( $0/0000$ ) [3]; данные о наличии ВПП, МПП, МАПП и ЖДПП международных пунктов пропуска.

Для определения степени потенциальной эпидемической опасности (СПЭО) миграции населения в возможности заноса холеры применены: показатель интенсивности прибытий — отношение прибывших к численности населения в субъекте ( $0/0000$ ) [3]; данные о странах, с которыми осуществляются международные транспортные связи, в том числе, неблагополучных по холере; данные Федеральной службы государственной статистики о мигрантах из-за пределов Российской Федерации и численности населения в субъектах по состоянию на 01.01.2015 [12]. При статистической обработке вариационных рядов использованы показатели средних значений коэффициентов интенсивности прибытий, определение границ уровня проводили с учетом величины среднего квадратичного отклонения ( $\sigma$ ) от средней арифметической с использованием пакета программ Microsoft Office (Microsoft Excel, 2007). Значения коэффициентов ранжированы для выявления административных территорий с высокими, повышенными и низкими показателями [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что на территории Российской Федерации в 2011 — 2015 гг. международные пункты пропуска на воздушном транспорте были расположены в 56 субъектах, на морском — в 17, на автомобильном — в 24, на железнодорожном — в 15. Общее количество международных пунктов пропуска составило 267, в том числе ВПП — 71 (26,59%), МПП — 63 (23,60%), МАПП — 95 (35,58%), ЖДПП — 33 (12,36%) и пять (1,87%) смешанных (в период ледостава — автомобильный, в период навигации — водный).

Рассматривая миграцию населения как потенциальный эпидемиологический риск в возможности заноса холеры и активизации эпидемического процесса, следует отметить, что выраженность миграционных процессов, рассчитанная с использованием КИМО, позволила выявить административные территории с высокими значениями показателя при наличии различных видов международных пунктов пропуска (табл. 1).

Повышенные значения КИМО на воздушном транспорте в 12 субъектах варьировали от 5144,5 до 9786,5  $0/0000$ ; на морском и автомобильном — в шести субъектах; на железнодорожном — в четырех с показателями — 1681,3 —

Таблица 1. Субъекты Российской Федерации с высокими значениями коэффициентов интенсивности миграционного оборота на различных видах транспорта, 2011 — 2015 гг.

Наименование субъекта	КИМО (‰/0000)	Наименование субъекта	КИМО (‰/0000)
Международные пункты пропуска на воздушном транспорте			
Москва	369949,1	Иркутская область	20964,0
Санкт-Петербург	274797,0	Р. Башкортостан	19782,1
Московская область	251450,0	Краснодарский край	18697,0
Свердловская область	52434,3	Нижегородская область	16571,2
Калининградская область	30204,9	Белгородская область	16154,5
Хабаровский край	29935,4	Ханты-Мансийский АО	15208,6
Сахалинская область	28099,8	Омская область	14781,6
Красноярский край	26873,6	Челябинская область	14229,6
Самарская область	25831,3	Пермский край	12746,2
Р. Татарстан	23416,3	Кемеровская область	10914,1
Ростовская область	23119,4	Оренбургская область	10858,5
Приморский край	21831,7		
Международные пункты пропуска на морском транспорте			
Амурская область	106971,0	Краснодарский край	22926,0
Еврейская автономная обл.	57933,5	Хабаровский край	16321,0
Сахалинская область	32587,0	Мурманская область	13867,0
Санкт-Петербург	31105,0	Приморский край	12758,0
Международные пункты пропуска на автомобильном транспорте			
Ленинградская область	787186,0	Краснодарский край	176027,0
Белгородская область	468560,3	Амурская область	168704,0
Псковская область	432635,0	Курганская область	150803,0
Р. Карелия	350948,8	Ростовская область	147282,0
Оренбургская область	189398,0	Забайкальский край	132345,0
Международные пункты пропуска на железнодорожном транспорте			
Брянская область	381299,0	Ленинградская область	25093,0
Оренбургская область	226250,0	Калининградская область	22977,7
Белгородская область	148504,0	Приморский край	14407,0
Псковская область	59375,0	Курская область	10161,0
Ростовская область	29685,0		

9686,9 ‰/0000; 54 334,3 — 92 3819,0 ‰/0000; 5259,5 — 9407,2 ‰/0000 соответственно. Низкая интенсивность миграционного оборота выявлена в 21 субъекте при миграции населения через ВПП с значениями КИМО 1,0 — 4208,6 ‰/0000. В эту группу включены административные территории с МПП, МАПП и ЖДПП в трех, восьми и двух субъектах с коэффициентами 5,53 — 749,2 ‰/0000; 1935,0 — 40 391,4 ‰/0000 и 1281,9 — 2034,6 ‰/0000 соответственно. Необходимо отметить, что с использованием коэффициента интенсивности чистой миграции в 51 (83,6%) субъекте установлен миграционный прирост населения при межгосударственной миграции различными видами транспорта. В десяти регионах выявлено превышение числа убывшего населения через ВПП (Республики Дагестан, Кабардино-Балкария и Чувашия, Камчатский край, Магаданская и Липецкая области), МПП (Санкт-Петербург, Астраханская область) и МАПП (Ростовская область, Республика Карелия). Приведенные данные свидетельствуют об интенсивной с положительным сальдо международной миграции населения.

Для определения степени потенциальной эпидемической опасности миграции населения в возможности заноса холеры в субъектах с международными пунктами пропуска разработан алгоритм, включающий следующие этапы: расчет коэффициентов интенсивности прибытий с учетом приехавших из-за

пределов России в 56 субъектах с ВПП, в 17 — с МПП, в 24 — с МАПП и в 15 — с ЖДПП; систематизацию значений коэффициентов интенсивности прибытий с обработкой вариационных рядов по субъектам за 2011 — 2015 гг. по каждому виду транспорта; определение диапазонов значений указанных коэффициентов для каждого вида транспорта с градацией по трем рангам (высокий, повышенный и низкий) и соответствующей группировкой субъектов по всем видам международного транспорта; определение баллов — низкий, повышенный и высокий — эквивалентных ранжированным значениям коэффициентов интенсивности прибытий. Оценочная шкала баллов для определения СПЭО миграции населения (низкая, повышенная и высокая) в возможности заноса холеры для субъектов с (без) международными пунктами пропуска рассчитана по сумме баллов соответствующих показателей (табл. 2).

При эпидемиологической оценке миграции населения в возможности заноса холеры на территорию Российской Федерации для субъектов с международными пунктами пропуска на различных видах транспорта установлена высокая СПЭО (15 и более баллов) для Краснодарского, Приморского, Хабаровского, Красноярского краев, Калининградской, Оренбургской, Белгородской, Мурманской, Сахалинской, Омской, Астраханской, Ростовской областей, Республик Бурятия, Дагестан, Северная-Осетия Алания, Москвы и Санкт-Петербурга. При этом во всех административных территориях имеются пункты пропуска на воздушном транспорте, для которого установлена основная роль при заносах холеры [10]. При анализе связи со странами, неблагополучными по холере, выявлены возможные пути заноса инфекции через воздушные пункты пропуска в Краснодарский край из Афганистана, Индии, Кении; в Сахалинскую область и Приморский край — из Китая и Филиппин; в Ростовскую, Астраханскую, Омскую, Оренбургскую, Белгородскую области и Красноярский край — из Индии; в Санкт-Петербург — из Конго, Либерии и Доминиканской Республики; в Москву — из Индии, Непала, Афганистана, Мьянмы, Доминиканской Республики, Уганды; в Республику Бурятия — из Индии и Филиппин. Наличие международных воз-

Таблица 2. Эпидемиологическая оценка миграции населения в возможности заноса холеры

Наименование показателей		Ранжирование значений показателей (числитель) и их оценка в баллах (знаменатель)		
1. Коэффициент интенсивности прибытия (°/0000)	воздушным транспортом	<u>&lt;1000</u> 1	<u>1001—10000</u> 5	<u>&gt;10000</u> 7
	морским	<u>&lt;1000</u> 1	<u>1001—10000</u> 2	<u>&gt;10000</u> 3
	железнодорожным	<u>&lt;1000</u> 1	<u>10001—5000</u> 2	<u>&gt;5000</u> 3
	автомобильным	<u>&lt;10000</u> 1	<u>10001—20000</u> 3	<u>&gt;20000</u> 5
2. Прибывшие в субъекты из-за пределов России (°/0000)		<u>&lt;100</u> 1	<u>101—500</u> 2	<u>&gt;500</u> 3
Оценочная шкала баллов для субъектов с международными пунктами пропуска		1—5	6—14	15и более
Оценочная шкала баллов для субъектов без международных пунктов пропуска		1	2	3
Степень потенциальной эпидемической опасности		низкая	повышенная	высокая

Примечание. При осуществлении международных сообщений со странами, неблагополучными по холере, к оценочной шкале баллов прибавляется пять баллов.

душных пунктов пропуска определяет внешние эпидемиологические риски в плане заносов холеры, имевших место в Республику Дагестан из Пакистана (1993 г.), в Сахалинскую область из Китайской Народной Республики (1999 г.), в Москву из Индии (2010, 2012 и 2014 гг.).

Следует отметить осуществление миграции населения через пункты пропуска на всех других видах транспорта в Краснодарском крае, Приморском крае, Калининградской области и Республике Дагестан; в Санкт-Петербурге — на морском и железнодорожном; в Мурманской области и Хабаровском крае — на морском и автомобильном; в Оренбургской, Белгородской областях и Республике Бурятия — на автомобильном и железнодорожном; в Сахалинской и Астраханской областях, Красноярском крае — на морском; в Омской области и Республике Северная-Осетия Алания — на автомобильном; в Москве — на железнодорожном транспорте. Наличие международных пунктов пропуска на указанных видах транспорта имеет эпидемиологическое значение, так как известны случаи заноса холеры в Республику Дагестан (1994 г.) и в Приморский край (1999 г.) автомобильным транспортом, в Тверскую область и Москву (2005 г.) — железнодорожным. В Республике Крым ранее выявлена высокая СПЭО заноса холеры различными видами транспорта [9]. Импорт холеры (перенесшими инфекцию в пути следования или вибрионосителями) возможен при миграции населения через морские пункты пропуска в Краснодарский край из Нигерии, Кении, Мозамбика и Доминиканской республики; в Приморский край — из Филиппин, Индии и Мьянмы; в Калининградскую область — из Нигерии, Либерии, Конго, Ганы и Камеруна; в Мурманскую область — из Индии, Филиппин, Танзании и Нигерии; в Хабаровский край — из Филиппин; в Санкт-Петербург — из Конго, Либерии и Кении, в Сахалинскую область — из Индии и Филиппин.

В 34 (86,8%) субъектах с повышенной СПЭО миграции населения в возможности заноса холеры расположены международные воздушные пункты пропуска. При этом в Архангельскую, Вологодскую, Нижегородскую, Московскую, Самарскую области, Республики Башкортостан и Татарстан, Волгоградскую, Челябинскую области, Пермский край, Новосибирскую, Тюменскую, Томскую, Иркутскую, Кемеровскую области и в Республику Хакасия возможен занос холеры из Азии (Индия, Афганистан, Филиппины, Мьянма), на долю которой приходится наибольший удельный вес в структуре заносов в мире, в том числе межгосударственных и межконтинентальных [6]. В этом аспекте прогностически неблагоприятными являются также сообщения с эндемичными по холере странами Африки (Конго, Либерия, Уганда, Кения) и Америки (Доминиканская Республика). В административных территориях этой группы расположены также другие виды пунктов пропуска в различных сочетаниях: в Амурской области и Еврейской автономной области — МПП и МАПП; в Псковской, Брянской, Курской областях и Забайкальском крае — МАПП и ЖДПП; в Ленинградской области — МПП, МАПП и ЖДПП; в Архангельской области, Камчатском крае и Чукотском автономном округе — МПП; в Воронежской области, Республиках Карелия, Тыва и Алтай, Курганской области — МАПП.

В группу субъектов Российской Федерации с низкой СПЭО миграции населения в возможности заноса холеры вошли Магаданская область с ВПП и МПП, Липецкая и Ярославская области, Республика Калмыкия и Чувашская Республика, где имеются только ВПП. Транспортные сообщения через международные пункты пропуска в вышеуказанных субъектах со странами, неблагополучными по холере, отсутствуют.



Степень потенциальной эпидемической опасности определена также для 22 субъектов без международных пунктов пропуска, так как существует потенциальный риск распространения холеры по внутренним путям сообщения на всех видах транспорта [4]. Это подтверждается заносами холеры в Республику Башкортостан (2004 г.) и в Мурманск (2006 г.) железнодорожным транспортом после прибытия из Индии авиатранспортом. Установлена высокая СПЭО для Тверской, Калужской, Тамбовской, Тульской, Смоленской областей, Республик Мордовия, Адыгея и Ямало-Ненецкого автономного округа; для Владимирской, Ульяновской, Новгородской, Кировской, Костромской, Ивановской, Орловской, Пензенской, Рязанской областей, Республик Удмуртия и Марий-Эл — повышенная; для Ненецкого автономного округа, Республик Карачаево-Черкессии и Ингушетии определена низкая СПЭО.

Таким образом, разработан алгоритм эпидемиологической оценки и определена СПЭО миграции населения в возможности заноса холеры различными видами транспорта через международные пункты пропуска (без) для 83 административных территорий Российской Федерации. Из 61 субъекта с пунктами пропуска в 17 установлена высокая СПЭО миграции населения, в 39 — повышенная и в 5 — низкая; в 22 субъектах без международных пунктов пропуска — 8, 12 и 2 соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о наличии внешних эпидемиологических рисков, связанных с миграцией населения. Необходимо отметить, что выявление субъектов с учетом СПЭО миграции населения в возможности заноса холеры через воздушные, морские, автомобильные и железнодорожные международные пункты пропуска предусмотрено использовать в комплексе с другими данными при определении эпидемического потенциала территории.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев К.Г., Сегал А.Е. История эпидемий в России. М., Медгиз, 1960.
2. Васильева О.В., Савельев В.Н., Дубянский В.М., Куличенко А.Н. Совершенствование эпидемиологического надзора на территории I типа по эпидемическим проявлениям холеры на примере Ставропольского края. *Здоровье населения и среда обитания*. 2013, 10: 29-31.
3. Демографический энциклопедический словарь. Под ред. Валентей Д.И. и др. М., Сов. энциклопедия, 1985.
4. Москвитина Э.А., Горобец А.В., Прометной В.И. Эпидемиологическое значение миграции населения при холере. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. Актуальные вопросы 2003, 1: 15-19.
5. Москвитина Э.А., Горобец А.В., Ломов Ю.М., Прометной В.И., Михайлова Т.Н., Пашинцева Н.Ф., Стахова В.А., Богунов И.И., Баташев В.В., Иванова Н.Г., Мазрухо Б.Л., Шестиалтынова И.С., Федорук С.И., Ненадская С.А., Кузнецова Н.Р., Цесарская Е.А., Валиева С.З., Бондаренко М.Ю. Оценка эпидемического потенциала территории при холере с использованием комплекса показателей. *Журн. микробиол.* 2003, 6: 26-29.
6. Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Самородова А.В., Кругликов В.Д., Титова С.В. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и России в 2007-2016 гг., прогноз на 2017 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017, 1: 13-20.
7. Носков А.К., Вишняков В.А., Дампилова И.Г. Совершенствование эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями на основе комплексной оценки эпидемиологических рисков в Забайкальском крае. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. Актуальные вопросы. 2017, 1: 18-24.
8. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Титова С.В., Адаменко О.Л., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии. *Вестник РАМН*. 2015, 70 (2): 249-256.
9. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Москвитина Э.А., Пеньковская Н.А., Листопад С.А.,

Титова С.В., Кругликов В.Д. Определение типов эпидемических проявлений холеры в субъектах Крымского федерального округа (Республики Крым). Журн. микробиол. 2015, 6: 37-43.

10. Прометной В.И., Москвитина Э.А., Ломов Ю.М. Эпидемиологическое значение международных транспортных сообщений в возможности завоза опасных инфекционных болезней. Научная мысль Кавказа. Приложение. 2003, 1: 26-33.
11. Савилов Е. Д., Мамонтова Л. М., Астафьев В. А., Жданова С. Н. Применение статистических методов в эпидемиологическом анализе. М., МЕДпресс-информ, 2004.
12. Федеральная служба государственной статистики. <http://www.gks.ru>.
13. Черкасский Б.Л., Сергиев В.П., Ладный И.Д. Эпидемиологические аспекты международной миграции населения. М., Медицина, 1984.
14. Черкасский Б.Л. Риск в эпидемиологии. М., Практическая медицина, 2007.

Поступила 11.01.18

Контактная информация: Москвитина Эльза Афанасьевна, д.м.н., проф., 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863) 234-38-17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

А.В.Титков<sup>1</sup>, А.Е.Платонов<sup>1</sup>, О.А.Стуколова<sup>1</sup>,  
К.О.Мионов<sup>1</sup>, Г.М.Дмитриева<sup>2</sup>, Т.В.Кострыкина<sup>2</sup>,  
О.В.Сорокина<sup>3</sup>, В.И.Черных<sup>4</sup>, Н.С.Миноранская<sup>5</sup>

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕВЫХ БОРРЕЛИОЗОВ В КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ В КОНТЕКСТЕ ИЗУЧЕНИЯ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ *BORRELIA MIYAMOTOI*

<sup>1</sup>Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; <sup>2</sup>Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Красноярскому краю, Красноярск; <sup>3</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае, Красноярск; <sup>4</sup>Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи; <sup>5</sup>Красноярский государственный медицинский университет

*Цель.* Оценка распространенности иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) в безэритемной форме в Красноярском крае в сопоставлении с распространенностью ИКБ в эритемной форме, то есть болезни Лайма (БЛ). Выявление случаев «новой» инфекции *Borrelia miyamotoi* (ИКБ-БМ) среди больных с подозрением на клещевую инфекцию, в первую очередь, среди больных ИКБ в безэритемной форме (ИКБ-БЭФ). *Материалы и методы.* Проведен анализ базы данных Роспотребнадзора, содержащей индивидуализированную информацию о случаях ИКБ, официально зарегистрированных в Красноярском крае в 2011 — 2016 гг. Собраны и изучены образцы крови от 18 больных с подозрением на клещевую инфекцию, госпитализированных в больницу скорой медицинской помощи г. Красноярск в 2017 г. Диагноз ИКБ-БМ ставили по выявлению ДНК *B. miyamotoi* в крови и/или выявлению антител к специфическим антигенам *Результаты.* При средней заболеваемости ИКБ порядка 10 случаев на 100 тыс. населения в год доля ИКБ-БЭФ среди всех ИКБ в Красноярском крае составляет около 45%. Эпидемиологические характеристики ИКБ-БЭФ и БЛ схожи, но клинически эти заболевания сильно отличаются. По результатам проведенной нами углубленной лабораторной диагностики все изученные случаи ИКБ-БЭФ и часть случаев клещевых инфекций неясной этиологии были вызваны *B. miyamotoi*. *Заключение.* ИКБ-БЭФ — широко распространенное заболевание в Красноярском крае, вызываемое преимущественно *B. miyamotoi*. Результаты исследования существенно расширяют известный ареал ИКБ-БМ.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 10—18

Ключевые слова: иксодовые клещевые боррелиозы, эпидемиология, *Borrelia miyamotoi*, эритемная форма, безэритемная форма, Красноярский край

A.V. Titkov<sup>1</sup>, A.E. Platonov<sup>1</sup>, O.A. Stukolova<sup>1</sup>,  
K.O. Mironov<sup>1</sup>, G.M. Dmitrieva<sup>2</sup>, T.V. Kostrykina<sup>2</sup>,  
O.V. Sorokina<sup>3</sup>, V.I. Chernykh<sup>4</sup>, N.S. Minoranskaya<sup>5</sup>

## EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF IXODES TICK-BORNE BORELIOSES IN THE KRASNOYARSK TERRITORY IN THE CONTEXT OF SEARCHING FOR THE CASES OF INFECTION CAUSED BY *BORRELIA MIYAMOTOI*

<sup>1</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; <sup>2</sup>Administration of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Krasnoyarsk Territory, Krasnoyarsk; <sup>3</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in Krasnoyarsk Territory, Krasnoyarsk; <sup>4</sup>Krasnoyarsk Inter-District Clinical Emergency Hospital; <sup>5</sup>Krasnoyarsk State Medical University, Russia

*Aim.* Estimation of the prevalence of Ixodes tick-borne borreliosis (ITBB) without erythema migrans in the Krasnoyarsk Territory in comparison with the prevalence of ITBB with erythema, that is Lyme disease (LD). Detection of cases of «new» infection caused by *Borrelia miyamotoi* (ITBB-BM) among patients with suspected tick-borne infection, primarily among patients with ITBB without erythema (ITBB-W/O-E). *Materials and methods.* We analyzed the database of Rospotrebnadzor containing individualized information about cases of ITBB officially registered in the Krasnoyarsk Territory in 2011 – 2016. Blood samples from 18 patients with suspected of tick-borne infection hospitalized in the Krasnoyarsk Emergency Hospital in 2017 were collected and studied. ITBB-BM was diagnosed if *B. miyamotoi* DNA was found in patient's blood and/or the antibodies to specific antigens of *B. miyamotoi* were detected. *Results.* With an average annual incidence rate of ITBB of about 10 cases per 100,000 population, the proportion of ITBB-W/O-E among all ITBB in the Krasnoyarsk Territory is about 45%. Epidemiological characteristics of ITBB-W/O-E and LD are similar, but these diseases are very different clinically. All cases of ITBB-W/O-E and some cases of tick-borne infections of unknown etiology, subjected to our enhanced laboratory diagnostics, were caused by *B. miyamotoi*. *Conclusion.* ITBB-W/O-E is a widespread disease in the Krasnoyarsk Territory, caused mainly by *B. miyamotoi*. The results of the study significantly expand the known geographic area of the ITBB-BM.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 10–18

Key words: Ixodes tick-borne borreliosis, epidemiology, *Borrelia miyamotoi*, borreliosis with erythema, borreliosis without erythema, Krasnoyarsk Territory

## ВВЕДЕНИЕ

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) — одно из самых распространенных природно-очаговых заболеваний на территории РФ [7, 8]. Социально-экономический ущерб от ИКБ сопоставим с ущербом от клещевого вирусного энцефалита (ВКЭ) и оценивается приблизительно в 783 млн руб. (в ценах 2011 г.) и 16 400 потерянных «лет полноценной жизни» (DALY) [8]. Традиционно считалось, что ИКБ и болезнь Лайма (БЛ) — это синонимические названия одной и той же нозологической единицы. В основном источнике сведений об инфекционных заболеваниях, подлежащих обязательному статистическому учету Роспотребнадзором на федеральном уровне, а именно в форме №2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях», соответствующая графа так и именуется — «Клещевой боррелиоз (болезнь Лайма)». Однако в последнее десятилетие была показана необходимость различать «классическую» БЛ, то есть ИКБ, вызываемый спирохетами *Borrelia burgdorferi sensu lato*, и «новое» инфекционное заболевание — ИКБ, вызываемый *Borrelia miyamotoi* (ИКБ-БМ) [4, 13, 18, 20]. Систематические полевые

исследования ИКБ-БМ в Свердловской области и Удмуртской Республике, проводимые специалистами ЦНИИ эпидемиологии в 2009 — 2017 гг., выявили, среди прочего, два важных обстоятельства: 1) число случаев ИКБ-БМ и БЛ в этих регионах сопоставимо; 2) ИКБ-БМ — заболевание, клинически более близкое к клещевым возвратным лихорадкам (КВЛ), чем к БЛ, протекающее в 95 — 100% в безэритемной форме и характеризующееся выраженным лихорадочным синдромом [1, 9, 12, 13]. Напротив, в лабораторно подтвержденных случаях «настоящей» БЛ в 95 — 100% случаев наблюдается мигрирующая эритема (МЭ). Это различие позволяет поставить задачу отдельного рассмотрения эпидемиологии эритемных форм ИКБ (ИКБ-ЭРФ) и безэритемных форм ИКБ (ИКБ-БЭФ). В предыдущие годы отмечены отдельные публикации о частой встречаемости ИКБ-БЭФ в Кировской и Томской областях, Прибайкалье, Красноярском и Приморском краях [2, 3, 5, 10, 14, 16]. Однако эти публикации были ориентированы на клинический анализ десятков, в лучшем случае — сотен случаев ИКБ. В то же время, органами Роспотребнадзора в субъектах РФ ведется индивидуальный учет случаев ИКБ, в том числе, в ряде регионов с учетом формы заболевания. В данной публикации будет проанализирован массив данных по всем зарегистрированным случаям ИКБ в Красноярском крае в 2011 — 2016 гг. и приведены первые результаты пилотного лабораторного исследования этиологии ИКБ в г. Красноярск.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами служили официальные учетные данные Управления Роспотребнадзора по Красноярскому краю, собранные в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.1.3310-15, раздел 5 «Регистрация, учет и статистическое наблюдение случаев заболевания инфекциями, передающимися иксодовыми клещами» [11]. Данные сохранялись в виде файла Excel, содержащего 11 листов, соответствующих заболеваемости ИКБ, зарегистрированной в г. Красноярск с подведомственными территориями и в 10 регионах, в которых санитарно-эпидемиологический надзор осуществляли 10 Территориальных отделов Управления (структура Управления приведена на странице <http://24.rospotrebnadzor.ru/about/structure/>). Двумя оставшимися Территориальными отделами в Туруханском районе и в Эвенкийском муниципальном районе случаев ИКБ зарегистрировано не было.

Случай ИКБ определялся как официально зарегистрированный индивидуальный случай заболевания, содержащийся в представленной базе данных с указанием «Клещевой боррелиоз» в графе «Подтвержденный диагноз». Случаи ИКБ-ЭРФ и ИКБ-БЭФ — случаи ИКБ, содержащие, соответственно, указания на наличие или отсутствие МЭ в графах «Подтвержденный диагноз», или «Примечание (подтвержденный диагноз)», или «Наличие эритемы». Случай ИКБ-БМ — случай ИКБ, при котором в крови больного обнаруживается ДНК *B. miyamotoi* или антитела к специфическим антигенам *B. miyamotoi*.

Пациенты — 18 больных, госпитализированных в Красноярскую межрайонную клиническую больницу скорой медицинской помощи в июне-августе 2017 г. с подозрением на клещевую инфекцию. Образцы крови забирали при поступлении (плазма и сыворотка — для ПЦР и серологического исследования соответственно) и при выписке (только сыворотка). Данные о клинико-

лабораторных особенностях заболевания получены из историй болезни пациентов.

ДНК *V. miyamotoi* выявляли с помощью ПЦР в реальном времени по методикам, описанным ранее [9, 13, 20]. В качестве мишени специфической ПЦР использовали ген глицеролфосфодиэстер-фосфодиэстеразы *GlpQ*, фермента *V. miyamotoi*. Уровень антител к *GlpQ* и четырем антигенным вариантам главных вариабельных поверхностных белков (Variable Major Proteins — VMPs) *V. miyamotoi*, называемым *Vlp15/16*, *Vlp18*, *Vsp1* и *Vlp5*, измеряли с помощью разработанного в ЦНИИ эпидемиологии планарного белкового биочипа; этот же чип содержал антигены 7 белков *V. burgdorferi sensu lato*, используемых для расширенной серологической диагностики БЛ [15, 22].

Все статистические расчеты и оценки проведены с помощью лицензионной программы IBM SPSS Statistics 19. Для оценки значимости различий распределений количественных и качественных переменных использовали стандартные непараметрические методы [6].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

База данных после сверки индивидуальных записей, удаления дубликатов и записей с существенно неполным содержанием содержит информацию о 1440 случаях ИКБ. Это соответствует среднегодовой заболеваемости ИКБ, равной 9.9 случаев на 100 тыс. населения. После исключения 10 завозных случаев ИКБ, зарегистрированных севернее 61 параллели, и 23 случаев, для которых отсутствовали информация о форме заболевания, в анализ были включены 1407 случаев (табл.). Для заболеваемости ИКБ типичны циклические колебания; в период 2011 — 2016 гг. максимум достигался в 2011 г., минимум — в 2014 г. (11.2 и 6.4 случаев на 100 тыс соответственно). В пространственном разрезе наибольшая заболеваемость ИКБ зарегистрирована в г. Красноярск (12.7 случая на 100 тыс.), на который приходится около 60% всех заболеваний ИКБ, выявленных в крае. Наименьшая заболеваемость (4.6 случая на 100 тыс.) отмечена на территории, подведомственной Территориальному отделу Управления в г. Ачинск и включающей Ачинский, Боготольский, Большеулуйский, Бирилюсский, Козульский, Назаровский и Тюхтетский районы.

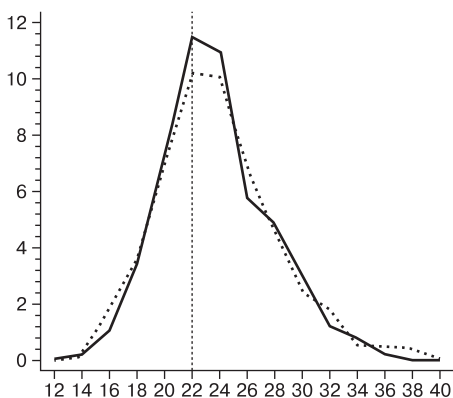
Из табл. следует, что на фоне сравнительно стабильной заболеваемости ИКБ стабильна и доля ИКБ в безэритемной форме (ИКБ-БЭФ), составляя в среднем (медианное значение по годам наблюдения) 42.5%. Несомненно, данная клиническая форма требует пристального внимания. При этом доля ИКБ-БЭФ среди всех ИКБ резко варьирует от региона к региону: от 4% (3 случая из 73) в Ачинске до 71% (65 случаев из 92) на территории, подведомственной отделу Управления в г. Лесосибирск. Нет никаких оснований считать это различие, наблюдающееся в соседних регионах, обусловленным реальными

**Заболеваемость иксодовыми клещевыми боррелиозами в Красноярском крае**

Год	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Всего
Красноярский край							
Число случаев ИКБ	272	262	226	155	232	260	1407
Из них: ИКБ-БЭФ	116 (42.8%)	115 (43.9%)	95 (42.2%)	55 (35.5%)	84 (36.4%)	115 (44.4%)	580 (41.2%)
Заболеваемость ИКБ-БЭФ (на 100 тыс. населения)	4.8	4.7	3.9	2.3	3.5	4.7	4.0

ми различиями в эпидемиологии ИКБ. Более вероятно, что доля ИКБ-БЭФ зависит от выявляемости больных этой клинической формой ИКБ. В частности, диагноз ИКБ-БЭФ, в отличие от диагноза ИКБ-ЭРФ, требует лабораторного подтверждения. Если больные без МЭ не госпитализируются и/или не проводится серологическое определение уровня антител к боррелиям в их крови — они «ускользают» от регистрации Роспотребнадзором. Вероятно, наиболее достоверной оценкой доли ИКБ-БЭФ следует считать ее медианное значение по регионам регистрации (46%), наблюдающееся как раз в г. Красноярске, характеризующемся высокими стандартами оказания медицинской помощи и дающем наибольший вклад в заболеваемость ИКБ в крае. Далее мы рассмотрим эпидемиологические особенности ИКБ-БЭФ и ИКБ-ЭРФ без учета их различий по району наблюдения.

Среди заболевших преобладали мужчины (57% при ИКБ-БЭФ и 58% при ИКБ-ЭРФ). Возраст варьировал в широких пределах — от года до 90 лет. При этом средний (медиана) возраст больных ИКБ-БЭФ составлял 50 лет, интерквартильный интервал (ИИ) — от 33 до 62 лет; больные ИКБ-ЭРФ были старше: средний возраст — 56 лет, ИИ — от 39 до 65 лет (уровень значимости различия между группами  $p = 0,00001$ , критерий Манна-Уитни). При этом для обеих клинических форм минимальная заболеваемость регистрировалась в возрасте 7 — 17 лет, максимальная — в возрасте 55 — 65 лет. Некоторые эпидемиологические характеристики не отличались значимо при ИКБ-БЭФ и ИКБ-ЭРФ, по таким характеристикам показатели приводятся для всего массива данных. Так, например, практически не отличалась ( $p=0,97$ ) сезонность ИКБ-БЭФ и ИКБ-ЭРФ (рис. 1). Чаще всего (мода) присасывание клещей, вызвавшее впоследствии ИКБ, происходило на 22 «эпидемиологической неделе» года, то есть с 28 мая по 3 июня; 50% всех случаев присасывания клещей укладывалось в ИИ от 21 до 26 недели (с 14 мая по 1 июля). Самое раннее зарегистрировано 25 марта, самое позднее — 29 сентября. Симптомы заболевания проявлялись в среднем (медианное значение) через 11 дней после присасывания клеща, ИИ для инкубационного периода — от 6 до 16 дней. Больные госпитализировались на 2 день заболевания (медиана); ИИ от 1 до 6 дней. В 20% случаев ИКБ лечение проводили амбулаторно. При поступлении правильный диагноз (ИКБ) был поставлен 83% больных ИКБ-ЭРФ, но только 68% больных ИКБ-БЭФ (уровень значимости различия между группами  $p=10^{-11}$ ); в подавляющем большинстве случаев несовпадения первичного диагноза с окончательным при поступлении подозревали КВЭ в лихорадочной форме. Средний срок стационарного лечения при ИКБ-БЭФ — 15 дней (ИИ от 12 до 22 дней), при ИКБ-ЭРФ — 13 дней (ИИ от 10 до 16 дней),  $p=10^{-8}$ . По нашему опыту работы в стационарах Свердловской области более длительное лечение больных с ИКБ-БЭФ может быть обусловлено двумя обстоятельствами: объективно более тяжелым течением ИКБ-БЭФ по сравнению с



**Рис. 1.** Сезонность ИКБ-БЭФ и ИКБ-ЭРФ.

По оси абсцисс: эпидемиологическая неделя года (первая неделя начинается 1 января), по оси ординат: доля случаев присасывания клещей в эту неделю, в % от всех случаев присасывания, приведших впоследствии к заболеванию ИКБ. Сплошная линия — ИКБ-БЭФ, пунктирная линия — ИКБ-ЭРФ.

ИКБ-ЭРФ; поздним началом антибиотикотерапии при ИКБ-БЭФ, поскольку этиологически верный диагноз может быть поставлен только после получения положительных результатов серологического исследования, в то время как для постановки диагноза ИКБ-ЭРФ достаточно наличия МЭ при поступлении. Эти обстоятельства не могут быть прослежены по имеющейся базе данных, поскольку состояние больных ИКБ-ЭРФ и ИКБ-БЭФ в 96 — 97% случаев оценивалось врачами как среднетяжелое, а точная дата постановки этиологического диагноза не была указана.

Таким образом, за исключением собственно наличия/отсутствия МЭ, база данных не содержит основных эпидемиологических показателей, с помощью которых можно было бы надежно дискриминировать ИКБ-ЭРФ и ИКБ-БЭФ в Красноярском крае и выделить случаи с подозрением на инфекцию *B. miyamotoi*. Выявление случаев ИКБ-БМ необходимо проводить лабораторными методами.

Из 18 изученных нами пациентов с подозрением на клещевую инфекцию, госпитализированных в Красноярске в 2017 г., один был выписан с диагнозом ОРЗ и четыре — с окончательным диагнозом КВЭ, лихорадочная форма. Мы не нашли ДНК боррелий или антиборрелиозных антител в крови этих больных и присоединяемся к диагнозу, поставленному лечащими врачами.

Трое больных с МЭ были выписаны с диагнозом ИКБ-ЭРФ. Этот диагноз подтверждается выявлением у них с помощью иммуночипа антител к антигенам *B. burgdorferi sensu lato* (IgM к OspC, а также p17 или p58; IgG к BVK32, а также VlsE или OspC).

Трое больных были выписаны с диагнозом ИКБ-БЭФ (на основании выявления антител к боррелиям), четверо — с диагнозом КВЭ, лихорадочная форма, неуточненный (без серологического подтверждения диагноза КВЭ) и один — с диагнозом ОРЗ. Мы считаем возможным поставить этим восьми больным диагноз ИКБ-БМ, поскольку в крови двух из них найдены и ДНК *B. miyamotoi* и антитела к G1pQ и VMPs, в крови двух других — только ДНК *B. miyamotoi*, в крови оставшихся четырех — только антитела к специфическим антигенам *B. miyamotoi*.

Один больной был выписан с серологически подтвержденным диагнозом КВЭ, в его крови были обнаружены IgM к G1pQ, V1p15/16 и V1p5. Данный случай можно рассматривать как смешанную инфекцию КВЭ и ИКБ-БМ.

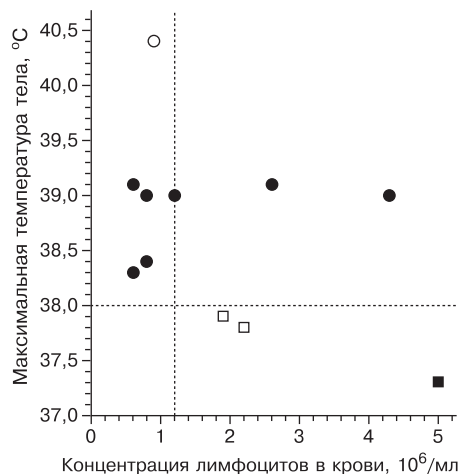
Наконец, еще один больной был выписан с диагнозом КВЭ, менингоэнцефалитическая форма и имел IgM к вирусу клещевого энцефалита. В его крови обнаружен высокий уровень IgG к G1pQ, V1p15/16 и V1p5. Вероятно, он перенес инфекцию *B. miyamotoi* за 1 — 3 года до КВЭ, поскольку именно таков срок персистенции IgG к антигенам *B. miyamotoi* [17].

Таким образом, среди 18 больных с подозрением на клещевую инфекцию выявлено, как минимум, восемь больных ИКБ-БМ, включая всех трех больных, которым был поставлен диагноз ИКБ-БЭФ и которые будут учтены с этим диагнозом в базе данных Роспотребнадзора.

Клинические проявления ИКБ-БМ подобны тем, которые были выявлены при систематическом изучении данной инфекции в других регионах. Для заболевания характерен лихорадочный синдром (максимальная температура тела  $39.0 \pm 0.6^\circ\text{C}$ , приведено среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение), сопровождающийся слабостью и головной болью; тромбоцитопения наблюдается у 63% больных ИКБ-БМ (медиана —  $161 \times 10^9/\text{мл}$ , ИИ — от 145 до 286); уровень печеночных трансаминаз АЛТ и АСТ в крови повышен (концентрация АЛТ: медиана — 32, ИИ от 24 до 148) и у 50% больных выходит за

референтные (нормальные) значения. Абсолютная лимфопения наблюдалась у 6 из 8 больных ИКБ-БМ (медиана —  $0,85 \times 10^6$ /мл, ИИ — от 0,7 до 1,9). Нарушение функций почек проявляется наличием белка в моче у 75% больных ИКБ-БМ (медиана — 0,34 г/л, ИИ — от 0,1 до 0,38). Несмотря на малое количество наблюдений, отличие ИКБ-БМ от ИКБ-ЭРФ по выраженности лихорадки статистически достоверно ( $p=0,01$ , критерий Манна-Уитни), а по концентрации лимфоцитов в крови находится на границе достоверности ( $p=0,07$ ). Совместный учет этих показателей (рис. 2) четко отличает симптомокомплекс, присущий ИКБ-БЭФ (генерализованная инфекция с лихорадочным синдромом, потреблением форменных элементов крови и признаками преходящих дисфункций ряда органов), от локализованной формы ИКБ-ЭРФ, то есть болезни Лайма.

ИКБ-БЭФ, вызываемое *V. miyamotoi* — широко распространенное заболевание в Красноярском крае, по частоте встречаемости не уступающее и, вероятно, даже превосходящее БЛ, вызываемую *V. burgdorferi sensu lato*. Эти две инфекции переносятся одними и теми же иксодовыми клещами [19, 21, 23], поэтому их основные эпидемиологические характеристики, такие как начало и конец эпидемического сезона, период максимального подъема заболеваемости, половой и возрастной состав заболевших и т.п., схожи. Как следствие, база данных Роспотребнадзора не содержит информации, кроме собственно наличия или отсутствия МЭ, позволяющей дискриминировать инфекции *V. miyamotoi* и *V. burgdorferi sensu lato*. Ранее было показано, что применяемые в рутинной диагностической практике ИФА тест-системы для диагностики боррелиоза также не позволяют дифференцировать данные инфекции, поскольку содержат антигены, общие для этих двух видов боррелий [4, 20]. В ЦНИИ эпидемиологии были разработаны методы специфической диагностики инфекций *V. miyamotoi* и *V. burgdorferi sensu lato*, основанные на применении ПЦР в реальном времени и детекции IgM и IgG с помощью планарного белкового иммуночипа [15]. Применив эти методы в пилотном исследовании образцов крови, собранных от больных с подозрением на клещевые инфекции в г. Красноярск, мы подтвердили инфекцию *V. miyamotoi* в трех из трех изученных случаев ИКБ-БЭФ и выявили инфекцию *V. miyamotoi* еще в пяти случаях клещевых инфекций неясной этиологии, обычно рассматривавшихся без достаточных на то оснований как КВЭ. Напротив, в трех из трех изученных случаев ИКБ-ЭРФ была серологически подтверждена инфекция *V. burgdorferi sensu lato*. Исходя из этого, можно прийти к предположению, безусловно, предварительному, что заболеваемость ИКБ-БМ в Красноярском крае, по крайней мере, не ниже, чем заболеваемость



**Рис. 2. Некоторые клинические особенности ИКБ-БЭФ и ИКБ-ЭРФ.**

Каждая точка соответствует одному больному ИКБ-БЭФ (кружки) или ИКБ-ЭРФ (квадраты). Черными маркерами отмечены больные, у которых количество тромбоцитов и/или концентрация АЛТ в крови и/или концентрация белка в моче выходили за референтные значения. Полыми маркерами отмечены больные, у которых эти показатели находились в пределах нормы. Для ИКБ-БМ характерны высокая лихорадка, лимфопения, тромбоцитопения, признаки поражения печени и почек (группа черных маркеров в верхнем левом углу рисунка).



ИКБ-БЭФ, зарегистрированная в базе данных Роспотребнадзора, то есть превышает 4 случая на 100 тыс. населения в год. Результаты исследования существенно расширяют известный ареал ИКБ-БМ и подчеркивают актуальность этой инфекции для здравоохранения Российской Федерации и Евразии в целом.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-15-00072).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Багаутдинова Л.И., Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Стуколова О.В., Шипулин Г.А., Малеев В.В., Дударев М.В. Катамнез больных иксодовыми клещевыми боррелиозами, вызванными *Borrelia miyamotoi* или *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Терапевтический архив. 2016, 88 (11): 43-54.
2. Бондаренко А.Л., Аббасова С.В. Сравнительная характеристика эритемных и безэритемных форм иксодовых клещевых боррелиозов. Инфекционные болезни. 2005, 3 (1): 12-16.
3. Бургасова О.А., Усков А.Н., Гринченко Н.Е., Ценева Г.Я. Особенности содержания цитокинов в сыворотке крови больных иксодовым клещевым боррелиозом с различными клиническими проявлениями. Журн. микробиол. 2010, 3: 67-71.
4. Карань Л.С., Колясникова Н.М., Махнева Н.А. Топоркова М.Г., Надеждина М.В., Есаулкова А.Ю., Романенко В.В., Арумова Е.А., Платонов А.Е., Малеев В.В. Применение ПЦР в режиме реального времени для диагностики различных клещевых инфекций. Журн. микробиол. 2010, 3: 72-77.
5. Миноранская Н.С., Усков А.Н., Миноранская Е.И. Хроническое течение иксодовых клещевых боррелиозов в Красноярском крае. Журнал инфектологии. 2014, 2: 36-42.
6. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М., Издательство РАМН, 2000.
7. Платонов А.Е., Карань Л.С., Гаранина С.Б., Шопенская Т.А., Колясникова Н.М., Платонова О.В., Федорова М.В. Природно-очаговые инфекции в XXI веке в России. Эпидемиология и инфекционные болезни 2009, 2: 38-44.
8. Платонов А.Е., Авксентьев Н.А., Авксентьева М.В., Деркач Е.В., Платонова О.В., Титков А.В., Колясникова Н.М. Социально-экономическое бремя пяти природно-очаговых инфекций в Российской Федерации. Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2015, 8 (1): 47-56.
9. Платонов А.Е., Топоркова М.Г., Колясникова Н.М., Стуколова О.А., Долгова А.С., Бродовикова А.В., Махнева Н.А., Карань Л.С., Koetsveld J., Шипулин Г.А., Малеев В.В. Клиника иксодового клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*, в контексте иммунного ответа на возбудитель. Терапевтический архив. 2017, 89 (11): 34-42.
10. Помогаева А.П., Обидина О.В., Караваева М.О. Клинические формы иксодового клещевого боррелиоза у детей Томской области и содержание железа, меди и магния в сыворотке крови. Инфекционные болезни. 2006, 4 (2): 17-19.
11. СП 3.1.3310-15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами» <https://rg.ru/2016/03/01/klesh-dok.html>.
12. Сарксян Д.С., Малеев В.В., Платонов А.Е., Платонова О.В., Карань Л.С. Рецидивирующее (возвратное) течение заболевания, вызванного *Borrelia miyamotoi*. Терапевтический архив. 2015, 87 (11): 18-25.
13. Сарксян Д.С., Платонов А.Е., Карань Л.С., Малинин И.Е., Халитова Л.И., Шахов В.И., Дударев М.В., Малинин О.В., Малеев В.В. Клинические особенности «нового» клещевого боррелиоза, вызываемого *Borrelia miyamotoi*. Терапевтический архив. 2012, 84 (11): 34-41.
14. Симакова А.И. Иксодовый клещевой боррелиоз в Приморском крае. Тихоокеанский медицинский журнал 2005, 1: 68-71.
15. Стуколова О.А., Колясникова Н.М., Сарксян Д.С., Топоркова М.Г., Koetsveld J., Карань Л.С., Черкашина А.С., Маркелов М.Л., Долгова А.С., Novius J.W., Шипулин Г.А., Платонов А.Е. Разработка и использование планарного белкового биочипа для серологической диагностики клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*. В кн.: Молекулярная диагностика 2017. Под ред. Покровского В.И. Тамбов, ООО «Юлис», 2017, 2, с. 151-152.

16. Черногор Л.И., Арбатская Е.В., Данчинова Г.А., Козлова И.В., Горина М.О., Сунцова О.В., Чапоргина Е.А., Великов С.И., Борисов В.А. Клинико-лабораторная характеристика иксодового клещевого боррелиоза в Прибайкалье. Журн. микробиол. 2005, 6: 60-62.
17. Jahfari S., Sarkysyan D.S., Kolyasnikova N.M., Hovius J.W., Sprong H., Platonov A.E. Evaluation of a serological test for the diagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease in Europe. J. Microbiol. Methods 2017, 136: 11-16.
18. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A., Toporkova M.G., Sarkysyan D.S., Oei A., Platonov A.E., Hovius J.W. Development and optimization of an in vitro cultivation protocol allows for isolation of *Borrelia miyamotoi* from patients with hard tick-borne relapsing fever. Clin. Microbiol. Infect. 2017, 23 (7): 480-484.
19. Krause P.J., Fish D., Narasimhan S., Barbour A.G. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. Clin. Microbiol. Infect. 2015, 21 (7): 631-639.
20. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., Krause P.J., Fish D. Humans infected with the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. Emerg. Infect. Dis. 2011, 17 (10): 1816-1822.
21. Sarkysyan D.S., Platonov A.E., Karan L.S., Shipulin G.A., Sprong H., Hovius J.W. Probability of spirochete *Borrelia miyamotoi* transmission from ticks to humans. Emerg. Infect. Dis. 2015, 21 (12): 2273-2274.
22. Wagemakers A., Koetsveld J., Narasimhan S., Wickel M., Deponte K., Bleijlevens B., Jahfari S., Sprong H., Karan L.S., Sarkysyan D.S., van der Poll T., Bockenstedt L.K., Bins A.D., Platonov A.E., Fikrig E., Hovius J.W. Variable Major Proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. J. Immunol. 2016, 196 (10): 4185-4195.
23. Wagemakers A., Staarink P.J., Sprong H., Hovius J.W. *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. Trends Parasitol. 2015, 31 (6): 260-269.

*Поступила 22.11.17*

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*А.Л.Кравцов, С.В.Генералов, В.А.Кожевников,  
Ю.К.Гаврилова, Е.Г.Абрамова, А.В.Кочкин, А.К.Никифоров*

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ БЕШЕНСТВА КЛЕТОК ЛИНИИ VERO С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

*Цель.* Экспериментальное обоснование возможности определения в культуре доли инфицированных вирусом бешенства клеток линии Vero с использованием проточной цитометрии (ПЦ) и диагностического антирабического иммуноглобулина (ДАИ), меченого ФИТЦ (ВНИИЗЖ, г. Владимир). *Материалы и методы.* Фиксацию и пермебиализацию клеток Vero, инфицированных вирусом бешенства «Москва 3253», проводили с помощью реагента Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, USA) по методу Vengatesan D. et al. (2006). и внутриклеточный антиген окрашивали ДАИ. Процент инфицированных клеток определяли с помощью ПЦ через 24, 48 и 72 ч., а также через 48 ч при инфицировании клеточных культур десятикратными разведениями вирусосодержащей жидкости от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ . *Результаты.* Доля инфицированных клеток возрастала в промежутке времени от 24 до 48 ч в среднем с 30 до 70%. При добавлении к клеткам вирусосодержащей жидкости в разведении  $10^{-3}$  методом ПЦ обнаружено  $6,9 \pm 0,21$  % инфицированных клеток Vero ( $P < 0,001$ ,  $n=3$ ). *Выводы.* ПЦ проявила себя как быстрый, чувствительный и надёжный метод определения относительного числа инфицированных вирусом бешенства клеток Vero. Препарат ДАИ обладал активностью, достаточной для его эффективного использования в автоматизированном варианте постановки МФА на базе метода ПЦ. Использование ПЦ возможно на различных этапах производства и контроля антирабических препаратов,

а также перспективно с точки зрения дальнейшего совершенствования диагностики бешенства.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 18—25

Ключевые слова: вирус бешенства, проточная цитометрия, культура клеток Vero

*A.L.Kravtsov, S.V.Generalov, V.A.Kozhevnikov,  
Yu.K.Gavrilova, E.G.Abramova, A.V.Kochkin, A.K.Nikiphorov*

## **DETERMINATION OF THE RABIES VIRUS-INFECTED VERO LINE CELL PORTION BY FLOW CYTOMETRY**

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

*Aim.* Experimental substantiation of possibility to determine the rabies virus-infected Vero cell line portion in culture by flow cytometry (FC) and FITC labeled diagnostic anti-rabies immunoglobulin (DAI), manufactured in Russia. *Materials and methods.* Fixation and permeabilization of Vero cells, infected by rabies virus strain «Moscow 3253», was carried out by means of Cytofix/Cytoperm reagent (BD Biosciences, USA) according the Vengatesan D. et al. method (2006) and then intracellular rabies antigen was stained by DAI. Percentage of infected cells was determined by FC in 24, 48 and 72 h and as well in 48 h when the cell cultures were infected with tenfold dilutions of virus-containing fluid from  $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ . *Results.* There was a significant increase in the percentage of infected cells on average from 30 to 70% in time interval from 24 to 48 h. With 1000-fold dilution of viral-containing fluid the FC method detected the  $6,9 \pm 0,21\%$  of infected cells in Vero cultures ( $P < 0,001$ ,  $n=3$ ). *Conclusion.* FC has proved to be a fast, sensitive and reliable method for determining the relative number of virus- infected Vero cells in cultures. The drug DAI had a sufficient activity for its effective use in the automated version of MFA based on the FC method. The use of FC is possible at various stages of anti-rabies drug production and control, and is also promising in terms of further improving of the rabies diagnosis.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 18—25

Key words: rabies virus, flow cytometry, Vero cell culture

## **ВВЕДЕНИЕ**

Вирус бешенства, относящийся к семейству Rhabdoviridae и роду Lyssavirus, вызывает у человека и животных опасное инфекционное заболевание, наносящее ущерб экономике и здравоохранению. На территории Российской Федерации с 1 января 2015 г. действует межгосударственный стандарт диагностики бешенства, согласно которому выделение вируса осуществляют в культуре клеток мышинной нейробластомы. Детекцию вируса бешенства в инфицированных клетках (ИК) проводят методом флуоресцирующих антител (МФА), и результат учитывают с помощью люминесцентной микроскопии. Указанная схема лабораторной диагностики бешенства представляет собой альтернативу биопробе на белых мышах [2]. Люминесцентную микроскопию широко используют также для определения активности вируса и антирабических сывороток в тестах *in vitro*, подразумевающих использование клеточных культур и рекомендуемых Всемирной Организацией Здравоохранения и Всемирной Организацией по охране здоровья животных [14, 15].

Однако классический вариант постановки МФА с использованием люминесцентной микроскопии характеризуется длительностью, трудоёмкостью и субъективностью. Он не способен точно определять относительное число

инфицированных вирусами клеток, в отличие от автоматизированного варианта количественной оценки реакции иммунофлуоресценции на основе технологии импульсной проточной цитометрии (ПЦ) [10, 14]. Применение ПЦ в микробиологии — это путь к дальнейшему совершенствованию диагностики инфекционных болезней [4, 6], и в зарубежной печати имеются сообщения о детекции с помощью ПЦ вируса бешенства в культурах клеток мышинной нейробластомы (MNA), почки сирийского хомяка (ВНК-21) и глиомы крыс (С6) [7, 14]. Клетки почечного эпителия зелёной мартышки (Vero) нашли применение для обнаружения методом ПЦ опасных для людей вирусов Эбола [8], Денге [12] и Зика [9], но не для детекции в них вируса бешенства.

Тем не менее, перевиваемую клеточную линию Vero успешно используют для культивирования вируса бешенства в России [3], где ПЦ для обнаружения вирусов в инфицированных клеточных культурах еще не применялась. На сегодняшний день отсутствует также информация о возможности использования выпускаемых в России препаратов диагностических антирабических флуоресцирующих антител в автоматизированном варианте постановки МФА на базе ПЦ анализа.

Целью настоящей работы явилось экспериментальное обоснование возможности определения в культуре доли инфицированных вирусом бешенства клеток линии Vero с использованием ПЦ и выпускаемого в России диагностического флуоресцирующего антирабического иммуноглобулина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали клеточную линию Vero, полученную из коллекции ООО «Биолот» (Санкт-Петербург), а также аттенуированный штамм вируса бешенства «Москва 3253», полученный из коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского применения (Москва). Клетки Vero культивировали на среде Игла MEM с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», Россия). Инфекционный титр вируса для клеточной линии Vero предварительно определяли на 96-луночных планшетах. В каждую лунку с серийными четырехкратными разведениями вирусосодержащей суспензии добавляли по 100 мкл среды, содержащей  $1,2 - 2,0 \times 10^4$  клеток Vero. Клетки инкубировали с вирусом в течение 48 ч при  $37^\circ\text{C}$  в 5%  $\text{CO}_2$ , затем фиксировали ацетоном и окрашивали меченным ФИТЦ диагностическим антирабическим иммуноглобулином (ВНИИЗЖ, г. Владимир). По результатам учёта фокусов флуоресценции с помощью люминесцентного микроскопа «Микромед И-ЛЮМ» определяли инфицирующую дозу (ИД<sub>50</sub>) [1].

Для цитофлуориметрического анализа клетки Vero, предварительно выращенные в культуральных флаконах с площадью ростовой поверхности 25 см<sup>2</sup> до состояния конфлюэнтного монослоя, открепляли от поверхности флакона и ресуспендировали в 5 мл питательной среды, к которой добавляли вирус в исходной дозе  $0,3 \pm 0,11 \lg$  ИД<sub>50</sub> на клетку. Далее исследовали динамику репродукции вируса бешенства в условиях *in vitro* путем сбора клеток через 24, 48 и 72 ч культивирования. В качестве контроля использовали интактную клеточную культуру. В следующем эксперименте к клеткам добавляли десятикратные разведения исследуемой вирусосодержащей жидкости в пределах от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ . Накопление вируса в клетках оценивали через 48 ч после инфицирования клеточной культуры.

Фиксацию и пермебиализацию клеток проводили с помощью набора Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, USA) по методу, разработанному Vengate-

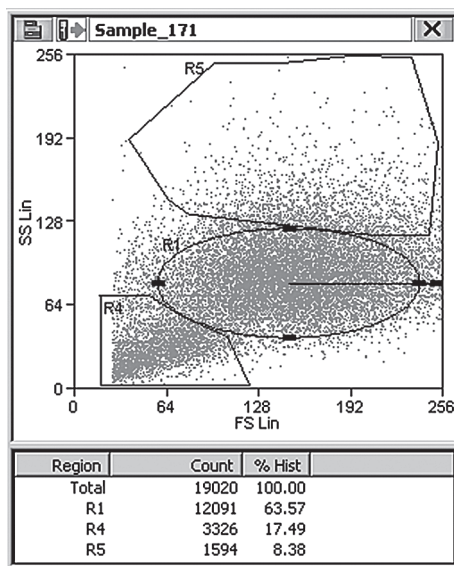
san D. et al. [14] для детекции вируса бешенства с помощью ПЦ в ИК мышинной нейробластомы. Иммунофлуоресцентное окрашивание антигена в клеточной цитоплазме осуществляли конъюгированным с ФИТЦ диагностическим антирабическим иммуноглобулином. Для исследований методом ПЦ использовали рабочее разведение указанного диагностического препарата, аналогичное используемому разведению в экспериментах с применением люминесцентной микроскопии и соответствующее рекомендациям производителя.

Образцы анализировали со скоростью около 500 клеток в секунду на ПЦ CyAn ADP DakoCytomation с аргоновым лазером мощностью 20 mW при длине волны эмиссии 488 нм. При создании протокола анализа с использованием программного обеспечения Summit 4.3 Built 2445 настройки устанавливали таким образом, чтобы на цитограммах по параметрам интенсивности прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния неповреждённые живые клетки Vero отличались от клеточного дебриса и погибших клеток с характерными изменениями клеточного размера и внутриклеточной структуры [5]. Область интенсивности флуоресценции, соответствующую ИК, идентифицировали в окне Dot Plot SS/FITC FL [14] путём повышения высоковольтного напряжения на фотодетекторе до величины 340 В. Значения интенсивности флуоресценции в данной области составили более 10 условных единиц (каналов). Долю ИК определяли как процентное отношение числа клеток, зарегистрированных в этой области, к общему числу исследованных клеточных элементов. Более того, из частотных распределений отдельных клеток по интенсивности их специфической иммунофлуоресценции оценивали в области, соответствующей ИК, среднюю внутриклеточную вирусную нагрузку (Mean) в используемых условных единицах измерения и определяли коэффициент вариации (CV, в %), отражающий степень неоднородности фракции ИК по данному параметру [7, 10].

Статистический анализ результатов проводили общепринятыми методами [1].

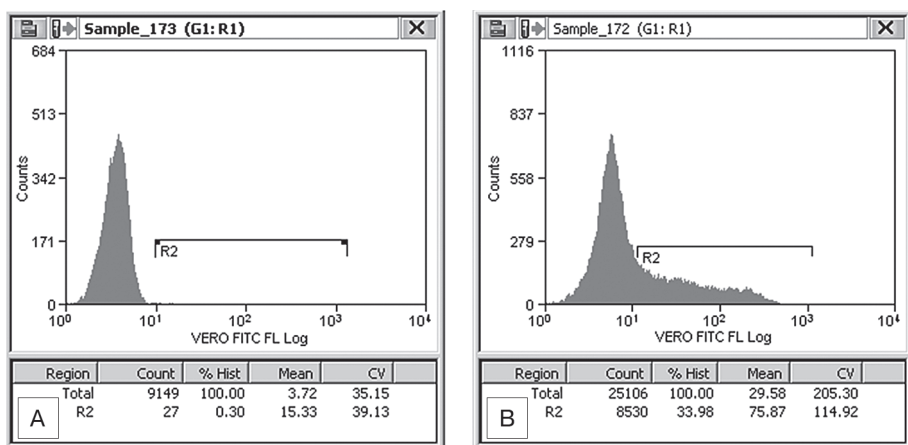
## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 в виде цитограммы представлено характерное распределение отдельных клеток Vero по объёму (прямое светорассеяние, Forward Scatter (FS) и по степени внутриклеточной гранулярности (боковое светорассеяние, Side Scatter (SS)) в инфицированной вирусом культуре. Результат анализа получен через 72 ч инкубации, когда инфицированные культуры были максимально неоднородны по исследуемым клеточным показателям. На цитограмме выделены три характерные



**Рис. 1.** Пример Dot Plot FS/SS цитограммы, иллюстрирующей распределение отдельных клеток линии Vero по объёму (FS) и степени внутриклеточной гранулярности (SS) через 72 ч после инфицирования культуры фиксированным вирусом бешенства.

R1 — область, в которой локализуется по параметрам светорассеяния около 90% клеток в контроле; R4 — погибшие и повреждённые клетки; R5 — клетки с повышенной степенью внутриклеточной гранулярности. Под цитограммой доля клеток в каждом из регионов указана в % по отношению к общему числу (Total) исследованных клеток.



**Рис. 2.** Дифференцирование инфицированных и неинфицированных клеток линии Vero по интенсивности иммунофлуоресценции.

По оси абсцисс — интенсивность иммунофлуоресценции клеток Vero, окрашенных флуоресцирующим диагностическим антирабическим иммуноглобулином, в усл. кол. ед. (каналах цитометра) от 0 до  $10^4$ ; по оси ординат — количество зарегистрированных клеток на единицу измерения. R2 — область интенсивности специфической иммунофлуоресценции, соответствующая инфицированным клеткам. Представленные гистограммы соответствуют исходному контролю (A) и инфицированной культуре через 24 ч культивирования (B). Под каждой гистограммой доля клеток в области R2 в % вместе со значениями показателей Mean и CV.

области: эллипсоидная область R1, соответствующая нормальным клеткам с исходными морфологическими параметрами; область регистрации погибших клеток с признаками апоптоза и некроза (R4); область, где по значению параметра SS учитывались клетки с повышенной степенью внутриклеточной гранулярности (R5). Статистический анализ цитограмм показал, что к 72 ч развития инфекции в условиях *in vitro* штамм фиксированного вируса бешенства повреждал не более 20% клеток Vero ( $18,6 \pm 0,6\%$ , при значении показателя в контроле  $2,9 \pm 0,3\%$ ,  $P < 0,001$ , при  $n=3$ ). Еще слабее повреждающий эффект вируса в культурах клеток линии Vero был через 48 ч ( $7,8 \pm 1,2\%$ ,  $P < 0,05$ ) и отсутствовал на ранней стадии инфицирования, поскольку к 24 ч достоверных различий с контролем по числу погибших клеток не было зарегистрировано. Число клеток с повышенной степенью гранулярности в инфицированных вирусом культурах увеличивалось к 72 ч инкубации до  $10,3 \pm 1,1\%$  относительно исходного показателя  $3,7 \pm 0,9\%$  ( $P < 0,05$ ) в контроле.

Иммунофлуоресцентный анализ больших статистических выборок отдельных клеток Vero в инфицированных вирусом культурах проводили в условиях автоматического гейтирования гистограмм по области R1 (G1:R1). То есть, детекцию вируса бешенства мы проводили только в живых, ещё неповреждённых клетках линии Vero, попадающих по параметрам светорассеяния в эллипсоидную область R1. Гистограмма, представленная на рис. 2 B, иллюстрирует факт присутствия в культуре как инфицированных клеток в количестве 33,98% (в области R2), так и не инфицированных вирусом бешенства клеточных элементов. При исследовании контрольных проб, не содержащих инфицированные вирусом клетки Vero, характерный пик ИК в области R2 отсутствовал (рис. 2 A).

Для всех контрольных образцов в наших исследованиях был характерен стабильно очень низкий уровень подсчёта фоновых сигналов флуоресценции в области R2 не более 2% ( $1,1 \pm 0,45\%$ , при  $n=10$ ). Аналогичные значения дан-

ного показателя ( $0,9 \pm 0,27\%$ ,  $P > 0,05$ ) имели место при анализе чистых проб с физиологическим раствором или деионизованной водой, когда из проточной системы прибора потоком жидкости в небольшом количестве смывались ранее адсорбированные в ней окрашенные клетки.

Через 24, 48 и 72 ч в инфицированных культурах регистрировали выраженные достоверные различия по относительному содержанию ИК: соответственно  $29,5 \pm 1,7\%$ ,  $70,4 \pm 2,0\%$  и  $88,3 \pm 1,3\%$  ( $P < 0,001$ ,  $n=3$ ). Хотя к 24 ч инкубации доля ИК была минимальна, именно в этот срок мы регистрировали самую высокую среднюю (Mean) вирусную нагрузку на ИК ( $73,5 \pm 1,3$  усл. ед. интенсивности специфической иммунофлуоресценции), а также максимальные значения коэффициента вариации (CV) по данному параметру, равные  $115,6 \pm 0,8\%$ . Для двухсуточных культур данные показатели были в 1,5 раза ниже — соответственно  $51,4 \pm 1,6$  усл. ед. и  $72,3 \pm 0,5\%$  ( $P < 0,001$ ). К 72 ч снова отмечали увеличение вирусной нагрузки на ИК до  $66,2 \pm 0,8$  усл. ед., а также значений CV до  $86,1 \pm 1,4\%$  ( $P < 0,05$ ). Факт присутствия специфического антигена в ИК подтверждали результаты люминесцентной микроскопии через 24, 48 и 72 ч (данные не представлены). Однако традиционный вариант МФА не позволял определять процентное содержание ИК в популяции. С его помощью проведение количественного мониторинга указанного показателя в процессе культивирования не представляется возможным.

Детекцию вируса бешенства в клетках линии Vero ПЦ анализ обеспечивал в наших исследованиях при 1000-кратном снижении исходной инфицирующей дозы. Доля ИК была в этом случае  $6,9 \pm 0,21\%$  ( $P < 0,001$  при  $n=3$ ). При повышенных исходных вирусных нагрузках 1/100 и 1/10 относительное количество ИК в двухсуточных культурах увеличивалось соответственно до  $38,5 \pm 1,5$  и  $67,2 \pm 0,8\%$ . При дальнейших десятикратных снижениях исходной инфицирующей дозы метод ПЦ уже не выявлял вирус бешенства в клетках линии Vero через 48 ч инкубации. Чувствительность классического варианта постановки МФА также позволяла детектировать вирус в клетках Vero при 1000-кратном снижении исходной инфицирующей дозы. Однако в полях зрения люминесцентного микроскопа можно было наблюдать в этом случае только единичные специфически флуоресцирующие клетки.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Автоматизация и стандартизация МФА на базе ПЦ технологии [13] позволяет повысить эффективность диагностики инфекционных болезней человека и животных [4,6], что уже убедительно доказано в зарубежных исследованиях на примерах детекции различных вирусов, в том числе и вируса бешенства [7,10, 12, 14]. В настоящей работе впервые на модели клеток линии Vero и штамма фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» в России получены результаты, подтверждающие высокую эффективность использования ПЦ как инструмента для мониторинга изменений относительного количества инфицированных вирусами клеток в клеточных культурах, а также установлен характер этих изменений в зависимости от исходной вирусной нагрузки и срока инкубации.

Накопление вируса бешенства при его культивировании *in vitro* зависит от выбора клеточной культуры [11]. С помощью ПЦ установлены различия при исследовании репродукции вируса в культурах клеток MNA и ВНК-21. Инфицирование вирусом бешенства более 70% клеток ВНК-21 имело место только после 72 ч [7], в то время как в культурах MNA доля ИК резко увели-

чивалась до 75% уже к 48 ч инкубации [14]. Результаты наших исследований свидетельствуют, что в клетках линии Vero вирус бешенства размножается также быстро, как и в клетках МНА. Поэтому с точки зрения чувствительности детекции вируса в клеточных культурах и, как следствие, диагностики бешенства использование клеток Vero представляется не менее эффективным, чем клеток мышинои нейробластомы.

Наиболее интенсивное образование новых вирусных частиц в ИК линии Vero регистрировали с помощью ПЦ через 24 ч, при этом изменения значений показателей Mean и CV носили циклический характер. Увеличение числа повреждённых и структурно изменённых клеток с аномальными морфологическими характеристиками к 72 ч инкубации указывает, вероятно, на усиление в этот срок процесса выхода вируса во внеклеточное пространство. Атенуированный вирус бешенства оказывал на клетки Vero слабый цитопатический эффект, что согласуется с литературными данными [14, 15].

На наш взгляд, определение методом ПЦ относительного содержания клеток, инфицированных вирусом бешенства, позволит повысить точность и эффективность анализов при определении активности вируса и уровня нейтрализующих антирабических антител в сыворотках крови людей и животных, что откроет новые возможности в совершенствовании диагностики бешенства. Препарат диагностического антирабического флуоресцирующего иммуноглобулина, созданный в России для классического варианта МФА с использованием люминесцентной микроскопии, обладает по нашим данным достаточной активностью для его эффективного применения в автоматическом (импульсном) режиме количественного измерения интенсивности клеточной иммунофлуоресценции. Получение точной информации об особенностях культивирования вируса, основанной на результатах количества ИК в культуре, в дальнейшем позволит использовать ПЦ на этапах производства и контроля разрабатываемых и выпускаемых в России антирабических препаратов [3].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Воробьёв А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., 1962.
2. ГОСТ 26075-2013 Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства. М., Стандартинформ, 2014.
3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Свищов Р.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Культуральный антиген в технологии получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 4 (114): 65-68.
4. Кравцов А.Л. Совершенствование диагностики инфекционных болезней, связанное с использованием технологии импульсной проточной цитометрии. Биотехнология. 2013, 3: 8-23.
5. Сибиряк С.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях. В: Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск, 2008.
6. Alvarez-Barrientos A., Arroyo J., Canon A.R. et al. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 2000, 13 (2): 167-195.
7. Bordignon J., Ferreira S., Caporale G. et al. Flow cytometry assay for intracellular rabies virus detection. J. Virol. Methods. 2002, 105 (1): 181-186.
8. Halfmann P., Kim J. H., Eblhara H. et al. Generation of biologically contained Ebola viruses. PNAS. 2008, 105 (4): 1129-1133.
9. Hanners N.W., Eitson J.L., Usui N. Western Zika virus in human fetal neural progenitors persists long term with partial cytopathic and limited immunogenic effects. Cell Reports. 2016, 15 (11): 2315-2374.



10. McSharry J.J. Detection and quantitation of human immunodeficiency virus-infected peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28: 724-733.
11. Rudd R. J., Trimarchi C.V. Comparison of sensitivity of BHK21 cells and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25: 1456-1458.
12. Sydow F., Santiago M.A., Neves-Souza P.C. et al. Comparison of Dengue infection in human mononuclear leukocytes with mosquito C6/36 and mammalian Vero cells using flow cytometry to detect virus antigen. *Memento Instituto Oswaldo Cruz.* 2000, 5:483-489.
13. Steen H.B., Boye E., Starsted K. et al. Applications of flow cytometry on bacteria: Cell cycle kinetics, drug effects and antibody binding. *Cytometry*, 1982, 2 (4): 249-256.
14. Vengatesan D., Raj G.D., Raja A. et al. Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry. *Cytometry*. 2006, 70B (5): 335-343.
15. Woldehewet Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. *Clin. Chem. Acta.* 2005, 351: 49-63.

*Поступила 31.10.17*

Контактная информация: Кравцов Александр Леонидович, д.б.н.,  
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)26-21-31

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*А.М.Кудряшова<sup>1</sup>, А.Г.Галстян<sup>1</sup>, Е.Б.Файзулов<sup>1</sup>,  
А.Ю.Оленин<sup>2</sup>, Г.В.Лисичкин<sup>2</sup>, В.В.Зверев<sup>1</sup>, О.В.Борисова<sup>1</sup>*

## **ВЫЯВЛЕНИЕ АДЕНОВИРУСНОГО АНТИГЕНА МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ГКР-ДЕТЕКЦИЕЙ СИГНАЛА**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; <sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

*Цель.* Изучение возможности выявления антигена аденовируса с детекцией спектров гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) окисленной формы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ<sup>+</sup>) как продукта иммуноферментной реакции. *Материалы и методы.* В работе использовали клинические фекальные образцы, содержащие аденовирусы, ротавирусы группы А, норовирусы и образцы здоровых детей, а также лабораторные штаммы аденовирусов с титром 5 — 6 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Иммуноферментный анализ проводился в сэндвич-формате, при проведении ГКР-детекции после стадии окисления ТМБ в реакционную смесь вносили наночастицы серебра и проводили измерение спектров на рамановском анализаторе при длине волны лазера 532 нм. *Результаты.* Была получена сходимость результатов при определении аденовируса в сравнении с иммуноферментным методом с фотометрической детекцией и ПЦР. *Заключение.* Показана возможность использования ТМБ<sup>+</sup> в качестве ГКР-репортера и серебряных наночастиц в качестве ГКР-субстрата для выявления антигена аденовируса в сложных биологических образцах.

*Журн. микробиол., 2018, №. 3, С. 25—31*

**Ключевые слова:** аденовирус, твердофазный ИФА, гигантское комбинационное рассеяние, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, наночастицы серебра

*А.М.Кудряшова<sup>1</sup>, А.Г.Галстян<sup>1</sup>, Е.Б.Файзулов<sup>1</sup>,  
А.Ю.Оленин<sup>2</sup>, Г.В.Лисичкин<sup>2</sup>, В.В.Зверев<sup>1</sup>, О.В.Борисова<sup>1</sup>*

## **DETECTION OF ADENOVIRUS ANTIGEN BY A SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY**

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; <sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Russia

*Aim.* Study of the possibility of adenovirus antigen detection by recording of surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra of enzyme oxidized product of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *Materials and methods.* Clinical fecal samples containing adenoviruses, group A rotaviruses, noroviruses and healthy children samples, as well as laboratory strains of adenoviruses with a titer of 5 — 6 lg TCD<sub>50</sub>/ml were used. Sandwich immunoassay was used, the Raman spectra were recorded by a Raman spectrometer (532 nm) after incubation with silver nanoparticles. *Results.* The concordance of the adenovirus detection results was obtained in comparison with the enzyme immunoassay method with colorimetric detection and PCR. *Conclusion.* The possibility of TMB<sup>+</sup> using as a SERS reporter and silver nanoparticles as a SERS substrate for the detection of adenovirus antigen in complex biological samples was shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 25—31

Key words: adenovirus, enzyme-linked immunosorbent assay, surface-enhanced Raman scattering, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, silver nanoparticles

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка чувствительных и селективных методов выявления патогенных вирусов является важной задачей здравоохранения и вопросом национальной безопасности. Описан ряд подходов, основанных на ГКР-детекции результатов иммунохимического анализа, которые пригодны для выявления биомаркеров в клинических образцах, имеющих сложный состав.

Особый интерес представляет проведение анализа в планшетах из полистирола и использовании ГКР-детекции окисленной формы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ<sup>+</sup>). Такой подход описан в работах для детекции респираторно-синцитиального вируса [4] и изоформы тропонина Т [5] с использованием в качестве ГКР-субстрата серебряных и золотых наночастиц соответственно. Метод является универсальным и позволяет использовать материальное и приборное оснащение, а также реагентную базу твердофазного иммуноферментного анализа.

В связи с этим, основная задача данного исследования состояла в изучении возможности выявления аденовирусного антигена в фекальных образцах методом, сочетающим иммуноферментный анализ и ГКР-детекцию сигнала.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Fluka), пероксидазный конъюгат моноклональных антител к гексону аденовируса с протексидазой (ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов», антитела мышинные моноклональные к аденовирусу-МАТ (ООО «Биолекса»). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Milli-Q System, Millipore, США). Для проведения ИФА использовались прозрачные 96 луночные планшеты (Costar).

Панель клинических образцов (n=40) от детей в возрасте до 5 лет, госпитализированных в стационар с острой кишечной инфекцией, и здоровых детей. Образцы были охарактеризованы методом мультиплексной ОТ и ПЦР-РВ на наличие нуклеиновых кислот 8 групп кишечных вирусов человека: аденовирусов, ротавирусов группы А, энтеровирусов, норовирусов, астровирусов, саповирусов, орторевовирусов, ротавирусов группы С [1]. В состав панели включены образцы 1 — 10, содержащие ДНК аденовирусов со средним значением пороговых циклов (ПЦ) равном 22,5±4,9; образцы 11 — 20 — РНК ротавирусов группы А (ПЦ=16,7±3,8); образцы 21 — 30 — РНК норовирусов

(ПЦ=21,3±3,2); образцы 31 — 40, образцы, в которых нуклеиновых кислот кишечных вирусов не выявлено.

Для получения культуральных образцов аденовирусов культуру клеток HeLa заражали лабораторными штаммами аденовирусов человека 3 и 7 типа, после проявления выраженного цитопатогенного действия вирусный материал трижды замораживали-оттаивали в культуральном флаконе и осветляли низкоскоростным центрифугированием. В качестве контрольных образцов в ИФА использовали лабораторные штаммы аденовирусов с титром 5 — 6 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Результаты ИФА регистрировали на планшетном фотометре BioRad Model 680. Инкубацию планшет проводили на шейкере (ELMI SkyLine). Для отмывки планшет использовали вошер (BioRad PW 40). Взвешивание реактивов производилось на весах (OHAUS Discovery). Для контроля и коррекции pH использовали pH-метр (Mettler Toledo MP220). Центрифугирование производили на центрифуге (Thermo Scientific MicroCL 17 centrifuge). Учет результатов ГКР-анализа проводили на спектрометре (ИнСпектр MIXSplitter, ООО «ИнСпектр», Черногловка).

Для получения 10% фекальных экстрактов образцы собирали в стерильные пробирки в количестве 1 грамм. Далее вносили 10,0 мл в 0,02 М фосфатного буферного раствора pH 7,2 (ФБР), содержащего 0,2% БСА, 0,05% Твин-20, перемешивали. Полученную взвесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин. Для выявления антигена аденовируса использовали надосадочную жидкость.

Синтез наночастиц серебра в водной среде проводили методом восстановления нитрата серебра борогидридом натрия в присутствии стабилизатора для получения дисперсии наночастиц с содержанием серебра 100 мг/л (0,9 мМ). К 100 мл раствора стабилизатора цитрата натрия в дистиллированной воде по каплям при перемешивании прибавляли 50 мл раствора, содержащего 0,61 г (3,6 ммоль) нитрата серебра. Через 15 минут к смеси по каплям при интенсивном помешивании добавляли 50 мл водного раствора, содержащего двукратный избыток борогидрида натрия. Изучение распределения по размерам наночастиц серебра в водных дисперсиях осуществляли на анализаторе ZetasizerNano ZS с интегрированным He-Ne лазером с мощностью 4мВ и длиной волны 633 нм («MalvernInstruments» ltd., Великобритания). Измерение ζ-потенциала проводили путем наложения электрического поля на кювету с дисперсией наночастиц серебра с использованием методики, основанной на лазерной доплеровской анемометрии.

При проведении иммуноферментного анализа в лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл моноклональных антител в концентрации 10 мкг/мл в ФБР. Планшеты выдерживали в течение 19 — 22 часов при температуре 4 — 8°C и на 1 час вносили блокирующий раствор ФБР, содержащий 5% сахаразы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Твин-20. Для проведения исследования в лунки планшета вносили по 100 мкл исследуемых образцов. После инкубирования в течение 45 минут и режиме встряхивания при 500 оборотов/мин проводили отмывку. Далее вносили по 100 мкл конъюгированных с пероксидазой антител мыши к аденовирусу в разведении 1:500. Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл 33мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5мМ 3,3',5,5'- тетраметилбензидина. Через 15 минут измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 490 нм. Для измерения ГКР-спектра полученную реакционную смесь в полном объеме переносили в чистый планшет для остановки ферментативной реакции.

Далее вносили наночастицы серебра в концентрации 72 мкМ и инкубировали в течение 10 мин. Измерение проводили с использованием лазера с длиной волны излучения 532 нм и мощностью 30 мВт, время экспозиции составляло 2000 мс.

На основании исследования выборки отрицательных образцов было рассчитано пороговое значение для отсеечения образцов содержащих антиген аденовируса от отрицательных, определяемое по формулам: для фотометрической детекции:  $ОП_{\text{порог}} = ОП_{\text{ср.К}} + 3\sigma$ ; для ГКР-детекции:  $И_{\text{порог}} = И_{\text{ср.К}} - 3\sigma$ , где  $ОП_{\text{ср.К}}$  и  $И_{\text{ср.К}}$  - среднее арифметическое значение регистрируемых сигналов для отрицательных образцов,  $\sigma$  — стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявления маркеров аденовирусной инфекции в образцах лабораторных штаммов аденовирусов и клинических образцах основывалось на твердофазном иммуноферментном анализе «сэндвич типа», включающем иммобилизацию антител для иммунного захвата на твердой фазе, инкубацию с исследуемым образцом и детектирующими антителами, меченными пероксидазой. Результаты ферментативной реакции пероксидазы с перекисью водорода в присутствии 3,3',5,5'-тетраметилбензидина оценивались фотометрически или путем измерения ГКР-спектров после добавления наночастиц серебра. В работе использовались наночастицы со средним размером 7,5 нм и  $\zeta$ -потенциалом  $-31 \pm 1$  мВ.

На рис. 1. представлены результаты ГКР-анализа продуктов ферментативной реакции, показывающие, что введение в систему наночастиц серебра существенным образом увеличивает интенсивность комбинационного рассеяния в областях  $900 - 100$ ,  $1500 - 1600$   $\text{см}^{-1}$ , кроме того в области  $1300 - 1400$   $\text{см}^{-1}$  возникает интенсивный сигнал, отсутствующий в исходном спектре. Линии при  $1177$   $\text{см}^{-1}$ ,  $1337$   $\text{см}^{-1}$ ,  $1600$   $\text{см}^{-1}$  обусловлены связями группы  $\text{СН}_3$ , связями  $\text{С}-\text{С}$  внутри бензольного кольца и совокупностью связей  $\text{С}-\text{Н}$  соответственно [3]. Для оценки результатов детекции использовалась интенсивность пика при  $1600$   $\text{см}^{-1}$ .

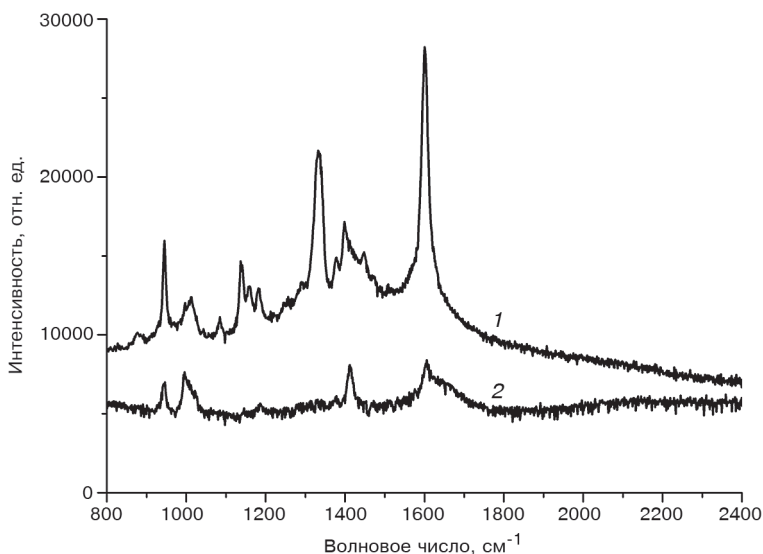
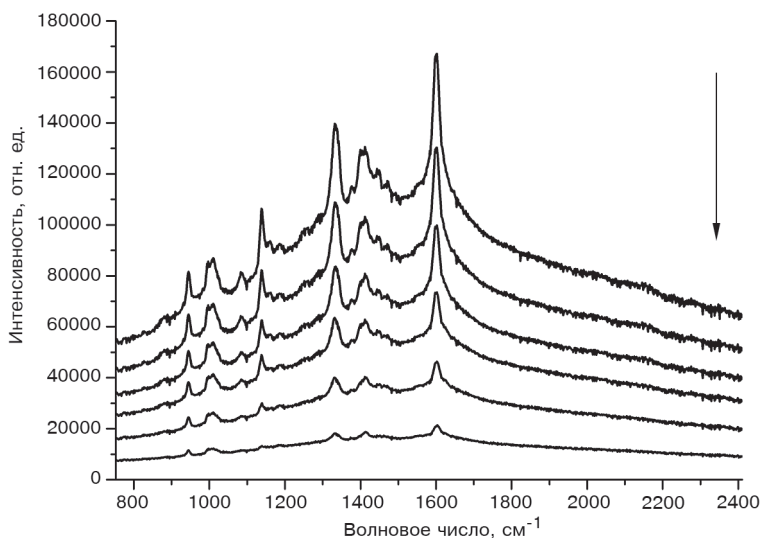


Рис. 1. ГКР-спектр ТМБ<sup>+</sup> с концентрацией наночастиц серебра 72 мМ (1), спектр комбинационного рассеяния ТМБ<sup>+</sup> (2).



**Рис. 2.** ГКР-спектры ТМБ+, полученные при последовательном двукратном разведении аденовируса 3 типа (исходный титр  $5 \lg$  ТЦД<sub>50</sub>/мл).

Направление стрелки указывает на увеличение содержания антигена аденовируса. Для наглядности спектры смещены по оси ординат.

Концентрация наночастиц серебра 72 мкМ была выбрана как оптимальная, так как снижение концентрации приводило к уменьшению сигнала, а увеличение — к снижению воспроизводимости. Наночастицы серебра сохраняли стабильность по крайней мере в течение 4 месяцев.

Разработку методики проводили на культуральных образцах, содержащих аденовирус. На рис. 2 изображена зависимость интенсивности ГКР-спектров от концентрации исследуемого антигена. По результатам была получена обратная зависимость, и уменьшение концентрации аденовируса приводило к увеличению интенсивности ГКР-сигнала. В диапазоне рабочих разведений 1:1 — 1:64 образца, содержащего аденовирус, была получена полиномиальная зависимость интенсивности сигнала от количества аналита с коэффициентом детерминации 0,997. Коэффициент вариации (КВ, %) находился в пределах 10 — 12% при ГКР-детекции и 7 — 8% для фотометрического метода.

В табл. представлены данные по определению антигена аденовируса в фекальных экстрактах. Для дифференциальной диагностики на основании исследования образцов, не содержащих аденовирус (№ 31 — 40), было установлено пороговое значение интенсивности сигнала с учетом обратной зависимости. Также было проведено исследование специфичности на образцах, содержащих другие вирусные антигены.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Была показана сходимость результатов при определении аденовируса тремя методами (табл.): твердофазным ИФА с классической фотометрической детекцией, ГКР-детекцией сигнала и методом ПЦР на панели клинических образцов, содержащих аденовирус, ротавирус и норовирус, а также на образцах здоровых детей.

Следует отметить, что возможность использования ГКР-спектров окисленной формы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина обсуждается в ряде работ. Описанные разными авторами данные с использованием наночастиц серебра весьма противоречивы, получены для разного состава анализируемых образ-

## Результаты выявления аденовируса в фекальных образцах разными методами

№ образца/метод	ПЦР	ИФА	ГКР	№ образца/метод	ПЦР	ИФА	ГКР
1	+	+	+	11	—	—	—
2	+	+	+	12	—	—	—
3	+	+	+	13	—	—	—
4	+	+	+	14	—	—	—
5	+	+	+	15	—	—	—
6	+	+	+	16	—	—	—
7	+	+	+	17	—	—	—
8	+	+	+	18	—	—	—
9	+	+	+	19	—	—	—
10	+	+	+	20	—	—	—
21	—	—	—	31	—	—	—
22	—	—	—	32	—	—	—
23	—	—	—	33	—	—	—
24	—	—	—	34	—	—	—
25	—	—	—	35	—	—	—
26	—	—	—	36	—	—	—
27	—	—	—	37	—	—	—
28	—	—	—	38	—	—	—
29	—	—	—	39	—	—	—
30	—	—	—	40	—	—	—

Примечание. № 11 — 20 — образцы, содержащие ротавирус, № 21 — 30 — образцы, содержащие норовирус, № 31 — 40 образцы, не содержащие кишечных вирусов.

цов и вызывают много вопросов. Полученные нами результаты также отличаются от приведенных в работах [3, 4]. Так, в работе [3] авторы пытаются доказать пероксидазо-подобные свойства наночастиц серебра и их способность разлагать перекись водорода и соответственно ставят под сомнение использование наночастиц серебра в качестве ГКР-субстрата в присутствии перекиси водорода. Авторы [4], напротив, демонстрируют результаты, указывающие на успешное использование ГКР-спектров окисленной формы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в присутствии наночастиц серебра для детекции респираторно-синцитиального вируса. Однако отличием является ход зависимости интенсивности ГКР-сигнала от концентрации определяемого аналита. Так, на рис. 2 мы представили данные, показывающие обратную зависимость интенсивности ГКР-сигнала от концентрации определяемого аналита, тогда как в работе [4] эта зависимость является прямой.

Для разрешения этих противоречий нами были проведены дополнительные исследования. Так, для изучения возможности использования наночастиц серебра в качестве ГКР-субстрата в присутствии перекиси водорода были получены ГКР-спектры малахитового зеленого в тех же условиях в отсутствии и присутствии перекиси водорода в концентрации, соответствующей субстратной буферной смеси. Отсутствие различия в интенсивности основных пиков при 1171, 1288, 1359 и 1614 см<sup>-1</sup> указывает на тот факт, что в условиях эксперимента перекись водорода не влияла на ГКР-свойства наночастиц серебра.

Далее необходимо отметить, что при изучении зависимости интенсивности ГКР-сигнала от концентрации определяемого аналита в широком диапазоне концентраций нами была получена колоколообразная зависимость: при низ-

ких концентрациях аналита наблюдался рост сигнала при увеличении концентрации аналита, затем зависимость меняла свой ход. Подобная картина делает затруднительным обоснование порогового значения интенсивности сигнала при исследовании образцов, содержащих и не содержащих аналит. При проведении экспериментов по выявлению аденовируса были подобраны условия, позволяющие определять аналит в широком диапазоне концентрации.

Колоколообразную зависимость можно объяснить, основываясь на тех фактах, что для получения интенсивного ГКР-сигнала необходима агрегация наночастиц. Такая агрегация наблюдается в присутствии солей [2], а также окисленной формы ТМБ [4]. Однако в соответствии с литературными и нашими данными усиление ГКР в присутствии солей зависит от их концентрации, и при превышении оптимальной концентрации наблюдается снижение сигнала, сопровождающее необратимое разрушение золя серебра. Мы предполагаем, что накопление окисленной формы ТМБ аналогичным образом влияет на агрегацию отрицательно заряженных наночастиц серебра и соответственно на интенсивность ГКР-сигнала.

Таким образом, на основании полученных данных показана возможность высокоспецифичного выявления аденовируса в сложных биологических образцах с использованием окисленной формы ТМБ и наночастиц серебра в качестве ГКР-репортера и ГКР-субстрата соответственно.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №16-15-10332.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Марова А.А., Оксанич А.С., Каира А.Н., Мескина Е.Р., Медведева Е.А., Иванова О.Е., Лукашев А.Н., Кюрегян К.К., Калинин М.А., Егорова О.В., Зверев В.В., Файзулоев Е.Б. Применение метода мультиплексной ПЦР-РВ для дифференциальной диагностики кишечных вирусных инфекций. Журн. микробиол. 2012, 6: 39-45.
2. Liang J., Liu H., Huang C. et al. Aggregated silver nanoparticles based surface-enhanced raman scattering enzyme-linked immunosorbent assay for ultrasensitive detection of protein biomarkers and small molecules. Anal. Chem. 2015, 87: 5790-5796.
3. McKeating K.S., Sloan-Dennison S., Graham D. et al. An investigation into the simultaneous enzymatic and SERRS properties of silver nanoparticles. Analyst. 2013, 138: 6347-6353.
4. Zhan L., Zhen S.J., Wan X.Y. et al. A sensitive surface-enhanced Raman scattering enzyme-catalyzed immunoassay of respiratory syncytial virus. Talanta. 2016, 148: 308-312.
5. Yu Z., Chen L., Wang Y. et al. A SERS-active enzymatic product used for the quantification of disease-related molecules. J. Raman Spectrosc. 2014, 45: 75-81.

*Поступила 20.12.17*

Контактная информация: Борисова Ольга Васильевна, к.х.н.,  
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)674-54-97

*Т.Г.Самарцева, А.С.Оксанич, Н.Ф.Гаврилова,  
И.В.Яковлева, В.В.Свиридов, В.В.Зверев*

## **ПРИМЕНЕНИЕ УНИВЕРСАЛЬНЫХ ПЛАЗМИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ ЗАДАННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ**

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

*Цель.* Разработка методических подходов для изменения антигенной специфичности химерных антител путем замены генов переменных областей в полученных ранее универсальных плазмидных конструкциях pLK DT-17 и pHG DT-17, кодирующих антитело против дифтерийного токсина (ДТ) DT-17, на гены антитела, связывающегося с другим эпитопом ДТ — DT-22. *Материалы и методы.* Из гибридомы, продуцирующей моноклональные антитела к ДТ DT-22, методом обратной транскрипции и ПЦР были получены гены переменных областей легких и тяжелых цепей мышинового антитела к ДТ — DT-22. Генно-инженерными методами в рекомбинантных плаزمиде pLK DT-17 и pHG DT-17, кодирующих соответственно легкую и тяжелую цепи антитела DT-17, заменяли переменные области антител DT-17 на соответствующие области DT-22. После чего получали «супервектор» pSV DT-22, содержащий гены обеих цепей химерного антитела. С использованием культуральных методов «супервектором» была трансфицирована культура клеток CHO и получен высокопродуктивный клон, секретирующий химерные антитела к ДТ. Для оценки активности антител применяли иммунохимические и культуральные методы, а для получения препаративного количества антител — аффинную хроматографию. *Результаты.* Выход очищенных химерных антител DT-22, секретируемых клоном, составил 4 мг с 1 л культуральной среды. Минимальная концентрация химерных антител, при которой наблюдалась нейтрализация ДТ в культуре клеток CHO, составила 22 мкг/мл среды. *Заключение.* Таким образом, было показано, как из сконструированных ранее универсальных рекомбинантных плазмид pLK DT-17 и pHG DT-17, кодирующих соответственно легкую и тяжелую цепи антитела к ДТ DT-17, простыми генно-инженерными методами были получены векторы, кодирующие синтез легкой и тяжелой цепей химерного антитела DT-22, специфичного к другому эпитопу ДТ.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 32—39

Ключевые слова: иммуноглобулиновые гены, «супервектор», рекомбинантные антитела, дифтерийный токсин, токсиннейтрализующая активность, клонирование, трансфекция, культура клеток CHO

*T.G.Samartseva, A.S.Oksanich, N.F.Gavrilova,  
I.V.Yakovleva, V.V.Sviridov, V.V.Zverev*

## **USING OF UNIVERSAL PLASMID CONSTRUCTIONS FOR DESIGN OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH DEFINED SPECIFICITY IN EUKARYOTIC CELLS**

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* In this study we aimed to develop the methodology to change the antigen specificity of chimeric antibodies by replacing the variable region genes in the previously designed universal plasmid constructions pLK DT-17 and pHG DT-17 encoding the DT-17 antibody against the diphtheria toxin (DT) to the genes of antibody binding to another DT epitope — DT-22. *Materials and methods.* The genes of the light and heavy chain variable regions of mouse anti-DT antibodies — DT-22 were amplified from the hybridoma producing monoclonal antibodies to DT by reverse transcription and PCR methods. Genetic engineering methods were used to replace the variable regions of DT-17 antibody in the recombinant plasmids pLK DT-17 and pHG DT-17 encoding the light and heavy chains of DT-17 antibody, respectively to the relevant genes of DT-22. Subsequently, a «supervector» pSV DT-22, containing the genes of both chains of the chimeric



antibody, was designed. CHO cells were transfected with a «supervector» and a highly productive clone, secreting chimeric antibodies to DT was obtained. Immunochemical and cultural methods were used to evaluate antibody activity. The affinity chromatography was used to purified preparative amounts of antibodies. *Results.* The yield of purified secreted chimeric DT-22 antibodies was 4 mg from per liter of culture medium. The minimum concentration of chimeric antibodies at which DT was neutralized in the CHO cells was 22 µg/mL of medium. *Conclusion.* Thus it has been shown how to generate new vector coding synthesis of light and heavy chains of a chimeric DT-22 antibody specific to another DT epitope using previously constructed universal recombinant plasmids pLK DT-17 and pHG DT-17 encoding, light and heavy chains of antibodies against DT DT-17, respectively.

Zh.Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 32—39

Key words: immunoglobulin genes, «supervector», recombinant antibodies, diphtheria toxin, toxin neutralizing activity, cloning, transfection, CHO cells

## ВВЕДЕНИЕ

Для защиты от чужеродных патогенов иммунная система позвоночных постоянно вырабатывает молекулы иммуноглобулинов. Они представляют собой сложные белковые молекулы, которые способны идентифицировать и нейтрализовать антигены, такие как бактерии, вирусы, токсины, яды и др.

Чаще всего для получения антител используют донорскую кровь и кровь иммунизированных животных, но их применение ограничивают различные факторы. Для человеческих антисывороток существует дефицит сырьевой базы донорских сывороток, имеет место сложность стандартизации, а также риск заражения пациента редкими патогенами, например, малоизученными вирусами или прионами. Антисыворотки, полученные от животных, вызывают различные побочные эффекты в виде аллергических реакций вплоть до анафилактического шока или образование собственных антител к белкам сыворотки животного, что существенно снижает эффективность препаратов животного происхождения при длительной терапии [7].

В 1975 году Кёлер и Мильштейн разработали процедуру эффективного производства мышиных моноклональных антител желаемой антигенной специфичности, что положило начало развитию гибридомной технологии [6]. Полученные мышиные антитела не взаимодействовали должным образом с компонентами иммунной системы человека, и их использование было строго ограничено.

Достижения в области молекулярной биологии способствовали развитию генетической инженерии, целью которой было создание на основе генов иммуноглобулинов плазмидных конструкций, кодирующих рекомбинантные антитела с заданными свойствами. В зависимости от поставленной задачи стало возможным изменение размеров антител, их специфичности, аффинности, валентности. Открылись перспективы получения мини-антител, химерных и гуманизированных антител, которые широко используются в научных исследованиях и медицине [2].

В настоящее время для клинического применения зарегистрированы более 30 препаратов на основе рекомбинантных антител. Из них около 90% предназначены для лечения онкологических заболеваний, например, рака молочной железы, рака кишечника, В-клеточной лимфоцитарной лейкемии, Неходжкинской лимфомы, миелолейкоза и др. Также антитела используют в

трансплантологии, для лечения сердечно-сосудистых, аутоиммунных и, в редких случаях, инфекционных заболеваний [1].

В основе рекомбинантных антител, применяемых в терапии заболеваний человека, лежат генетические конструкции в виде плазмидных векторов, адаптированных для эукариотических систем экспрессии, которые чаще всего создаются под конкретное антитело каждый раз заново, что увеличивает стоимость разработки новых конструкций и повышает трудовые и временные затраты [5, 8]. Ранее были сконструированы и синтезированы последовательности генов легкой и тяжелой цепей химерного антитела, нейтрализующего дифтерийный токсин — DT-17, которые были клонированы в эукариотическом векторе pCI-neo («Promega», США) [3]. Нуклеотидные последовательности генов переменных областей были получены из мышинной гибридомы, секретирующей моноклональные антитела DT-17. Особенность сконструированных плазмидных векторов была в том, что каждый фрагмент гена: лидерная, переменная и константная области были фланкированы сайтами редкощепящих эндонуклеаз рестрикции. Таким образом, были созданы конструкции, которые потенциально позволяют заменять гены переменных и константных областей с целью получения антител другой специфичности, другого класса или видовой принадлежности. Ранее нами также была получена мышинная гибридома DT-22, продуцирующая антитела к другому эпитопу дифтерийного токсина (DT), чем DT-17 и также обладающая токсиннейтрализующей активностью.

Целью настоящей работы было получение плазмидных конструкций, кодирующих химерные моноклональные антитела к дифтерийному токсину (DT) DT-22, на основе полученных ранее универсальных векторов pLK DT-17 и pHG DT-17, кодирующих химерные антитела к DT DT-17, но связывающихся с другим эпитопом, путем замены в векторах генов переменных областей DT-17 на переменные области DT-22.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовалась гибридома DT-22, продуцирующая моноклональные антитела, которые обладают нейтрализующей активностью в отношении дифтерийного токсина.

Гибридомы-продуценты антител к дифтерийному токсину культивировали на среде RPMI 1640 с добавлением 10% сыворотки плода коровы и глутамина. После восстановления криоконсервированных гибридных клонов перед выделением из них мРНК их культивировали при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение нескольких суток. Морфологию клеток оценивали под инвертированным микроскопом, их антитело-образующую способность и активность антител в культуральной среде — в ИФА. При сохранности специфичных для каждого клона характеристик, клетки, взятые на стадии экспоненциального роста, осаждали центрифугированием; осадок клеток использовали для выделения суммарной РНК с использованием набора реагентов RNeasy Mini Kit («Qiagen», Германия).

Праймеры для амплификации участков генов, кодирующих переменные фрагменты тяжелой и легкой цепей мышинных IgG, подбирали, руководствуясь [4]. Олигонуклеотиды синтезировали в компании «Синтол» (Россия).

Получение кДНК в реакции обратной транскрипции (ОТ), амплификацию доменов переменных участков иммуноглобулинов мыши, а также встраивание их в плазмиду, секвенирование ампликонов и плазмиды для контроля

правильности полученной конструкции проводили в соответствии со стандартными методами генной инженерии.

Культуру клеток СНО культивировали на питательных средах RPMI («Панэко», Россия) или Opti-MEM («Invitrogen», США) с добавлением и без добавления фетальной бычьей сыворотки («Gibco», США) в количестве 2,5-5%. Для трансфекции клеток использовали реактив Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США) согласно рекомендациям производителя, а для аффинной очистки иммуноглобулинов — протеин-G сефарозу («Биалекса», Россия).

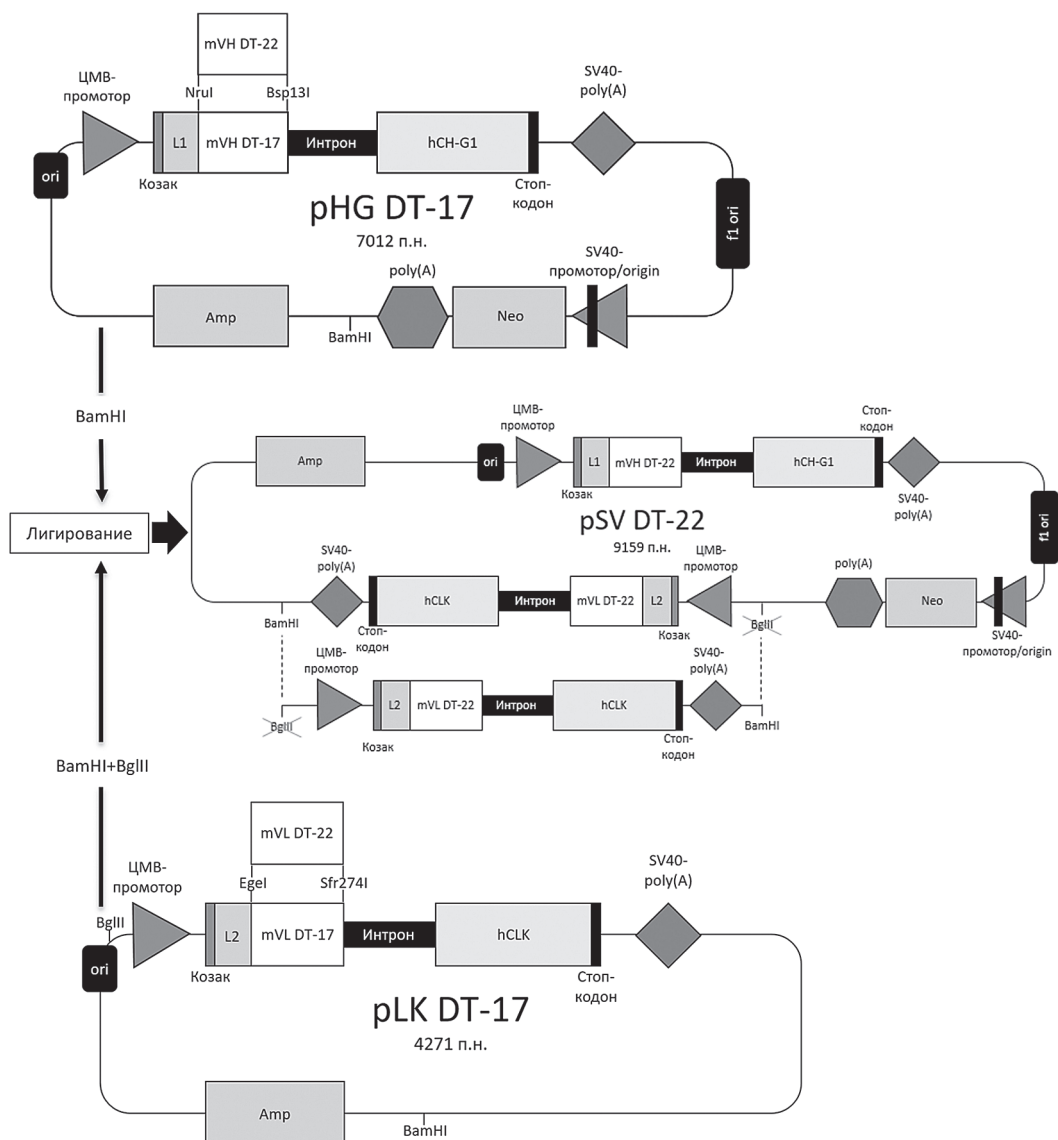
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из гибридомы DT-22, продуцирующей моноклональные антитела к дифтерийному токсину, выделяли суммарную РНК, в реакции ОТ получали кДНК с использованием олиготимидинового праймера T18. Для амплификации генов вариабельных областей легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина G мыши использовали универсальные праймеры, описанные в [4]. Полученные ПЦР-продукты секвенировали. На основе нуклеотидных последовательностей вариабельных генов легкой (L) и тяжелой (H)-цепей были подобраны праймеры, которые на 5'-концах содержали «довески», включающие в себя сайты рестрикции для клонирования в векторы pLK DT-17 и pHG DT-17, полученные ранее и содержащие гены химерного антитела к ДТ (DT-17), направленного к другому эпитопу токсина [3]. Полученные таким образом ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами NruI и Bsp13I («СибЭнзим», Россия) для клонирования вариабельной области тяжелой цепи антитела DT-22 в вектор pHG DT-17 и EgeI, Sfr274I («СибЭнзим», Россия) для клонирования вариабельной области легкой цепи каппа в вектор pLK DT-17 (рис. 1). Соответствующими рестриктазами также обрабатывали векторы, избавляясь от вырезаемых вставок L и H-цепей вариабельных областей DT-17. Для этого обработанные рестриктазами векторы разделяли в агарозном геле, а затем вырезали из геля высокомолекулярные фрагменты, представляющие собой плазмидные векторы без вариабельных участков антител DT-17. Затем проводили лигирование вектора с подготовленными ПЦР-продуктами.

Так как векторные конструкции pLK DT-17 и pHG DT-17 уже содержали в своем составе нуклеотидные последовательности константных областей иммуноглобулина G человека, то их клонировать не требовалось.

Для анализа работоспособности полученных рекомбинантных векторов pLK DT-22 и pHG DT-22 в эукариотической системе ими была проведена трансфекция клеток СНО. При проведении трансфекции по отдельности и ко-трансфекции обеими плазмидами был использован реагент для трансфекции Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США), согласно инструкции производителя. Одновременно с трансфекцией был произведен контроль эффективности трансфекции плазмидой pTurboRFP-C («Евроген», Россия). На третьи сутки после трансфекции культуральную жидкость отбирали в отдельные пробирки и центрифугировали. Полученные осветленные образцы анализировали методом ИФА. На поверхности планшетов для ИФА был адсорбирован дифтерийный анатоксин. Планшеты обрабатывали 2-кратными разведениями препаратов, полученных в результате трансфекции в трех повторах. После инкубации планшеты промывали и инкубировали с пероксидазным конъюгатом, специфичным к Fc-фрагментам человеческих иммуноглобулинов G, реакцию проявляли ТМВ.

Исследования показали, что в культуральной жидкости после временной



**Рис. 1. Схема получения «супервектора» pSV DT-22.**

L1, L2 — лидерные последовательности, mVH и mVL — гены мышиных варибельных областей тяжелой и легкой цепи соответственно, hCH, hCLK — человеческая константная область тяжелой и легкой цепи каппа соответственно, SV-40 poly(A) — сайт полиаденилирования вируса SV-40, Amp — ген устойчивости к ампициллину ( $\beta$ -лактамаза), Neo — ген устойчивости к неомицину (неомицин фосфотрансфераза).

трансфекции обеими плазмидами накапливались антитела, специфичные к дифтерийному анатоксину. Титры антител составили 1:64. В то же время, достоверной разницы в оптической плотности по результатам ИФА между отрицательным контролем — СНО, трансфицированные pTurboRFP-C, образцами культуральной жидкости от нетрансфицированных клеток и в препаратах, полученных в результате трансфекции каждой плазмидой по отдельности, выявлено не было. Таким образом, было установлено, что только при одновременной трансфекции плазмидами, содержащими L и H-цепи DT-22, детектировалось накопление специфичных антител в супернатантах клеток.

На следующем этапе из двух рекомбинантных плазмид, кодирующих нуклеотидные последовательности легкой (pLK DT-22) и тяжелой (pHG DT-22) цепей химерного антитела к ДТ, был получен супервектор pSV DT-22, объединяющий эти гены в одной плазмидной конструкции. Для этого вектор pLK DT-22 обрабатывали рестриктазами BamHI и BglII, и фрагмент, содержащий нуклеотидные последовательности варибельной и константной областей легкой цепи химерного антитела, вырезали из геля и очищали с помощью специализированного набора реагентов («Евроген», Россия). Вектор pHG DT-22 обрабатывали рестриктазой BamHI. Подготовленные таким образом векторы лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы («СибЭнзим», Россия). Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамм XL1-Blue. Клоны бактерий для накопления плазмиды отбирали на основании рестрикционного анализа плазмид выделенных из отдельных колоний с использованием коммерческого набора фирмы «ZymoResearch» (США) — ZR Plasmid Miniprep. Отобранные плазмиды секвенировали и использовали для трансфекции клеток СНО с целью получения стабильно трансфицированной культуры клеток. Стабильно трансфицированную культуру клеток СНО получали методом выращивания клеток в токсичной дозе антибиотика G418 в течение 14 дней.

Химерные антитела к дифтерийному токсину, полученные в результате временной и стабильной трансфекции «супервектором» pSV DT-22, были проанализированы в реакции ИФА. При временной трансфекции титр специфических антител против ДТ составил 1:128, а при стабильной — 1:16.

Из стабильно-трансфицированной культуры были получены 40 клонов, самый продуктивный из которых секретировал антитела в титре 1:1024, что в 64 раза больше по сравнению с исходной стабильно трансфицированной культурой СНО.

Для оценки выхода антител от высокопродуктивного клона собранную на 4 сутки культуральную среду центрифугировали для избавления от дебриса и клеток, а супернатант собирали для аффинного выделения химерных антител к ДТ на протеин-G сефарозе. Выход антител в элюате составил около 4 мг с каждого литра культуральной среды (рис. 2).

Сконцентрированные антитела диализовали, проводили стерилизующую фильтрацию через фильтр с мембраной PES и диаметром пор 0,2 мкм и использовали для оценки токсиннейтрализующей активности в реакции нейтрализации ДТ в культуре клеток СНО (табл.).

Оценку токсиннейтрализующей активности химерных антител DT-22 проводили в 96-луночном планшете. Для этого готовили 2-кратные разведения химерных антител и вносили препараты в лунки в объеме 100 мкл/лунку, после чего добавляли в каждую лунку по 4 цитотоксические дозы ДТ (0,0025 Lf/мл) в объеме 50 мкл и 100 мкл среды RPMI-1640. Далее вносили по 100 мкл суспензии предварительно снятых 0,25% раствором трипсина-ЭДТА и отмытых центрифугированием клеток СНО в концентрации  $10^6$  клеток на планшет

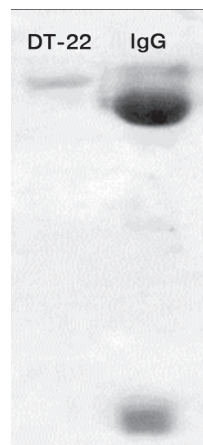


Рис. 2. Электрофорез аффинно очищенных химерных антител DT-22 в ПААГ. Неденатурирующие условия, окрашивание Кумасси; DT-22 — аффинно очищенные химерные антитела DT-22 (клон DT-22-7-C20).

( $10^4$  на лунку). Планшет помещали в  $\text{CO}_2$  инкубатор при  $37^\circ\text{C}$ . Для контроля брали стандартную противодифтерийную сыворотку, которую также титровали с 2-кратным шагом, начиная с 0,01 МЕ/мл. Учет результатов реакции проводили через 48 час под микроскопом и через 72 часа — колориметрически. Закисление среды свидетельствовало о пролиферации клеток в лунках с полностью нейтрализованным исследуемыми препаратами ДТ. В результате нейтрализующая активность химерных антител ДТ-22 с дифтерийным токсином в культуре клеток СНО наблюдалась при концентрации антител 22 мкг/мл.

Таким образом, общепринятыми молекулярно-биологическими и генно-инженерными методами были получены рекомбинантные векторы pLK DT-22 и pHG DT-22, кодирующие соответственно вариабельные области легкой и тяжелой цепей химерного антитела ДТ-22. Векторные конструкции были спроектированы таким образом, чтобы не требовалось при изменении специфичности антител синтезировать гены вариабельных участков легкой и тяжелой цепей, а достаточно было получить ПЦР-продукты генов Н и L-цепей с «довесками», содержащими сайты рестрикции для клонирования в универсальный вектор.

Для получения «супервектора» pSV DT-22 вектор pLK DT-22 обрабатывали рестриктазами BamHI ( $G^{\wedge}GATCC$ ) и BglII ( $A^{\wedge}GATCT$ ), а pHG DT-22 — только BamHI. Особенность данного подхода в том, что «липкие» фрагменты, получаемые при рестрикции вектора pLK DT-22 двумя разными рестриктазами, одинаковые — GATC. Таким образом, лигирование гена легкой цепи в pHG DT-22 может происходить как в прямой, так и в обратной ориентации, при этом в зависимости от ориентации сайт рестрикции BamHI может менять локализацию, в то же время, сайт рестрикции BglII пропадает при любой ориентации гена легкой цепи. Эта особенность позволяет рестрикционным анализом оценивать ориентацию встраиваемого гена. Нами были получены оба варианта «супервекторов». Достоверной разницы в выходе специфических антител к ДТ в культуре клеток СНО в зависимости от ориентации генов относительно друг друга при временной трансфекции выявлено не было.

«Супервектор» pSV DT-22 содержит ген устойчивости к антибиотику G418, что позволило использовать его для получения стабильно трансфицированной культуры клеток и последующего клонирования. С целью увеличения выхода целевого продукта из стабильно трансфицированной культуры клеток СНО был выделен высокопродуктивный клон ДТ-22-7-С20, его продуктивность в 64 раза превышала выход специфических антител из исходной культуры клеток. Экспериментально показано, что получаемые антитела являются химерными, то есть содержат мышинные антиген-распознающие вариабельные фрагменты и человеческий Fc-фрагмент, они секретируются из клеток и обладают специфичностью к дифтерийному токсину/анатоксину.

#### Оценка активности химерных антител ДТ-22 в ИФА на разных стадиях очистки

Разведение химерных антител	Оптическая плотность в ИФА при 450 нм $\pm$ Sd	
	после диализа	после фильтрации
1:100	5,303 $\pm$ 0,132	4,88 $\pm$ 0,102
1:200	4,457 $\pm$ 0,017	3,706 $\pm$ 0,127
1:400	3,087 $\pm$ 0,135	2,267 $\pm$ 0,044
1:800	1,766 $\pm$ 0,096	1,218 $\pm$ 0,108
1:1600	0,849 $\pm$ 0,026	0,711 $\pm$ 0,048
1:3200	0,512 $\pm$ 0,054	0,395 $\pm$ 0,006
1:6400	0,347 $\pm$ 0,008	0,300 $\pm$ 0,010
1:12800	0,223 $\pm$ 0,007	0,224 $\pm$ 0,014
Исх. среда 1:10		2,102 $\pm$ 0,096
К-		0,049 $\pm$ 0,031

Примечание. Sd — стандартное отклонение.

Перед оценкой токсиннейтрализующей активности химерных антител их предварительно очищали с использованием аффинной очистки на протеин-G сефарозе. После чего проводили диализ и фильтрацию через фильтр с мембраной PES и размером пор 0,2 мкм, на каждом этапе полученный материал анализировали в ИФА. Очистка и концентрирование антител имели решающее значение, так как низкая концентрация антител в образце не позволяла определить их токсиннейтрализующие свойства.

Показано, что применение аффинной очистки увеличивает титр антител с 1:1024 до 1:12800. При этом некоторое количество антител теряется при фильтрации, хотя PES мембрана обладает пониженной белковой сорбцией.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-15-01525.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения. Acta Naturae. 2009, 1: 32-50.
2. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габибов А.Г., Кирпичников М.П. Неприродные антитела и иммуноконъюгаты с заданными свойствами: оптимизация функций через направленное изменение структуры. Успехи химии. 2015, 84 (1): 1-26.
3. Оксанич А.С., Самарцева Т.Г., Файзулов Е.Б., Гаврилова Н.Ф., Яковлева И.В., Свиридов В.В., Зверев В.В. Конструирование плазмидного вектора для получения химерных антител заданной специфичности в клетках млекопитающих. Журн. микробиол. 2017, 6: 56-63.
4. Imai S., Mukai Y., Nagano K. et al. Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies. Biol. Pharm. Bull. 2006, 29 (7): 1325-1330.
5. Khan K.H. Gene expression in Mammalian cells and its applications. Adv. Pharm. Bull. 2013, 3 (2): 257-263.
6. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975, 256 (5517): 495-497.
7. Maynard J., Georgiou G. Antibody engineering. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2000, 2:339-376.
8. Nishimiya D. Proteins improving recombinant antibody production in mammalian cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014, 98 (3): 1031-1042.

*Поступила 25.12.17*

Контактная информация: Самарцева Т.Г.,  
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

---

## ОСОБЕННОСТИ РЕКОМБИНАЦИОННОЙ ГЕНОМИКИ БАКТЕРИЙ РОДА ACINETOBACTER — ПАТОГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов — филиал Пермского федерального исследовательского центра УРО РАН, Пермь; <sup>2</sup>Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера

*Цель.* Определение роли изменчивости генетических маркеров в формировании лекарственно-устойчивого фенотипа представителей рода *Acinetobacter*. *Материалы и методы.* Проведен сравнительный анализ изменчивости важного для генетической рекомбинации фрагмента ДНК у *A.baumannii* — одного из наиболее актуальных возбудителей послеоперационных инфекций, а также *A. pittii* и *A. lwoffii*. *Результаты.* Показано, что последовательность изученного участка хромосомы с геном интегразы/рекомбиназы XerC весьма изменчива, в частности, здесь могут быть представлены гены, ответственные за развитие резистентности к полимиксинам и (фтор)хинолонам, а также другим антибиотикам. *Заключение.* Полученные результаты важны для контроля за эпидемическими (пандемическими) штаммами ацинетобактера.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 40—45

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii*, эпидемический (пандемический) клон, антибиотикорезистентность, эффлюкс-транспортеры, интегразы/рекомбиназа XerC

*A.P.Solomennyi<sup>1</sup>, N.A.Zubareva<sup>2</sup>*

## PECULIARITIES OF RECOMBINATIVE GENOMICS OF ACINETOBACTER — HUMAN PATHOGEN

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm; <sup>2</sup>Wagner State Medical University, Perm, Russia

*Aim.* The disclosure of the role of genetic markers variability among *Acinetobacter* genus in connection with multidrug-resistant phenotype realization. *Materials and methods.* A comparative analysis was reviewed on DNA fragments important for genetic recombination in *A. baumannii* — one of the most relevant pathogens of postoperative infection, as well as *A. pittii* and *A. lwoffii*. *Results.* Integrase/recombinase XerC gene-bearing region of the chromosome is notably different and could include the genes responsible for the development of resistance against polymyxins and (fluoro)quinolones, as well as other antibiotics. *Conclusion.* The results obtained are important in surveillance of epidemic (pandemic) strains of *Acinetobacter* spp.

Zh. Mikrobiol. (Moscov), 2018, No. 3, P. 40—45

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, epidemic (pandemic) clone, antibiotic resistance, multidrug efflux transporters, integrase/recombinase XerC

## ВВЕДЕНИЕ

*Acinetobacter baumannii* — оппортунистический патоген, один из наиболее важных возбудителей широкого спектра нозокомиальных, в том числе и послеоперационных, инфекций с уровнем летальности до 35%. Инфекционные вспышки в стационаре и учреждениях длительного ухода часто связаны с множественной лекарственной устойчивостью данного патогена. Результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» демонстри-



руют неуклонное увеличение роли ацинетобактера в этиологии нозокомиальных инфекций в Российской Федерации и нарастании устойчивости изолятов к большинству антибактериальных препаратов, в том числе, к карбапенемам [2, 3]. Большинство инфекций вызываются двумя основными популяционными клонами *A. baumannii*, распространенными во всех регионах мира. При этом вирулентность и патогенный потенциал данного возбудителя окончательно не определены и являются предметом интенсивных исследований [5, 9]. Естественные места обитания и потенциальные резервуары *A. baumannii* как нозокомиального возбудителя также окончательно не установлены [15]. Способность к колонизации и хорошей адаптации во внешней среде, в том числе и за счет образования биопленок, делают необходимым соблюдение строгих мер инфекционного контроля в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), пациенты которых являются наиболее уязвимыми для инфекций [7, 10]. Предшествующая колонизация пациентов полирезистентными штаммами *A. baumannii* является фактором риска неблагоприятного исхода при последующих госпитализациях [13]. При этом совершенно не исключена возможность обмена генетическим материалом между штаммами в очаге инфекции. Расширение списка видов, геном которых полностью секвенирован, позволяет провести их сравнительный филогенетический анализ с целью понимания молекулярных механизмов адаптации ацинетобактера к роли патогена человека [8, 9].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования — доступные в базе данных GenBank геномы *A. baumannii*, *Acinetobacter pittii* и *Acinetobacter lwoffii* с различным уровнем устойчивости к антимикробным препаратам. Полногеномное пиросеквенирование штамма *A. baumannii* Perm [1] после приготовления библиотек фрагментов ДНК (shotgun) по стандартному протоколу (454/Roche) проведено на аппарате «GS Junior» в Центре коллективного пользования и высокопроизводительного секвенирования Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта (Москва). Геном был прочитан с 50-кратным покрытием, биоинформационное аннотирование выполнено на сервере RAST (GenBank AUZL000000000). Штамм *A. baumannii* 28 секвенирован на приборе «GS Junior» в рамках коллективного проекта (GenBank Acc. no. MAFT000000000). Глобальное выравнивание и геномный анализ нуклеотидных последовательностей выполнено с помощью алгоритм BLAST.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее установлено, что эффлюкс-транспортер SMR-типа QacE кодируется в геноме большинства лекарственно-устойчивых грамотрицательных бактерий, в том числе в аттенуированной форме в составе большинства интегров резистентности [14]. Поиск ассоциации генов, кодирующих иные системы выброса антимикробных агентов из бактериальной клетки, с генами интеграз/рекомбиназ выявил, что гены, кодирующие такие системы, расположены на хромосоме представителей рода *Acinetobacter* проксимально гену тирозиновой рекомбиназы *XerC*.

При сравнении последовательности, прилегающей к *xerC* установлены определенные закономерности (табл.). Так, выявлена высокая степень гомологии (не менее 97%) нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих эффлюкс-транспортер с обеспечением устойчивости к антимикробным пре-

## Геномы бактерий рода *Acinetobacter*, включенные в исследование

Вид, штамм, номер в GenBank	Описание	Последовательность на хромосоме (представлены наименования продуктов генов и их функция или особенность)	QRDR (Gly81Asp, Ser83Leu, Ala84Pro)
<i>A. baumannii</i> Perm (AUZL00000000)	MDR-штамм, панкреонекроз, гемокультура, ОРИТ, Пермь, РФ (2010 год)	XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF, В и А субъединицы → ДНК гираза, субъединица А → ArnT → ArnC (ундекапренилфосфат-альфа-L-Aga4N трансфераза и Aga4N-гликозилтрансфераза в переносе Aga4N на липид А) → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP	G, L, A
<i>A. baumannii</i> 28 (MAFT00000000)	MDR-штамм, инфицированный ожог, раневое отделяемое, выделен Гончаровым А.Е., С.-Петербург, РФ (2002 год)	XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → ArnT → ArnC → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP	G, L, A
<i>A. baumannii</i> XDR-BJ83 (NZ_CP018421)	XDR-штамм, цирроз печени, асцитическая жидкость, Китай (2007 год)	XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → ArnT → ArnC → белок с неустановленной функцией → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP	G, L, A
<i>A. baumannii</i> ACICU (CP000863)	MDR-штамм, ликвор, ОРИТ, Рим, Италия (2005 год)	XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → ArnT → ArnC → белок с неустановленной функцией → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP	G, L, A
<i>A. baumannii</i> SDF (CU468230)	Авирулентный штамм с природной чувствительностью к антимикробным препаратам, выделен от вши человека	Инсерционная последовательность ISAba6 → транспортер L-лизина → XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → ArnT → ISAba6 → фрагментированная ArnC → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP → xxxx → ISAba6 → xxxx → comA* → ISAba6	G, S, A
<i>A. pittii</i> AP_882 (CP014477)	NDM-1-позитивный штамм, раневое отделяемое, Малайзия (2014 год)	XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP → xxxx → интегразы (множественные копии на хромосоме и плазмиде pNDM-AP882 с геном blaNDM-1)	G, S, A
<i>A. lwoffii</i> 51m (LZDF00000000)	Выделен Гончаровым А.Е. из пищеварительного тракта ископаемого (28610 лет до н.э.) мамонта, Якутия-Саха, РФ	XerC → белок с неустановленной функцией → регулятор транскрипции AsnC → эффлюкс-транспортер аминокислот → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → белок с неустановленной функцией → AdeABC- транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP	G, S, A

Примечание. MDR и XDR — штаммы с множественной и экстремальной устойчивостью к доступным антибактериальным препаратам соответственно. Aga4N — сокращение от 4-амино-4-дезоксигалактозы. QRDR (quinolone resistance determining region) — последовательность гена *gugA*, важная для резистентности к препаратам группы фторхинолонов. xxxx — пропущенная для компактности табл. последовательность. \*Продукт гена *comA*, участвует в обеспечении генетической компетентности.

паратам и токсичным ионам, а именно AdeABC (*Acinetobacter* drug efflux и ATPbinding cassette), а также мембранный белок MFP транспортной системы RND и компоненты системы MFS (дистальнее по хромосоме). У лекарственно-устойчивых штаммов *A. baumannii* присутствует сцепление генов *arnTCS*, кодирующих ферменты, вовлеченные в процесс переноса 4-амино-4-дезоксигалактозы на липид А, в то же время, у лекарственно-чувствительного

штамма SDF последовательность *argTC* фрагментирована вставкой IS-элемента, полученной, по-видимому, от другого вида бактерий. Интегразная последовательность обнаруживается здесь в геноме *A. pittii*. Аминокислотная замена Ser83Leu в транслированной последовательности QRDR-региона гена *rugA* отмечена только среди клинических штаммов *A. baumannii* с устойчивостью к фторхинолонам. Таким образом, присутствие и возможность модификации данного «горячего» участка хромосомы разных видов и штаммов может реализоваться в лекарственно-резистентном фенотипе.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Эффлюкс-транспортные системы представляют собой один из ключевых молекулярных механизмов множественной лекарственной устойчивости грамотрицательных бактерий. Транспортеры ABC способны активно экспортировать широкий спектр антимикробных агентов (таких как антибиотики, антисептики и многие цитотоксические химические вещества). Их присутствие в специфическом сайте хромосомы может быть связано не только с более высокой вероятностью генетической рекомбинации, но и с обеспечением определенной стабильности этих ассоциированных (сцепленных) генов в популяции [4].

С другой стороны, изменения биохимического процесса синтеза липида А способны привести к снижению аффинности липополисахарида клеточной стенки бактерий к полимиксинам, что важно для клинических изолятов [4]. Число сообщений об обнаружении колистин-резистентных штаммов среди бактерий, которые не обладают естественной устойчивостью (*A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и представители семейства *Enterobacteriaceae*) прогрессивно увеличивается, при этом установлен факт формирования группы панрезистентных возбудителей [11]. Устойчивость *A. baumannii* к колистину, например, в Греции достигла 21,1% [12]. В Российской Федерации ситуация в отношении полимиксин-резистентных возбудителей более благоприятна, в частности, штаммы *A. baumannii* Perm и 28 чувствительны к полимиксину В и колистину. Однако они являются устойчивыми к фторхинолонам в соответствии с критериями EUCAST (ципрофлоксацин МПК >2 мг/л, левофлоксацин МПК 2 мг/л).

В отличие от ацинетобактера у лекарственно-устойчивых энтеробактерий разных видов изменчивость последовательности, расположенной проксимально гену *hexC* практически не прослеживается, и с резистентным фенотипом здесь можно связать лишь наличие гена, кодирующего хлорамфеникол-чувствительный мембранный белок RarD молекулярного семейства EAM (данные не приведены). Однако и здесь *Hex*-связывающие сайты вовлечены в мобилизацию отдельных фрагментов ДНК посредством сайт-специфической рекомбинации [6].

Таким образом, в исследовании получено новое доказательство пластичности генома ацинетобактера, что, безусловно, способствует формированию лекарственно-устойчивой популяции. Полногеномное секвенирование должно стать неотъемлемой частью молекулярной диагностики данного возбудителя, т.к. иными методами получить представленную в работе информацию практически невозможно. Молекулярно-генетический подход позволяет, среди прочего, уточнить особенные свойства эпидемического генотипа.

*Авторы выражают благодарность Гончарову А.Е. (Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербурге) и коллегам, принявшим участие в секвенировании и биоинформационном анализе. Работа выполнена в*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гончаров А.Е., Еремеева М.И., Зубарева Н.А., Соломенный А.П. Генотипический анализ карбапенем-устойчивого штамма *Acinetobacter baumannii*. Перм. мед. журнал. 2011, 28 (6): 95-99.
2. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. и исследовательская группа «Марафон». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011—2012 гг. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2014, 16 (4): 266-272.
3. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. и исследовательская группа «Марафон» Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» 2013—2014. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2017, 19 (1): 42-48.
4. Чеботарь И.В., Лазарева А.В., Масалов Я.К., Михайлович В.М., Маянский Н.А. *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства. Вестник РАМН. 2014, 9-10: 39-50.
5. Antunes L.C., Visca P., Towner K.J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. Pathog. Dis. 2014, 71: 292-301.
6. Castillo F., Benmohamed A., Szatmari G. Xer site specific recombination: double and single recombinase systems. Front. Microbiol. 2017, 8: Art. 453.
7. Dettori M., Piana A., Deriu M.G. et al. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. New Microbiol. 2014, 37: 185-191.
8. Ellington M.J., Ekelund O., Aarestrup F.M. et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. Clin. Microbiol. Infect. 2017, 23: 2-22.
9. Harding C.M., Hennon S.W., Feldman M.F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. Nat. Rev. Microbiol. 2018. 16: 91-102.
10. Krzyściak P., Chmielarczyk A., Pobiega M. et al. *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility. APMIS. 2017, 125: 1017-1026.
11. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front. Microbiol. 2014, 5: Art. 643.
12. Oikonomou O., Sarrou S., Papagiannitsis C.C. et al. Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Central Greece: mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. BMC Infect. Dis. 2015, 15: Art. 559.
13. Segagni Lusignani L., Starzengruber P., Dosch V. et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: A 10-year analysis in a large tertiary care university hospital in central Europe with international admissions. Wien Klin. Wochenschr. 2017, 129: 816-822.
14. Shafaati M., Boroumand M., Nowroozi J. et al. Correlation between *qacE* and *qacEΔ1* efflux pump genes, antibiotic and disinfectant resistant among clinical isolates of *E. coli*. Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov. 2016, 11: 189-195.
15. Wilharm G., Skiebe E., Higgins P.G. et al. Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide. Environ. Microbiol. 2017, 19: 4349-4364.

Поступила 05.02.18

Контактная информация: Соломенный Александр Петрович, к.б.н., 614081, Пермь, ул. Голева, 13, р.т. (342)280-83-32

О.А.Образцова, К.А.Алейникова, А.А.Кубанов, Д.Г.Дерябин

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА *arp* У РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТОВ *TREPONEMA PALLIDUM*

Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии, Москва

*Цель.* Анализ варибельности нуклеотидных последовательностей внутреннего фрагмента гена *arp* у современных российских штаммов *T. pallidum subsp. pallidum*. *Материалы и методы.* В работе использованы 57 клинических изолятов, полученных в 2016 — 2017 гг. из специализированных медицинских учреждений дерматовенерологического профиля Центрального (Калужская область), Северо-Кавказского (Ставропольский край) и Сибирского (Республика Тыва) федеральных округов. Для исследования нуклеотидных последовательностей гена *arp* использована технология капиллярного секвенирования. *Результаты.* Предложена двухраундовая амплификация гена *arp*, обеспечивающая корректное прочтение его внутреннего участка. В составе данных участков описаны 4 варианта 60-нуклеотидных повторов, отличающихся по составу 6, 8 и 15 — 17 триплетов. Охарактеризованы различные комбинации подобных повторов, соответствующие референсному штамму Nichols, глобально распространенной геногруппе Street 14, а также и впервые обнаруженному региональному варианту Stavropol. *Заключение.* Продемонстрирована целесообразность секвенирования гена *arp* как инструмента повышения эффективности молекулярного типирования *T. pallidum*.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 45—52

Ключевые слова: *Treponema pallidum subsp. pallidum*, молекулярное типирование, ген *arp*, секвенирование

О.А.Образцова, К.А.Алейникова, А.А.Кубанов, Д.Г.Дерябин

## *Arp* GENE NUCLEOTID SEQUENCES VARIABILITY IN RUSSIAN *TREPONEMA PALLIDUM* ISOLATES

State Research Center of Dermatovenerology and Cosmetology, Moscow, Russia

*Aim.* Analysis of the *arp* gene internal fragment nucleotide sequences variability in modern russian *T. pallidum subsp. pallidum* strains. *Materials and methods.* 57 *T. pallidum* isolates obtained from specialized dermatovenerologic clinics of the Central (Kaluga), the North Caucasus (Stavropol) and the Siberian (Tyva) regions in 2016 — 2017 were used in the study. The sequencing of the *arp* gene was performed using capillary electrophoresis technology. *Results.* A two-round amplification of the *arp* gene have been proposed, which ensures a correct reading of its internal region. Four variants of 60-nucleotide repeats in the internal *arp* fragment are described, which differing in 6, 8 and 15 — 17 codons compositions. Various combinations of these repeats, corresponding to the reference Nichols strain, globally distributed Street 14 genogroup, and the firstly described Stavropol regional variant are shown. *Conclusion.* The prospect of *arp* gene sequencing as a way to increase *T. pallidum* molecular typing efficiency is postulated.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 45—52

Key words: *Treponema pallidum subsp. pallidum*, molecular typing, *arp* gene, sequencing

## ВВЕДЕНИЕ

Молекулярная эпидемиология, возникшая как результат интеграции молекулярно-генетических методов в традиционные эпидемиологические исследования, с конца XX века стала одним из основных инструментов кон-

троля над распространением и изменчивостью возбудителей инфекционных заболеваний [4]. В наибольшей степени этот подход оказался востребованным при анализе эпидемиологии некультивируемых патогенов, ярким примером которых является возбудитель сифилиса — *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* [1].

Отправной точкой для разработки метода генотипирования бледной трепонемы стала расшифровка ее полного генома [6] и последующее сравнение с геномами других представителей вида *T. pallidum* [3, 12], позволившее идентифицировать на бактериальной хромосоме наиболее вариабельные локусы. На основании двух из них — генов *agr* и *trpII* — в 1998 году был предложен первый метод молекулярного типирования *T. pallidum* subsp. *pallidum* [13], в дальнейшем поддержанный CDC (США) и получивший широкое распространение при анализе эпидемиологии сифилиса во всем мире как CDC-метод [2, 10].

Использование для этих целей гена *agr* (acidic repeat protein) определялось особенностями его структуры: наличием консервативных терминальных участков (в том числе мембрана-связывающего домена и сайта для сигнальной пептидазы I), а также находящегося между ними вариабельного фрагмента из 60-нуклеотидных тандемных повторов, занимающего 51% от общей длины гена [9]. При этом предложенный подход к выявлению подобного полиморфизма основан на амплификации соответствующего участка гена *agr* и последующего определения количества 60-нуклеотидных повторов на основе характеристик электрофоретической подвижности ампликона в агарозном геле [13]. В зависимости от числа подобных повторов (от 2 до 22) идентифицируемому изоляту присваивается соответствующий цифровой индекс, в дальнейшем дополняемый буквенным обозначением, соответствующим определенному профилю полиморфизма длин фрагментов рестрикции продуктов амплификации генов *trpII* (16 вариантов).

Многолетний опыт использования CDC-метода заставил констатировать ряд ограничений его дискриминирующей способности, в том числе связанных с выраженным доминированием вариантов *T. pallidum* subsp. *pallidum* с четырнадцатью повторами в гене *agr* [2, 10]. В этой связи, для повышения разрешающей способности метода было предложено дополнительное секвенирование генов *trp0136*, *trp0319*, *trp0548* и 23S рРНК [5], а также вариабельного участка гена *trp0548* (позиции 131 — 215) [11]. При этом последний подход, позволивший разделить подтип 14a на 2, а 14d на 4 отдельные подгруппы, получил наибольшее распространение и в настоящее время интегрирован в систему молекулярного типирования при сифилисе.

Вместе с тем, анализ гена *agr* (слияние *trp0433* — 0434) свидетельствует о неполном раскрытии его дифференцирующего потенциала. Основанием для этого утверждения являются данные о неидентичном характере нуклеотидных последовательностей тандемных повторов, на основании которых могут быть выделены их I, II, III и II/III подтипы [9]. Другой особенностью может являться различный порядок расположения этих подтипов в составе внутреннего фрагмента гена *agr* [7]. Соответственно секвенирование гена *agr* вместо рутинной детекции ПЦР-продуктов его амплификации представляется перспективным направлением совершенствования CDC-метода, приводящим молекулярное типирование *T. pallidum* subsp. *pallidum* к стандартам мультилокусного секвенирования бактериальных геномов.

В этой связи, целью настоящего исследования явился анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей внутреннего фрагмента гена *agr* у

современных российских штаммов *T. pallidum* subsp. *pallidum*, выполненный с использованием технологии капиллярного секвенирования (по Сенгеру).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 57 клинических изолятов, полученных в 2016 — 2017 гг. из специализированных медицинских учреждений дерматовенерологического профиля Центрального (Калужская область), Северо-Кавказского (Ставропольский край) и Сибирского (Республика Тыва) федеральных округов. В качестве референса использован *T. pallidum* subsp. *pallidum* штамм Nichols, культивируемый на тестикулярной модели у кроликов.

Выделение ДНК из исследуемого биоматериала проводилось с использованием набора реагентов «Проба-НК» (ДНК-технология, Россия). Присутствие генетического материала *T. pallidum* subsp. *pallidum* в полученных образцах подтверждалось методом ПЦР с праймерами к гену *poA* (регион 1156 — 1531 пар оснований), кодирующему специфическую ДНК-полимеразу I данного микроорганизма [8].

Рутинное типирование подтвержденных клинических изолятов проводили с использованием CDC-метода [13] путем амплификации гена *arp*, а также амплификации генов подсемейства *trpII* с последующей рестрикцией эндонуклеазой Tru9 I (НПО СибЭнзим, Россия) и оценкой электрофоретической подвижности полученных продуктов в агарозном геле относительно маркеров молекулярных масс GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoFisherScientific, США). В соответствии с рекомендацией Marra S.M. et al. [11] дополнительно проводили секвенирование варибельного участка гена *trp0548*.

Подбор праймеров для секвенирования варибельного фрагмента гена *arp* осуществляли с использованием банка аннотированных нуклеотидных последовательностей Национального центра биотехнологической информации США (GenBank NCBI USA) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>] и on-line сервиса nucleotide BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].

Амплификация гена *arp* проводилась с использованием термоциклера DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cyler (Bio-Rad, США). Очистка ПЦР-продукта после первого этапа амплификации проведена с использованием набора «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen, Германия). Очищенный ПЦР-продукт был использован для второго этапа амплификации с применением меченых терминирующих нуклеотидов из набора реагентов Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Осажденные продукты ПЦР использовали для проведения секвенирования варибельного фрагмента гена *arp* на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с применением программного обеспечения 3130 Data Collection v.3.0.

Первичная расшифровка нуклеотидных последовательностей варибельного фрагмента гена *arp* проведена в программе Sequencing Analysis 5.3.1. Для выравнивания гена *arp* на референсные сиквенсы *T. pallidum* subsp. *pallidum* использована программа Mega 5.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование 57 образцов генетического материала *T. pallidum* в соответствии с рутинной процедурой CDC относило их исключительно к 14 молекулярному субтипу по гену *arp*. Наличие гена *arp* с четырнадцатью 60-нуклеотидными тандемными повторами продемонстрировано и в референс-

ном геноме *T. pallidum* штамм Nichols. Последующее типирование по генам *trpII* и *trp0548* позволило частично разделить анализируемую выборку, выделив в ней доминантный (14 d/f — 89,5%) и минорные (14 b/g и 14 c/f по 3,5%; 14 b/f и 14 i/f по 1,7%) молекулярные субтипы.

Однако однотипный характер гена *agr* существенно снизил эффективность дискриминации данных клинических изолятов. Тем самым полученный результат подтвердил декларированную необходимость совершенствования CDC-метода, в частности, путем углубленного анализа гена *agr* с применением технологии капиллярного секвенирования.

Практическое решение этой задачи потребовало внесения изменений в протокол амплификации гена *agr*, поскольку использование предложенных Pillay A. et al. [13] прямого и обратного праймеров как на этапе фрагментации анализируемого участка ДНК, так и в реакции амплификации с применением меченых терминирующих нуклеотидов, не обеспечивало качественного прочтения концевых участков анализируемых нуклеотидных последовательностей. В этой связи, нами была предложена процедура двухраундовой амплификации гена *agr* с использованием двух пар прямого и обратного праймеров (табл. 1). При этом использование первой (внешней) пары праймеров ориентировано на получение первичного ампликона размером 1643 п.о., расположенного между 388 и 1541 нуклеотидами в гене *agr* и наряду с его центральным участком из 60-нуклеотидных тандемных повторов дополнительно включающего фрагменты 5'- и 3'-концевых консервативных участков. В свою очередь, на этапе секвенирования с использованием терминирующих нуклеотидов использовалась вторая (внутренняя) пара праймеров, амплифицирующая внутренний участок гена *agr*, полученного после первого раунда амплификации (рис. 1). Подобный подход обеспечил качественное прочтение участка гена *agr* между 414 и 1409 нуклеотидами (размером 1015 п.о.), результатом которого являлось как четкое определение количества 60-нуклеотидных повторов, так и их первичных нуклеотидных последовательностей.

Результаты проведенного секвенирования во всех случаях подтвердили присутствие во внутреннем участке гена *agr* четырнадцати тандемных повторов, одновременно зафиксировав вариации их нуклеотидного состава, а также

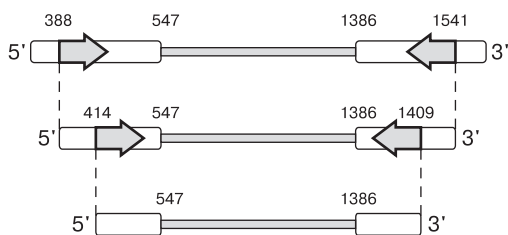


Рис. 1. Схема двухраундовой амплификации гена *agr* *T. pallidum* subsp. *pallidum* с использованием внешней и внутренней пар праймеров.

Таблица 1. Праймеры, использованные для амплификации фрагментов гена *agr* *T. pallidum* subsp. *pallidum*

Название	Последовательность 5'-3'	Длина ПЦР-продукта (п.о.)
Внешние праймеры (первый раунд амплификации)		
agr_F_1	CAA GTC AGG ACG GAC TGT CC	1643
agr_R_1	GGT ATC ACC TGG GGA TGC	
Внутренние праймеры (второй раунд амплификации)		
agr_F_2	ATC TTT GCC GTC CCG TGT GC	1015
agr_R_2	CCG AGT GGG ATG GCT GCT TC	

различный характер взаимного расположения подобных неидентичных повторов.

Анализируемые повторы характеризовались высоким содержанием GC-пар (67%), наличием двух палиндромных последовательностей (CCGGCC и GAGGGGAG), а также вариабельностью пяти триплетов в позициях 6, 8, 15, 16 и 17 (табл. 2). Наиболее частым вариантом являлся



60-нуклеотидный повтор с триплетом GTG в 6 и AAG в 8 позициях, а также триплетами GAG, CGT и GAG в 15 — 17 позициях. Ранее исключительное присутствие аналогичных 60-нуклеотидных повторов было показано у *T. pallidum*, выделенных от обезьян, *T. pallidum* subsp. *pertenue* и *T. pallidum* subsp. *endemicum* [7], что позволяет предполагать их эволюционную первичность, составившую основу для последующей дивергенции гена *agr*. Вторым по частоте встречаемости являлся повтор, отличающийся от описанного выше вариантом единственным однонуклеотидным полиморфизмом — заменой пиримидинового основания во втором положении 6 триплета, приводящим к изменению кодируемой аминокислоты с аланина на валин (GCG → GTG; A → V). Более существенными оказывались отличия третьего и четвертого вариантов, нуклеотидные замены в 15 — 17 триплетах которых произошли по типу транзиции, т.е. путем замещения пуринового основания на пуриновое, а пиримидиновое на пиримидиновое. При этом замены пуриновых оснований во втором положении 15 (GAG → GGG) и 16 (CGT → CAT) трипле-

Таблица 2. Варианты нуклеотидных и аминокислотных последовательностей tandemных повторов в гене/белке *agr* *T. pallidum*.

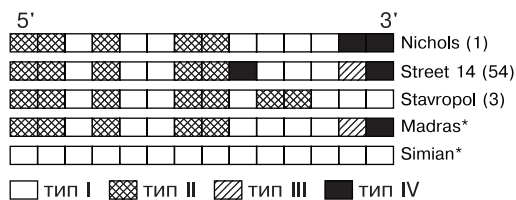
№ триплета (аминокислота) Тип повтора		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
I																					
II																					
III																					
IV																					

Примечание. Подчеркнуты нуклеотидные и аминокислотные замены относительно I варианта tandemного повтора.

тов повлекли за собой изменение кодируемых аминокислот с глутаминовой кислоты на глицин ( $E \rightarrow G$ ) и с аргинина на гистидин ( $R \rightarrow H$ ), а нуклеотидная замена в третьем положении 17 триплета ( $GAG \rightarrow GAA$ ), напротив, не сопровождалась изменением кодируемой аминокислотной последовательности. Наконец, различия между третьим и четвертым вариантами 60-нуклеотидного повтора заключались в замене двух пуриновых оснований 8 триплета с соответствующим изменением кодируемой аминокислоты с лизина на глицин ( $AAG \rightarrow GGG$ ;  $K \rightarrow G$ ). В целом полученные данные достаточно хорошо согласуются с известными представлениями о вариантах нуклеотидных последовательностей тандемных повторов гена *agr* [7, 9], в то время как предложенная нами нумерация наиболее корректно отражает вероятные последовательные изменения их первичной структуры.

Последующий анализ комбинаций расположения различных вариантов 60-нуклеотидных тандемных повторов во внутреннем участке гена *agr* привел к заключению существованию нескольких молекулярных субтипов данного гена (рис. 2).

Комбинация внутреннего участка гена *agr* у референсного штамма Nichols при прочтении от 5'-конца заключалось в нерегулярном чередовании повторов I и II типов, завершающихся двумя повторами IV типа на 3'-конце фрагмента. Однако формула подобной комбинации 5'-II-II-I-II-I-I-II-II-I-I-I-IV-IV-3' не была зафиксирована ни у одного из современных российских клинических изолятов *T. pallidum*. На этом фоне наиболее распространенной в анализируемой выборке оказывалась комбинация 5'-II-II-I-II-I-I-II-II-IV-I-I-I-III-IV-3', установленная у 54 из 57 исследованных клинических изолятов и по своей последовательности соответствующая внутреннему фрагменту гена *agr* штамма Street 14 [12]. Тем самым соотнесение полученных данных с представлениями о существовании в глобальной популяции *T. pallidum subsp. pallidum* двух обособленных генетических кластеров, известными представителями которых являются штаммы Nichols (Dallas, Chicago B и др.) и Street 14 (Philadelphia-1, AZ 11 и др.), приводило к заключению о принадлежности российских изолятов к последней, также как это было показано для возбудителей сифилиса, циркулирующих в странах Восточной Европы [5]. На этом фоне у трех клинических изолятов, поступивших из Северо-Кавказского федерального округа (Ставропольский край), была обнаружена ранее неизвестная комбинация внутреннего участка гена *agr*, состоящая только из повторов I и II типов, описываемая формулой 5'-II-II-I-II-I-I-II-II-I-II-II-I-I-I-3' и обозначенная нами как молекулярный вариант Stavropol (рис. 2). Тем самым подобная находка развивает предположение о существовании в глобальной популяции *T. pallidum subsp. pallidum* более значительного разнообразия гена *agr*, что ранее было показано на при-



**Рис. 2.** Структура внутренних участков гена *agr*, состоящих из различных вариантов 60-нуклеотидных повторов.

Варианты нуклеотидных повторов I – IV аналогичны табл. 2. Справа указано наименование известной или впервые описанной комбинации повторов (в скобках — количество штаммов из анализируемой выборки; \* комбинации приведены по данным литературы).

мере одного из регионально распространенных вариантов — выделенного в Индии штамма Madras [7].

## ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярное типирование *T. pallidum* subsp. *pallidum*, основанное на исследовании переменных генов *agr*, *trpII* и *trp0548*, в настоящее время стало распространенным и востребованным инструментом слежения за глобальной и региональной эпидемиологией сифилиса [1, 2]. В то же время, длительный опыт использования данного метода заставил констатировать ряд ограничений его дискриминирующей способности, в том числе определяемых высокой частотой встречаемости гена *agr* с четырнадцатью 60-нуклеотидными тандемными повторами.

Предложенным в настоящем исследовании подходом к повышению эффективности генотипирования *T. pallidum* явился переход от электрофоретической детекции ампликонов гена *agr* к секвенированию его внутреннего переменного участка, реализованный с использованием оригинальной двухраундовой процедуры амплификации.

Проведенное секвенирование гена *agr* позволило получить три согласующихся результата: 1) отнести все исследуемые гены к вариантам с 14 нуклеотидными повторами; 2) подтвердить существование 4 вариантов 60-нуклеотидных повторов, отличающихся по составу 6, 8 и 15 — 17 триплетов [7, 9]; 3) описать различные комбинации подобных неидентичных повторов. При этом принципиально важным результатом стало выявление в российской популяции нескольких вариантов гена *agr*. Подавляющее большинство из них (54 из 57) относились к варианту, характерному для геногруппы Street 14, что впервые показывает её доминирование в обследованных субъектах Российской Федерации. С другой стороны, вариант последовательного расположения 60-нуклеотидных повторов, характерный для геногруппы Nichols, был зафиксирован только у соответствующего референсного штамма, что свидетельствует о произошедшем полном вытеснении данного генотипа. Наконец еще одной принципиально важной находкой стало обнаружение ранее неизвестного варианта гена *agr*, имеющего четко ограниченный ареал распространения.

Таким образом, результаты проведенного исследования принципиально подтвердили целесообразность секвенирования гена *agr* для повышения эффективности молекулярного типирования *T. pallidum*, позволив дифференцировать вариант данного гена с четырнадцатью 60-нуклеотидными тандемными повторами на несколько молекулярных субтипов. Планируемое увеличение количества исследуемых клинических изолятов с вовлечением субъектов Российской Федерации с традиционно высоким уровнем заболеваемости сифилисом потенциально должно еще более расширить дискриминирующую эффективность предложенного метода, позволив охарактеризовать пандемический и региональные молекулярные варианты *T. pallidum* subsp. *pallidum*. Одновременно продолжение исследований в обозначенном направлении явится шагом, приводящим молекулярное типирование возбудителя сифилиса к стандартам мультилокусного секвенирования бактериальных геномов.

*Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России на плановый период 2018 — 2020 гг.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белозоров А.П., Сокол О.А. Молекулярное типирование микроорганизма *Treponema pallidum* подвид *pallidum*. Дерматология та венерология. 2013, 4 (62): 5-11.
2. Кубанов А.А., Воробьев Д.В., Обухов А.П., Образцова О.А., Дерябин Д.Г. Молекулярная эпидемиология *Treponema pallidum* в приграничном регионе Российской Федерации (Республика Тыва). Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017, 1: 30-34.
3. Sejková D., Zobaníková M., Chen L. et al. Whole genome sequences of three *Treponema pallidum* ssp. *pertenue* strains: yaws and syphilis treponemes differ in less than 0.2% of the genome sequence. PLoS Negl. Trop. Dis. 2012, 6(1). doi: 10.1371.
4. Dekker M.C., van Duijn C.M. Prospects of genetic epidemiology in the 21st century. Eur. J. Epidemiol. 2003, 18 (7): 607-616.
5. Flasarová M., Pospíšilová P., Mikalová L. et al. Sequencing-based molecular typing of *Treponema pallidum* strains in the Czech Republic: all identified genotypes are related to the sequence of the SS14 strain. Acta Derm. Venereol. 2012, 92: 669-674.
6. Fraser C.M., Norris S.J., Weinstock G.M. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science. 1998, 281 (5375): 375-388.
7. Harper K.N., Liu H., Ocampo P.S. et al. The sequence of the acidic repeat protein (arp) gene differentiates venereal from nonvenereal *Treponema pallidum* subspecies, and the gene has evolved under strong positive selection in the subspecies that causes syphilis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2008, 53 (3): 322-332.
8. Liu H., Rodes B., Chen C.Y., Steiner B. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. J. Clin. Microbiol. 2001, 39 (5): 1941-1946.
9. Liu H., Rodes B., George R., Steiner B. Molecular characterization and analysis of a gene encoding the acidic repeat protein (Arp) of *Treponema pallidum*. J. Med. Microbiol. 2007, 56 (6): 715-721.
10. Ma D.Y., Giacani L., Centurión-Lara A. The molecular epidemiology of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. Sex Health. 2015, 12 (2): 141-147.
11. Marra C.M., Sahi S.K., Tantaló L.C. et al. Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis. J. Infect. Dis. 2010, 202: 1380-1388.
12. Matejkova P., Strouhal M., Smajs D. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strain SS14 determined with oligonucleotide arrays. BMC Microbiol, 2008, 8:76. doi:10.1186/1471-2180-8-76.
13. Pillay A., Liu H., Chen C.Y. et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. Sex. Transm. Dis. 1998, 25 (8): 408-414.

*Поступила 25.12.17*

Контактная информация: Дерябин Дмитрий Геннадьевич, д.м.н., проф.,  
107076, Москва, ул. Короленко, 3, стр. 6, р.т. (499)785-20-40

---

*И.В.Фельдблум<sup>1</sup>, В.В.Романенко<sup>2</sup>, М.Г.Меньшикова<sup>1</sup>,  
И.А.Окунева<sup>1</sup>, А.Е.Макаров<sup>2</sup>, Н.В.Исаева<sup>1</sup>, М.Г.Радзивил<sup>3</sup>*

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПОЛИОМИЕЛИТА ИНАКТИВИРОВАННОЙ (НИДЕРЛАНДЫ) И ВАКЦИНЫ «ИМОВАКС ПОЛИО» (ФРАНЦИЯ) ПРИ ТРЕХКРАТНОЙ ИММУНИЗАЦИИ ДЕТЕЙ**

<sup>1</sup>Пермский государственный медицинский университет; <sup>2</sup>Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург; <sup>3</sup>ООО «Нанолек», Москва

*Цель.* Сравнительная оценка безопасности и иммуногенности инактивированной полиомиелитной вакцины (ИПВ) компании «Билтховен Биолоджикалз Б.В.» (Нидерланды) и «Имовакс Полио» (Франция) при подкожном и внутримышечном способах введения. *Материалы и методы.* В двойном слепом сравнительном клиническом рандомизированном многоцентровом исследовании приняли участие 120 детей в возрасте 3 месяцев. Детям 1 и 2 групп вводили ИПВ внутримышечно (1 группа) и подкожно (2 группа), детям 3 и 4 групп вводили вакцину «Имовакс Полио». *Результаты.* ИПВ характеризуется высоким профилем безопасности и иммуногенности как при подкожном, так и внутримышечном способах введения и сопоставима по своим характеристикам с вакциной «Имовакс Полио». *Заключение.* Вакцина ИПВ (Нидерланды) рекомендована к регистрации на территории Российской Федерации и дальнейшему ее использованию в рамках Национального календаря профилактических прививок.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 53—60

Ключевые слова: вакцина полиомиелитная инактивированная (Нидерланды), вакцина «Имовакс Полио», дети, безопасность и иммуногенность, подкожный и внутримышечный способы введения

*I.V.Feldblyum<sup>1</sup>, V.V.Romanenko<sup>2</sup>, M.G.Menshikova<sup>1</sup>,  
I.A.Okuneva<sup>1</sup>, A.E.Makarov<sup>2</sup>, N.V.Isaeva<sup>2</sup>, M.G.Radzivil<sup>3</sup>*

## **COMPARATIVE EVALUATION OF SAFETY AND IMMUNOGENICITY INACTIVATED VACCINE FOR POLYOMIELITIS PREVENTION (NETHERLANDS) AND VACCINE «IMOVAX POLIO» (FRANCE) IN CHILDREN USING TRIPLE IMMUNIZATION**

<sup>1</sup>Perm State Medical University; <sup>2</sup>Ural State Medical University, Ekaterinburg; <sup>3</sup>Limited Liability Corporation «Nanolek», Moscow, Russia

*Aim* is comparative evaluation of the safety and immunogenicity of inactivated poliomyelitis vaccine (IPV) «Bilthoven Biologicals B.V.» (Netherlands) and «Imovax Polio» (France) with subcutaneous and intramuscular modes of administration. *Materials and methods.* In a double-blind, comparative clinical randomized multicenter study, 120 children at the age of 3 months participated as volunteers. They were divided into 4 groups: 1 and 2 groups were given IPV intramuscular (group 1) and subcutaneous (group 2) mode of administration, children of groups 3 and 4 were given the vaccine «Imovax Polio». *Results.* IPV is characterized by a high safety profile and immunogenicity both in subcutaneous and intramuscular modes of administration and it is comparable in its characteristics with the vaccine «Imovax Polio». *Conclusion.* Vaccine IPV (Netherlands) is recommended for registration in the territory of the Russian Federation and its further using in the National Vaccination Schedule.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.3, P. 53—60

Key words: inactivated polio vaccine (Netherlands), «Imovax Polio» vaccine, children, safety and immunogenicity, subcutaneous and intramuscular modes of administration

## ВВЕДЕНИЕ

После успешной ликвидации натуральной оспы 41 сессия ВОЗ в 1988 году поставила задачу глобальной ликвидации полиомиелита на Земном шаре к концу 2000 года [4, 8]. Российская Федерация, как и весь Европейский регион, с 2002 года сохраняет статус «страны, свободной от полиомиелита» благодаря высокому (более 99%) охвату детей вакцинацией в ходе плановых и дополнительных (Национальные дни иммунизации) мероприятий по иммунизации населения [1]. Такие значительные успехи были достигнуты благодаря Глобальной программе ВОЗ по вакцинации от полиомиелита и широкому применению 3-валентной оральной полиомиелитной вакцины (тОПВ) из штаммов Сэбина. Вместе с тем, на заключительном этапе искоренения полиомиелита на первый план вышли две проблемы, связанные с применением тОПВ — это возможность возникновения случаев поствакцинальных осложнений в виде вакциноассоциированного паралитического полиомиелита (ВАПП) и возможность формирования вакцинородственных полиовирусов (ВРПВ) [2, 10]. Все случаи полиомиелита, вызванные ВРПВ, и около 40% ВАПП были связаны в последние годы с вакцинным полиовирусом типа 2 и явились результатом продолжающегося использования тОПВ, так как дикий полиовирус типа 2 был искоренен еще в 1999 году. Страны, внедрившие в схемы вакцинации против полиомиелита инактивированные полиомиелитные вакцины (ИПВ) на вакцинацию и ревакцинацию или на первые вакцинации до получения тОПВ, успешно элиминировали ВАПП [9, 11]. На основании опыта, накопленного в мировой практике, Стратегическая Консультативная Группа Экспертов ВОЗ в 2012 году рекомендовала исключить полиовирус типа 2 из состава тОПВ. Был разработан «Стратегический план ликвидации полиомиелита и осуществления завершающего этапа в 2013 — 2018 гг.», целью которого является полная ликвидация и сдерживание распространения всех диких полиовирусов и полиовирусов вакцинного происхождения [5, 12]. В соответствии с этим планом все страны должны с 2016 года отказаться от использования тОПВ и перейти на применение бивалентной (типы полиовируса 1 и 3) оральной полиомиелитной вакцины (бОПВ), а для создания и поддержания иммунитета к полиовирусу типа 2 внедрить в программы иммунизации как минимум одну дозу трехвалентной ИПВ [5]. Глобальный переход на использование трехвалентной ИПВ в программах плановой иммунизации во всех странах мира, включая Россию, значительно увеличивает потребности в этой вакцине. Необходимое количество доз ИПВ может быть получено либо за счет производства отечественной вакцины, либо за счет использования зарубежных препаратов. Единственный производитель вакцины против полиомиелита на территории России — «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова» выпускает только живые вакцины против полиомиелита. ИПВ для проведения плановой вакцинации детей первого года жизни в РФ традиционно закупаются за рубежом. В России в настоящее время для вакцинации в рамках Национального календаря профилактических прививок используются две зарубежные трехвалентные ИПВ («Имовакс Полио», Санофи Пастер, Франция и «Полиорикс», ГлаксоСмитКляйн, Бельгия). Зарегистрированы также комбинированные вакцины, в состав которых в качестве компонента входит ИПВ: «Тетраксим», «Пентаксим®», «Инфанрикс®-Пента», «Инфанрикс®-Гекса» [3, 6].

Вакцина для профилактики полиомиелита инактивированная производства компании «Билтховен Биолоджикалз Б.В.» (Нидерланды) идентична вакцинам «Имовакс Полио» и «Полиорикс», зарегистрированным в России как по составу, так и количественному содержанию антигенов и вспомогательных веществ. «Билтховен Биолоджикалз Б.В.» (Нидерланды) — научный преемник Голландского института вакцин, одного из первых мировых научных центров, участвовавших в создании вакцин для профилактики полиомиелита — сегодня является одним из четырех мировых производителей ИПВ. Многолетний опыт пострегистрационного применения этой вакцины в странах Европы и Азии в рамках государственных программ вакцинации детей и программ вакцинации ВОЗ (вакцина переqualificирована ВОЗ) и результаты проведенных ранее доклинических и клинических исследований (в том числе и на территории России) позволили инициировать проведение клинических исследований с участием детского контингента с целью регистрации вакцины и в Российской Федерации.

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка безопасности и иммуногенности вакцины для профилактики полиомиелита инактивированной производства компании Билтховен Биолоджикалз Б.В. (Нидерланды) и вакцины «Имовакс Полио» производства Санофи Пастер, (Франция) при трехкратной иммунизации детей по схеме 3 — 4,5 — 6 месяцев при подкожном и внутримышечном способах введения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценку реактогенности, безопасности и иммуногенности вакцины для профилактики полиомиелита инактивированной (далее «Вакцина ИПВ») проводили в условиях двойного слепого сравнительного клинического рандомизированного многоцентрового (Пермская государственная медицинская академия им. Е.А.Вагнера, Детская городская больница № 10 Екатеринбурга) исследования, в котором приняли участие 160 детей (скринированных) в возрасте 3 месяцев + 2 недели. Средний возраст участвующих в исследовании составил  $95,57 \pm 6,19$  дней. В качестве препарата сравнения была использована зарегистрированная в РФ вакцина «Имовакс Полио».

Исследование проводилось в соответствии с этическими нормами и требованиями, регламентированными Хельсинской декларацией и Надлежащей клинической практикой по утвержденному Министерством Здравоохранения Российской Федерации протоколу исследования.

Отбор участников исследования проводился с учетом критериев включения и исключения, изложенных в протоколе исследования.

После предварительного клинико-инструментального и лабораторного скрининга были отобраны 120 детей, удовлетворяющих критериям включения в исследование, которые были рандомизированы в 4 группы. Дети группы наблюдения (1 и 2 группы) были привиты «Вакциной ИПВ» трехкратно по схеме 3 — 4,5 — 6 месяцев: группа 1 ( $n = 30$ ) внутримышечно и группа 2 ( $n=30$ ) подкожно. Дети группы сравнения (3 и 4 группы) получали вакцину «Имовакс Полио» по той же схеме: группа 3 ( $n=30$ ) внутримышечно и группа 4 ( $n=30$ ) подкожно. Вакцины вводили внутримышечно или подкожно (в зависимости от группы) в передненаружную область бедра трехкратно в дозе 0,5 мл. Одновременно с исследуемым препаратом или препаратом сравнения для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша детям вводили вакцину «Инфанрикс» производства «ГлаксoСмитКляйн» (Бельгия) трехкратно вну-

тримышечно в передненаружную область другого бедра (левого или правого) в дозе 0,5 мл в разных одноразовых шприцах и одноразовыми иглами. По демографическим характеристикам (возраст, рост, вес) и по витальным показателям (артериальное давление, частота дыхательных движений, частота сердечных сокращений, температура) дети всех 4 групп были сопоставимы ( $p > 0,05$ ). Из 120 детей, включенных в исследование, 116 завершили исследование полностью. В ходе исследования были исключены 4 детей: 2 по причине отклонения от протокола и 2 по причине потери контакта с родителями.

Реактогенность и безопасность сравниваемых вакцин оценивали по наличию местных и системных поствакцинальных реакций, степени их выраженности и продолжительности на основе активного наблюдения за вакцинированными детьми и по данным записей в дневниках самонаблюдения, по результатам лабораторных исследований крови и мочи и по частоте возникновения нежелательных явлений, связанных с введением препарата. Активное наблюдение за привитыми детьми проводили в течение первых 30 минут, в течение 3 суток после каждой вакцинации и на 28 сутки после третьей вакцинации. Кроме того, данные о состоянии здоровья ребенка врач-исследователь получали посредством телефонных звонков через 2 часа после каждой вакцинации и ежедневно — с 4 по 7 сутки поствакцинального периода. На 3 день после каждой иммунизации родители получали на руки дневник самонаблюдения, в который вносили данные о состоянии здоровья ребенка в соответствии с указанными в дневнике самонаблюдения критериями. Местные реакции оценивали по изменению активности конечности со стороны вакцинации, болезненности при пальпации в месте инъекции, по увеличению регионарных лимфатических узлов и по величине гиперемии и инфильтрата в месте введения препарата. Величину гиперемии и инфильтрата оценивали по 4-балльной шкале: слабой реакцией считали гиперемию диаметром менее 50 мм или инфильтрат в месте инъекции менее 25 мм, средней — гиперемию диаметром более 50 мм или инфильтрат от 26 до 50 мм, сильной — инфильтрат более 50 мм в диаметре. Системные реакции оценивали по степени повышения температуры тела и выраженности симптомов интоксикации (сонливость, плаксивость, раздражительность, головная боль, головокружение, отсутствие аппетита, тошнота, рвота, диарея, мышечная боль, артралгия, аллергические реакции и др.): слабой реакцией считали повышение температуры тела до  $37,5^{\circ}\text{C}$  и наличие слабовыраженных симптомов интоксикации, средней — температуру от  $37,6$  до  $38,5^{\circ}\text{C}$  с умеренно выраженными симптомами интоксикации и сильной — температуру более  $38,6^{\circ}\text{C}$  с ярко выраженными симптомами интоксикации. Результаты лабораторных исследований оценивали в динамике по показателям общеклинического и биохимического анализов крови, уровню в сыворотке крови общего IgE и общего анализа мочи (перед первой вакцинацией и на 28 день после третьей вакцинации) с расчетом средних значений.

Иммуногенность вакцин оценивали путем определения в сыворотках крови привитых уровня IgG ко всем трем типам вируса полиомиелита до иммунизации (определение исходного уровня антител) и через 28 дней после третьей вакцинации с расчетом средней геометрической титра (СГТ). Антитела к вирусам полиомиелита в сыворотках крови привитых определяли в реакции микронеutralизации [7].

Статистический анализ проведен с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. При анализе полученных результа-



тов определяли средние величины (арифметические и геометрические) и стандартное отклонение. Развитие нежелательных явлений и других признаков в группах (частотный анализ) сравнивали с помощью углового преобразования критерия Фишера ( $\phi^*$ эмп). Статистическую значимость изменений лабораторных показателей оценивали с помощью двустороннего критерия Стьюдента при уровне значимости 0,05. Сравнение выраженности иммунного ответа (по показателям СГТ) между группами проводили с помощью непараметрического теста Манна-Уитни. Достоверность различий по критерию Манна-Уитни определяли при  $p < 0,05$ . Частоты достижения ответа на вакцинацию не считывали в связи со 100 % ответом привитых на введение препаратов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поствакцинальные реакции (местные и системные) после трехкратной иммунизации «Вакциной ИПВ» в сочетании с вакциной «Инфанрикс» были зарегистрированы у 10 детей, привитых внутримышечно ( $33,3 \pm 8,6\%$ ), и у 8 детей, привитых подкожно ( $26,7 \pm 8,1\%$ ), после вакцинации «Имовакс Полио» в сочетании с вакциной «Инфанрикс» — у 7 детей ( $23,3 \pm 7,7\%$ ) и 9 детей ( $30,0 \pm 8,6\%$ ) соответственно ( $p > 0,05$ ). Местные реакции у детей как опытной, так и контрольной групп проявлялись в виде гиперемии, инфильтрата и боли в месте инъекции препарата. Большинство реакций были легкой степени выраженности. Только у одного ребенка из группы 3 после второй вакцинации отмечалась гиперемия средней степени выраженности. Все реакции, как правило, купировались самостоятельно, без применения медикаментозной терапии через 2 — 3 дня после возникновения. Как показали результаты анализа, все местные реакции были зарегистрированы в области введения вакцины «Инфанрикс».

Системные реакции у детей групп наблюдения и групп сравнения были представлены лихорадкой, беспокойством, раздражительностью, снижением аппетита, сонливостью, кашлем, короткими приступами плача. Большинство системных реакций были легкой степени выраженности. Исключение составили 2 ребенка из 1 группы, у которых отмечались лихорадка и кожная сыпь средней степени выраженности и 2 ребенка из 4 группы, у которых наблюдались лихорадка, беспокойство и раздражительность средней степени выраженности. Все системные реакции продолжались не более трех-четырех дней, за исключением ребенка из группы 4, у которого отмечалась раздражительность в течение 5 суток. Проследить взаимосвязь системных поствакцинальных реакций с каждой вакциной не представлялось возможным, так как введение полиомиелитных вакцин и вакцины «Инфанрикс» было одновременным. Учитывая слабую степень выраженности реакций и их кратковременность, идентификация системных реакций по препаратам не несет практической значимости.

Сравнительная оценка результатов общего (клинического) анализа крови в группах привитых «Вакциной ИПВ» и «Имовакс Полио» в динамике наблюдения выявила, что большинство показателей общего анализа крови достоверных различий в динамике наблюдения не имели.

Сравнительная оценка результатов биохимического анализа крови выявила статистически достоверные изменения (в пределах границ нормы) фоновых показателей общего белка, общего билирубина, мочевины и глюкозы и данных, полученных на 28 сутки после третьей вакцинации как в группах привитых «Вакциной ИПВ», так и вакциной «Имовакс Полио». У детей всех четырех

групп наблюдались достоверное увеличение показателей общего белка и сывороточного IgE и достоверное снижение уровня общего билирубина и глюкозы ( $p \leq 0,05$ ). У детей 2, 3 и 4 групп на 28 сутки после третьей вакцинации отмечено достоверное увеличение уровня мочевины ( $p \leq 0,05$ ). Достоверного изменения фоновых показателей АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, креатинина и СРБ в динамике наблюдения за привитыми детьми не выявлено. Все средние величины данных показателей находились в пределах нормальных значений. Выявленные достоверно значимые изменения в показателях сывороточного IgE в динамике обусловлены экологическими причинами в г. Пермь и не связаны с влиянием вакцинации. Аллергизирующих свойств у изучаемых препаратов как при подкожном, так и при внутримышечном путях введения не выявлено.

В общем анализе мочи у детей как групп наблюдения, так и групп сравнения показатели плотности и реакции (рН) мочи, а также число лейкоцитов, плоского эпителия и эритроцитов находились в пределах нормы и не менялись в динамике наблюдения. Цвет мочи колебался от соломенно-желтого до желтого, мутность мочи определялась от прозрачной до слабо мутной, что расценено как вариант нормы. Глюкоза, кетоны, желчные пигменты, нитриты, цилиндры, соли не были выявлены ни у одного добровольца на всех сроках забора мочи. Клинических проявлений нарушения функционирования мочевыводящей системы не отмечалось ни у одного ребенка.

Изменения показателей клинического и биохимического анализов крови, регистрируемые в динамике наблюдения, расценены как клинически незначимые и не зависящие от вакцинации, что свидетельствует о высоком профиле безопасности «Вакцины ИПВ» и «Имовакс Полио».

Всего за весь период поствакцинального наблюдения за детьми объективно (на основании осмотров врача-исследователя) и субъективно (на основании Дневников самонаблюдения) зарегистрировано 14 нежелательных явлений (НЯ) у детей всех 4 исследуемых групп (по 3 — 4 НЯ в каждой группе): в 1 группе — 3 НЯ слабой степени выраженности (в виде ОРВИ у двух детей и ринита у одного ребенка); во 2 группе — 4 НЯ слабой степени выраженности (ОРВИ у трех детей и у одного ребенка ринит); в 3 группе — 3 НЯ слабой степени выраженности (ОРВИ у двух детей и ринит у одного ребенка) и в 4 группе — 4 НЯ (ОРВИ слабой и средней степени выраженности у двух детей и у двух детей ринит и задержка стула слабой степени выраженности).

Различий по частоте или выраженности нежелательных явлений между группами, иммунизированными «Вакциной ИПВ» и вакциной «Имовакс Полио» выявлено не было. Все эти нежелательные явления в виде ОРВИ, ринита и задержки стула были расценены как не связанные с вакцинацией, поскольку они не описаны в инструкциях по применению исследуемых вакцин.

**Результаты оценки иммуногенности исследуемых вакцин по показателю (СГТ) до и после иммунизации**

Группа	Тип вируса	СГТ	
		До V1	Через 28 дней после V3
Группа 1 («Вакцина ИПВ», в/м), n=30, M±m	1	9,33	212,80
	2	10,96	207,94
	3	9,51	189,58
Группа 2 («Вакцина ИПВ», п/к), n=29, M±m	1	11,58	192,17
	2	10,89	232,66
	3	10,37	187,63
Группа 3 («Имовакс Полио», в/м), n=29, M±m	1	10,64	134,27
	2	10,96	154,97
	3	10,08	122,03
Группа 4 («Имовакс Полио», п/к), n=28, M±m	1	9,07	168,06
	2	11,76	181,02
	3	8,00	176,59

двух вакцин как возможные проявления реакции организма на вакцинацию и не представлены как ожидаемые реакции на введение инактивированных вакцин для профилактики полиомиелита, Полученные результаты свидетельствуют о хорошей переносимости и высоком профиле безопасности «Вакцины ИПВ» и «Имовакс Полио» независимо от способа введения препаратов.

Установлена высокая иммуногенность «Вакцины ИПВ» ко всем трем типам вируса полиомиелита после трехкратной иммунизации детей в возрасте 3 месяцев, не уступавшая по показателям СГТ вакцине «Имовакс Полио» (табл.).

У всех детей, прошедших трехкратный курс вакцинации против полиомиелита исследуемой вакциной и вакциной сравнения, отмечался защитный титр антител ко всем типам вируса — 1:8 и более. Результаты статистического межгруппового сравнения величин титров антител к вирусам полиомиелита у детей показали отсутствие статистически значимых различий между группами как фоновых значений СГТ до иммунизации, так и показателей СГТ на 28 сутки после третьей вакцинации ( $p > 0,05$ ).

Отсутствие статистически значимых различий по величине СГТ между группами свидетельствовало о сопоставимости иммунологической эффективности изучаемой «Вакцины ИПВ» и зарегистрированного в России аналога — «Имовакс Полио», а также внутримышечного и подкожного путей введения вакцин. Результаты оценки иммуногенности, полученные в настоящем исследовании, позволяют говорить о выраженных защитных свойствах «Вакцины ИПВ» по отношению к диким вирусам полиомиелита, циркулирующим в популяции людей. Способность индуцировать гуморальный иммунный ответ у вакцинированных изучаемой вакциной сопоставима с препаратом сравнения вакциной «Имовакс Полио» и не зависит от способа введения. Таким образом, данные, полученные в исследовании, подтверждают безопасность и высокую иммунологическую эффективность принятой схемы вакцинации препарата и позволяют рекомендовать к регистрации вакцину для профилактики полиомиелита инактивированную, производства компании Билтховен Биолоджикалз Б.В. (Нидерланды) на территории Российской Федерации и дальнейшее ее использование в рамках Национального календаря профилактических прививок.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов С.И., Шевырева М.П., Лазикова Г.В., Ясинский А.А., Садовникова В.Н., Воронцова Т.В. Национальный план действий по поддержанию свободного от полиомиелита статуса Российской Федерации. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2004, 5: 4-6.
2. Иванова О.Е. Вакциноассоциированный паралитический полиомиелит. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2006, 5 (30): 42-48.
3. Таточенко В.К., Озерецковский Н.А., Федоров А.Н. Иммунопрофилактика-2014. Педиатр, 2014.
4. Фетисов Н.Н. Глобальная инициатива по ликвидации полиомиелита. Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2005, 2: 59-60.
5. Харит С.М., Покровский В.С., Рулева А.А., Фридман И.В. Программа эрадикации полиомиелита ВОЗ: проблемы и решения. Педиатрическая фармакология. 2016, 13 (3): 289-298.
6. Чумаков К.М. Вакцины против полиомиелита: прошлое, настоящее и будущее. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 4 (53): 68-73.
7. МУК 4.2.2410-08 «Организация и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП)».

8. Asghar H., Diop O.M., Weldegebriel G. et al. Environmental surveillance for polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *J. Infect. Dis.* 2014, 210 (1): 294-303.
9. Aylward R.B., Sutter R.W., Cochi S.T. et al. Risk Management in a Polio-Free World. *Risk Analysis.* 2006, 26 (6): 1441-1448.
10. Burns C.C., Dior O.M., Sutter R.W. et al. Vaccine-Derived Polioviruses. *J. Infect. Dis.* 2014, 210: S283-293.
11. Cochi S.L., Freeman A., Guirguis S. et al. Global polio eradication initiative: Lessons learned and legacy. *J. Infect. Dis.* 2014, 210 (1): S540-546.
12. Shrivastava S.R., Shrivastava P.S., Ramasamy J. Recommended Strategies to Move Closer Toward the Global Eradication of Polio: International Health Regulations. *Int. J. Preventive Medicine* 2016, 7-17.

Поступила 04.12.17

Контактная информация: Фельдблюм Ирина Викторовна, д.м.н., проф.,  
614990, Пермь, ул. Петропавловская, 26, р.т. (342)218-16-68

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*И.В.Мокроусов<sup>1</sup>, О.А.Пасечник<sup>2</sup>, А.А.Вязовая<sup>1</sup>,  
А.И.Блох<sup>2</sup>, Е.Н.Черняева<sup>3</sup>, В.Л.Стасенко<sup>2</sup>*

## **О ВАЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЭВОЛЮЦИОННО НАДЕЖНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ШТАММОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ГЕНЕТИ- ЧЕСКОГО СЕМЕЙСТВА LAM**

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Омский государственный медицинский университет; <sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет

*Цель.* Клиническая и эпидемиологическая значимость генетического семейства LAM (Latin American Mediterranean) *Mycobacterium tuberculosis* определяет важность корректной детекции штаммов LAM. В настоящем исследовании комплекс молекулярных методов был использован для анализа штаммов LAM в популяции *M. tuberculosis* в Омской области Западной Сибири, для которой характерен высокий уровень заболеваемости резистентным туберкулезом. *Материалы и методы.* Изученная коллекция включала 207 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных в Омской области в 2015 — 2016 гг. Методы исследования включали сполиготипирование, анализ полиморфизма Rv0129c 309G>A, специфического для семейства LAM, полногеномное секвенирование с последующим биоинформационным анализом. *Результаты.* В результате сравнения полученных профилей CRISPR-сполиготипирования с международной базой данных SITVIT\_WEB 11 штаммов (5,3%) было отнесено к генотипу LAM. В то же время, в результате анализа филогенетического SNP в гене Rv0129c к генотипу LAM было отнесено 30 изолятов (14,5%). Для четырех изолятов, представляющих разные типы сполигопрофилей, было проведено полногеномное секвенирование. *Заключение.* Полученные результаты показывают ограниченность правил принятия решения, имплементированных в SITVIT\_WEB для определения семейства LAM для штаммов с протяженными блоками делетированных спейсеров в локусе CRISPR или усеченными профилями сполготипирования. Для детекции штаммов LAM может быть рекомендован подход, включающий (1) первичное сполиготипирование, сравнение с SITVIT\_WEB и обязательное уточнение интерпретации профилей в свете экспертного знания; (2) детекцию LAM-специфического SNP (например, с помощью PCR-RFLP).

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 60—66

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, эволюция, полногеномное секвенирование, сполиготипирование, генотип LAM (Latin-American Mediterranean)

I.V.Mokrousov<sup>1</sup>, O.A.Pasechnik<sup>2</sup>, A.A.Vyazovaya<sup>1</sup>,  
A.I.Blokh<sup>2</sup>, E.N.Chernyaeva<sup>3</sup>, V.L.Stasenko<sup>2</sup>

## ON IMPORTANCE OF USING EVOLUTIONARILY ROBUST MARKERS FOR DETECTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS OF LAM GENETIC FAMILY

<sup>1</sup>Pasteur St. Petersburg State Institute of Epidemiology and Microbiology; <sup>2</sup>Omsk State Medical University; <sup>3</sup>St. Petersburg State University, Russia

*Aim.* The clinical and epidemiological significance of the Latin American Mediterranean (LAM) genetic family of *Mycobacterium tuberculosis* determines the importance of the correct detection of LAM strains. In this study, a complex of molecular methods was used to analyze LAM strains in the population of *M. tuberculosis* in the Omsk region of Western Siberia, which is characterized by a high incidence of drug-resistant tuberculosis. *Materials and methods.* The collection included 207 strains of *M. tuberculosis*, isolated in the Omsk region in 2015 — 2016. The strains were subjected to spoligotyping, analysis of LAM-specific SNP Rv0129c 309G>A, and whole genome sequencing followed by bioinformatics analysis. *Results.* A comparison of the obtained CRISPR-spoligotyping profiles with the international SITVIT\_WEB database, assigned 11 strains (5.3%) to the LAM genotype. At the same time, based on analysis of phylogenetic SNP in the gene Rv0129c, 30 isolates (14.5%) were assigned to LAM. Whole genome sequencing was performed for 4 isolates with different spoligotyping profiles. *Conclusion.* The results of this study show the limited utility of the decision rules implemented in SITVIT\_WEB to define LAM family for isolates with long deleted blocks of spacers or abridged spoligoprofiles. The following approach can be recommended for detection of LAM isolates (1) primary spoligotyping, comparison with SITVIT\_WEB, and mandatory interpretation in the light of expert knowledge; (2) detection of LAM-specific SNP (e.g., using PCR-RFLP).

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 60—66

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, evolution, whole genome sequencing, spoligotyping, LAM (Latin-American Mediterranean) genotype

## ВВЕДЕНИЕ

Характерной особенностью вида *Mycobacterium tuberculosis* является строго клональная структура популяции как следствие отсутствия горизонтального генетического переноса. Помимо общебиологического смысла такого хода эволюции (обсуждение которого выходит за рамки данного сообщения), этот факт имеет и прикладное, клиническое значение применительно к реализации региональных программ борьбы с туберкулезом. В настоящее время общепризнано, что отдельные генотипы (генетические семейства, сублинии, клональные кластеры) *M. tuberculosis* отмечены повышенной вирулентностью, трансмиссивностью, или способностью быстрого развития устойчивости к противотуберкулезным препаратам. Структуру популяции возбудителя туберкулеза в России и других странах постсоветского пространства часто воспринимают через призму доминирования резистентных штаммов генетического семейства Beijing. В целом обоснованный, такой подход упрощает реальность как в количественном, так и в качественном аспектах. В том, что касается собственно структуры популяции, штаммы генетического семейства LAM (Latin American Mediterranean) также являются значимым компонентом популяции *M. tuberculosis*, особенно в Европейской части бывшего СССР, и составляют до 30 — 40% локальных популяций, например, в центральной России и Белоруссии [7, 15]. Более того, рассматривая патобиологические

особенности штаммов, нужно учитывать, что эмерджентные, потенциально или актуально эпидемические геноварианты отмечены не только среди представителей семейства Beijing, но также и LAM и еще одного (недостаточно оцененного) генотипа Ural.

В свою очередь, это подчеркивает необходимость применения четких, эволюционно надежных молекулярных маркеров для корректного определения таких генетических групп, имеющих клиническую и/или эпидемиологическую значимость. Эволюционно значимые геногруппы могут быть выявлены: (1) на основе детекции валидированных специфических SNP (single nucleotide polymorphism) или геномных делеций, представляющих уникальные и однонаправленные эволюционные события; (2) посредством филогенетического анализа (кластеризации) на основе множества независимых и нейтральных эволюционных маркеров, к которым могут быть отнесены полногеномные SNP или локусы VNTR (variable number of tandem repeats).

Генетическое семейство LAM *M. tuberculosis* впервые было описано в 2001 году в результате филогенетического анализа относительно глобальной коллекции сполиготипов [14]. Прототипным сполготипом LAM является SIT42, в профиле которого отсутствуют сигналы 21-24 и 33-36. Последующее применение эволюционно надежных маркеров подтвердило реальность LAM и позволило более адекватно определить его филогенетические границы. Также можно отметить, что LAM входит в крупную Евро-Американскую линию, хотя и определенную на основании SNP-анализа, но также имеющую характерный маркер на основании сполиготипирования, а именно отсутствие сигналов 33-36.

В наших предыдущих работах на коллекциях штаммов из различных регионов бывшего СССР (Северо-Запад РФ, Белоруссия, Казахстан) и Китая были валидированы ранее описанные специфические SNP в генах Rv0129c и Rv3062 для детекции штаммов LAM [8 — 11]. В настоящем исследовании мы применили комплекс молекулярных маркеров для анализа штаммов LAM в популяции *M. tuberculosis* в Омской области Западной Сибири, для которой характерен высокий уровень заболеваемости резистентным туберкулезом [1, 2], и расширили их верификацию с использованием полногеномного секвенирования следующего поколения: WGS (whole genome sequencing)/NGS (next generation sequencing).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы *M. tuberculosis* были выделены от больных туберкулезом легких, постоянно проживающих в Омской области. ДНК выделяли стандартным методом с использованием SDS, протеиназы K и цетилтриметиламмонийбромида для клеточного лизиса.

Сполиготипирование проводили согласно стандартному протоколу с использованием мембраны с иммобилизованными олигонуклеотидами на 43 спейсера локуса CRISPR *M. tuberculosis*, изготовленной в лаборатории молекулярной микробиологии НИИЭМ им. Пастера. Профили сполиготипирования сравнивали с международной базой данных SITVIT\_WEB ([http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/)).

Анализ однонуклеотидного полиморфизма в гене Rv0129c 309G>A, специфического для семейства LAM, проводили методом ПЦР-ПДРФ [11].

Полногеномное секвенирование проводили с использованием платформы MiSeq (Illumina), используя реагенты для получения парных прочтений

длиной по 300 нуклеотидов. Для подготовки ДНК-библиотек для секвенирования использовали ультразвуковую фрагментацию ДНК и применяли набор NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs). Первичную обработку коротких нуклеотидных прочтений (fastq файлов) проводили с использованием программы Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) для удаления адаптеров и нуклеотидных прочтений низкого качества. Полученные файлы использовали для выравнивания на референсный геном *M. tuberculosis* H37Rv (NC\_000962.3) для дальнейшего поиска геномных вариантов. Нуклеотидные прочтения выравнивали на референсный геном с использованием инструмента bowtie2, после чего для идентификации и аннотации нуклеотидных полиморфизмов использовали утилиты SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net>). Онлайн-ресурсы Phyresse (<https://bioinf.fz-borstel.de/mchips/phyresse/>), TGS-TB (<https://gph.niid.go.jp/tgs-tb/>) и PhyTB (<http://pathogenseq.lshtm.ac.uk/phytblive/index.php>) использовали для дополнительной классификации секвенированных геномов.

Дополнительно штаммы LAM были типированы на наличие специфической инсерции IS6110 в определенной позиции в гене *plcA* (позиция 2630571 в геноме штамма H37Rv, номер доступа 00962.3 в GenBank), которая является маркером подгруппы внутри LAM, ранее названной LAM-RUS [6].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Изученная коллекция включала 207 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных в Омской области в 2015-2016 гг. В результате сравнения полученных профилей сполиготипирования с базой данных SITVIT\_WEB 11 штаммов (5,3%) было отнесено к генотипу LAM. В то же время, в результате анализа филогенетического SNP в гене *Rv0129c* к генотипу LAM было отнесено 30 изолятов (14,5%) (табл.). Дополнительно все 30 изолятов LAM были определены как LAM-RUS.

Для четырех изолятов, представляющих разные типы профилей внутри изученной выборки LAM, проведено полногеномное секвенирование с использованием технологии следующего поколения. Таким образом были изучены: штамм SIT42 (классический прототипный профиль для семейства LAM), штамм SIT254 с протяженным блоком делетированных спейсеров, штаммы SIT1451 и SIT\_new с усеченными профилями гибридизации при сполиготипировании (табл.). Сравнение с базой сполиготипов SITVIT\_WEB корректно отнесло первый из штаммов (SIT42) к LAM, в то время как штамм SIT254 был отнесен к семейству T5-RUS1, а для двух последних штаммов их филогенетический статус в SITVIT\_WEB определен не был.

Для указанных 4 штаммов проведено полногеномное секвенирование и полученные файлы fastq были загружены в нуклеотидный архив NCBI, проект PRJNA401339. В результате выравнивания на референсный геном *M. tuberculosis* H37Rv для каждого штамма получен перечень геномных вариантов, включающий однонуклеотидные полиморфизмы и короткие инсерции и делеции (vcf файлы). Файлы fastq и vcf были проанализированы с использованием онлайн-ресурсов Phyresse, PhyTB и TGS-TB, с помощью которых была подтверждена принадлежность всех 4 штаммов к LAM. Кроме того, следует отметить в изученной омской выборке штамм с профилем SIT264 с протяженным блоком из 12 делетированных сигналов, отнесенный к семейству T1 в базе SITVIT\_WEB. Однако ранее нами была показана принадлежность штам-





*M. tuberculosis* не является исключением. Подход на основе WGS/NGS позволяет выявить незначительные различия близкородственных геновариантов и успешно применяется как для филогеномных, так и для молекулярно-эпидемиологических исследований. Противоположным с точки зрения дискриминирующей способности является классический метод сполиготипирования. Практически единственным достоинством метода является его техническая простота и, следовательно, возможность быстрого анализа больших коллекций, а также наличие больших баз данных, собранных в результате 20 лет исследований. Прежде всего следует отметить глобальную базу данных SITVIT\_WEB, созданную в Институте Пастера Гваделупы [5]. Последняя (все еще неопубликованная) версия этой базы (SITVIT2) содержит данные по более чем 110 000 изолятам, согласно диссертации D. Couvin [4]. Известными и серьезными ограничениями метода сполиготипирования являются как универсальные для всех бактерий (единый локус CRISPR, следовательно, не независимая эволюция спейсеров и т.о. неадекватность филогенетических построений на основе сполиготипов), так и специфические для *M. tuberculosis* (возможная гомоплазия как результат конвергентной эволюции, неопределенность интерпретации протяженных блоков делетированных сигналов). Глобальной проблемой анализа сполигопрофилей является и догматическое, некритическое восприятие крупных электронных ресурсов и баз данных.

Определение семейства LAM *M. tuberculosis* на основании сполиготипирования (в особенности профилей с протяженными блоками делетированных сигналов, например, SIT254, SIT264, SIT1451) имеет два существенных недостатка, как показано в настоящем и ряде предыдущих исследований в странах бывшего СССР. Во-первых, наличие усеченных профилей сполиготипирования (SIT1451) или профилей с длинными блоками делетированных сигналов (SIT264, SIT254) критически уменьшает количество признаков, пригодных для анализа, и не позволяет делать вывод о генотипе (семействе) штамма даже если алгоритм, применяемый в SITVIT\_WEB, и позволяет (хотя и ошибочно) отнести такой штамм, например SIT254 или SIT264, к какой-либо подгруппе внутри семейства T (прежде всего к т.н. T5-RUS1, куда отнесены эти и близкие им производные сполиготипы в SITVIT\_WEB). Во-вторых, сполиготип SIT803 представляет пример гомоплазии сполиготипов как результат конвергентной эволюции локуса CRISPR *M. tuberculosis*. В частности, как показано в данном исследовании (на основании полногеномного анализа) и в опубликованных работах по Северо-Западу России, Казахстану и Грузии (на основании анализа LAM-специфических SNP и мультилокусного VNTR-анализа) [11 — 13], штаммы SIT803 определенно относятся к семейству LAM. В то же время, анализ китайских штаммов с таким сполиготипом не выявил у них LAM-специфического SNP [9]. На построенной нами дендрограмме профилей 24-MIRU-VNTR 186 референс-штаммов *M. tuberculosis* разных генотипов (MIRU-VNTRplus.org) и 259 типов глобальной коллекции LAM [10] китайские штаммы SIT803 занимали положение далеко за пределами ветви LAM и располагались на периферии ветви семейства S (древо не показано). Все это подчеркивает необходимость осторожности в интерпретации сполигопрофилей с небольшим количеством сигналов гибридизации.

В то же время, даже в настоящее время все более широкого применения полногеномного анализа полезно сопоставлять новые данные со все еще применяемыми старыми маркерами и схемами. Не все лаборатории, особенно в странах с ограниченными ресурсами, могут использовать NGS в качестве

рутинного подхода. Конкретно для детекции штаммов LAM может быть рекомендован подход, включающий (1) первичное сполиготипирование, сравнение с SITVIT\_WEB и обязательное уточнение интерпретации профилей в свете экспертного знания; (2) детекцию LAM-специфического SNP (например, с помощью PCR-RFLP).

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-00367 «Популяция Mycobacterium tuberculosis в регионе Западной Сибири: актуальная молекулярная эпидемиология в контексте макроэволюционной реконструкции».*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Пасечник О.А., Дымова М.А., Стасенко В.Л., Татаринцева М.П., Колесникова Л.П., Ляпина Е.С. Генетическое разнообразие лекарственно-устойчивых штаммов Mycobacterium tuberculosis в Омской области. Туберкулез и болезни легких. 2017, 7: 33-39.
2. Пасечник О.А., Руднева С.Н., Татаринцева М.П. Динамика эпидемиологических показателей по туберкулезу в Омской области. Туберкулез и болезни легких. 2015, 5: 139-140.
3. Barbosa C.B., Lazzarini L.C., Elias A.R. et al. Tuberculosis caused by RDRio Mycobacterium tuberculosis is not associated with differential clinical features. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2012, 16: 1377-1382.
4. Couvin D. Development and management of a global database of circulating genotypes of tubercle bacilli: Molecular methods and web-based tools for mapping, understanding and controlling the epidemic. PhD thesis, Université des Antilles et de la Guyane. Pointe-a-Pitre, Guadeloupe, 2014.
5. Demay C., Liens B., Burguière T. et al. SITVITWEB — a publicly available international multimer database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology. Infect. Genet. Evol. 2012, 12 (4): 755-766.
6. Dubiley S., Kirillov E., Ignatova A. et al. Molecular characteristics of the Mycobacterium tuberculosis LAM-RUS family prevalent in Central Russia. J. Clin. Microbiol. 2007, 45 (12): 4036-4038.
7. Ignatova A., Dubiley S., Stepanshina V. et al. Predominance of multi-drug-resistant LAM and Beijing family strains among Mycobacterium tuberculosis isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia. J. Med. Microbiol. 2006, 55 (10): 1413-1418.
8. Mokrousov I., Chernyaeva E., Vyazovaya A. et al. Next generation sequencing of Mycobacterium tuberculosis. Emerg. Infect. Dis. 2016, 22 (6): 1127-1129.
9. Mokrousov I., Jiao W.W., Wan K. et al. Stranger in a strange land: Ibero-American strain of Mycobacterium tuberculosis in Tibet, China. Infect. Genet. Evol. 2014, 26: 323-326.
10. Mokrousov I., Vyazovaya A., Iwamoto T. et al. Latin-American-Mediterranean lineage of Mycobacterium tuberculosis: Human traces across pathogen's phylogeography. Mol. Phylogenet. Evol. 2016, 99: 133-143.
11. Mokrousov I., Vyazovaya A., Narvskaya O. Mycobacterium tuberculosis Latin-American Mediterranean family and its sublineages: in the light of evolutionary robust markers. J. Bacteriol. 2014, 196 (10): 1833-1841.
12. Niemann S., Diel R., Khechinashvili G. et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage favors the spread of multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia. J. Clin. Microbiol. 2010, 48 (10): 3544-3550.
13. Skiba Y., Mokrousov I., Ismagulova G. et al. Molecular snapshot of Mycobacterium tuberculosis population in Kazakhstan: a country-wide study. Tuberculosis. 2015, 95 (5): 538-546.
14. Sola C., Filliol I., Legrand E. et al. Mycobacterium tuberculosis phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. J. Mol. Evol. 2001, 53 (6): 680-689.
15. Zalutskaya A., Wijkander M., Jureen P. et al. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis caused by the Beijing genotype and a specific T1 genotype clone (SIT No. 266) is widely transmitted in Minsk. Int. J. Mycobacteriol. 2013, 2: 194-198.

*Поступила 25.10.17*

Контактная информация: Мокроусов Игорь Владиславович, д.б.н., 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812)233-21-49

Т.П.Оспельникова<sup>1,2</sup>, О.В.Морозова<sup>2</sup>, С.А.Андреева<sup>1</sup>, Е.И.Исаева<sup>2</sup>, Л.В.Колодяжная<sup>1,2</sup>,  
Л.В.Колобухина<sup>2</sup>, Л.Н.Меркулова<sup>2</sup>, Е.И.Бурцева<sup>2</sup>, Е.А.Мукашева<sup>2</sup>, Ф.И.Ершов<sup>2</sup>

## ОСОБЕННОСТИ БИОМАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ГРИППЕ

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

*Цель.* Анализ биомаркеров воспаления с использованием обратной транскрипции с ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) и мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа xMAP на магнитных микроферах при гриппе. *Материалы и методы.* Анализ смывов носоглотки, лимфоцитов и сывороток крови 10 больных гриппом и 10 доноров проводили на 1–2 сутки заболевания посредством ОТ-ПЦР-РВ и xMAP с набором «37-plex» (BioRad). *Результаты.* В 4 смывах больных выявлен вирус гриппа А, в 6 — вирус гриппа В без смешанных инфекций с другими респираторными вирусами. Анализ интерферонов показал активацию экспрессии гена IFN $\alpha$  в лимфоцитах пациентов, а частоты детекции и концентрации РНК IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  и IFN $\lambda$  у больных и здоровых были сходными. Среди 37 биомаркеров воспаления выявлено повышенное содержание 7 белков, включая IFN $\alpha$ 2, цитокины семейства TNF (APRIL и BAFF), рецепторы sTNF-R1 и sTNF-R2, белок остеопонтин и интерлейкин IL10. Концентрации комплекса гликопротеина 130 с растворимым рецептором IL6 gp130/sIL-6R $\beta$  и металлопротеиназы MMP-1 были пониженными у больных гриппом. Коэффициент поляризации КП=[IL10]/[IFN $\gamma$ ]=0,53 при гриппе показал Th1 поляризацию иммунитета. *Заключение.* На ранней стадии заболевания гриппом показана активация экспрессии гена IFN $\alpha$ , индукция цитокинов семейства TNF (APRIL и BAFF) и их рецепторов (sTNF-R1 и sTNF-R2), а также остеопонтин, ингибирование рецептора gp130/sIL-6R $\beta$  и металлопротеазы MMP-1. Th1 иммунитет с регуляцией IL10 обеспечил восстановление пациентов без осложнений.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 67–73

Ключевые слова: грипп, цитокины, ОТ-ПЦР в реальном времени, мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ xMAP, коэффициент поляризации иммунного ответа

Т.П.Оспельникова<sup>1,2</sup>, О.В.Морозова<sup>2</sup>, С.А.Андреева<sup>1</sup>, Е.И.Исаева<sup>2</sup>, Л.В.Колодяжная<sup>1,2</sup>,  
Л.В.Колобухина<sup>2</sup>, Л.Н.Меркулова<sup>2</sup>, Е.И.Бурцева<sup>2</sup>, Е.А.Мукашева<sup>2</sup>, Ф.И.Ершов<sup>2</sup>

## INFLUENZA INFLAMMATION BIOMARKERS FEATURES

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

*Aim.* Analysis of inflammation biomarkers using reverse transcription with real time PCR (RT-PCR-RT) and multiplex immunofluorescent analysis xMAP with magnetic beads for the influenza infection. *Materials and methods.* Analysis of nasopharyngeal swabs, lymphocytes and blood sera of 10 patients with influenza and 10 donors was performed during the first 2 days of the disease by means of RT-PCR-RT and xMAP using the kit «37-plex» (BioRad). *Results.* The influenza virus A was revealed in 4 samples, the influenza virus B — in 6 swabs without mixed infections with other respiratory viruses. Analysis of the interferons (IFN) showed IFN $\alpha$  gene expression activation in patients' lymphocytes but both the detection rate and the concentrations of IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  and IFN $\lambda$  RNA were similar for patients and healthy donors. Among 37 inflammation biomarkers the concentrations of 7 proteins were enhanced including IFN $\alpha$ 2, cytokines of TNF family (APRIL and BAFF), their soluble receptors sTNF-R1 and sTNF-R2, protein osteopontin and IL10. The concentrations of the complex of glycoprotein gp130 with the soluble receptor IL6 gp130/sIL-6R $\beta$  and the matrix metalloprotease MMP-1 were reduced in patients' sera. The polarization coefficient PI=[IL10]/[IFN $\gamma$ ]=0.53 for influenza samples suggested Th1 immune response. *Conclusion.* At the early stage of the influenza infection IFN $\alpha$  gene expression activation along with the induction of TNF family cytokines (APRIL and BAFF), their receptors

(sTNF-R1 and sTNF-R2) and osteopontin as well as the inhibition of the complex gp130/sIL-6R $\beta$  and metalloprotease MMP-1 were shown. Th1 immune response regulated by IL10 resulted in the recovery of the patients without complications.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 67—73

Key words: influenza, cytokines, reverse transcription with real time PCR, multiplex immunofluorescent analysis xMAP with magnetic beads, polarization coefficient of immune response

## ВВЕДЕНИЕ

Грипп — острая респираторная инфекция с риском осложнений, включая пневмонии, острую дыхательную недостаточность, инфекционно-токсический шок, менингиты, острый дистресс-синдром, а также декомпенсацию сопутствующих хронических заболеваний — бронхиальной астмы, хронической обструктивной болезни легких, заболеваний печени, почек, сердечно-сосудистой системы [11, 15, 17]. По данным ВОЗ в мире ежегодно регистрируют 3 — 5 млн больных гриппом [8].

Лечение гриппа основано на применении терапевтических препаратов прямого действия — ингибиторов нейраминидазы (занамивира, озельтамивир фосфата — Тамифлю), релензы и отечественного аналога «Номидес» производства «Фармасинтез-Ритейл», а также амантадина и римантадина, направленных на трансмембранную область белка М2 вируса гриппа, и индукторов интерферонов (арбидола, кагоцела, циклоферона и др.). Однако возникновение мутантных вариантов РНК-содержащего вируса гриппа, устойчивых к действию этиотропных ингибиторов, и распространение иммунодефицитов среди населения обуславливают необходимость поиска новых противовирусных средств и их комбинированного использования.

При вирусной инфекции в результате презентации эндогенных антигенов в комплексе с основным комплексом гистосовместимости МНС-1 происходит индукция экспрессии генов Th1. Показано, что инфекция вирусом гриппа типа А индуцирует ранние цитокины: IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$  и IL1 $\beta$ , которые являются ответственными за локальные воспалительные реакции. Позднее продуцируются IL6, белки воспаления макрофагов MIPs; хемокин IL8, обеспечивающий хемотаксис нейтрофилов; белки-хемоаттрактанты моноцитов MCPs [2, 13, 18]. Ряд хемокинов RANTES, MIP1 $\alpha$ , MCP1, MCP3 и IP10 индуцируют миграцию нейтрофилов или макрофагов в ткани [13, 18]. Полифункциональные цитокины IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL1 и IL6 ассоциируют с лихорадочным состоянием, слабостью, сонливостью и анорексией. Помимо этого, TNF $\alpha$  и IL1 повышают уровень молекул адгезии на эндотелии кровеносных сосудов и, таким образом, стимулируют накопление нейтрофилов и макрофагов в респираторном тракте [10].

Помимо индукции врожденной резистентности и Th1 поляризации преимущественно клеточного адаптивного иммунного ответа дисбаланс цитокинов при гриппозной инфекции может приводить к патогенному действию вследствие некроза тканей и увеличения проницаемости сосудов [3]. Цитокиновые каскады, обусловленные синергичной активацией экспрессии генов цитокинов и плеiotропностью их действия, могут приводить к нарушениям защитных систем организма и усилению патогенеза [2].

Цель данного исследования: анализ биомаркеров воспаления с использо-

ванием обратной транскрипции с ПЦР в реальном времени и мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа хМАР на магнитных микросферах при гриппе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследование 17 пациентов Инфекционной клинической больницы № 1 проводили в НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи в феврале—марте 2015 г. Пациентов обследовали после поступления в стационар на 1 — 2 сутки заболевания согласно правовым аспектам оказания медицинской помощи с получением от них информированного письменного согласия. Группу сравнения составили 10 практически здоровых волонтеров 25 — 55 лет без клинических и лабораторно подтвержденных признаков респираторных заболеваний.

Анализ носоглоточных смывов больных гриппом проводили посредством ОТ-ПЦР-РВ. Диагноз с идентификацией возбудителя ОРВИ (вирусов гриппа А и В) подтвержден посредством ОТ-ПЦР-РВ с использованием коммерческих наборов «Амплиценс® Influenza virus A/B-FL», «Амплиценс® Influenza virus A/H1-swine-FL» и «Амплиценс® Influenza virus A-тип-FL». Другие респираторные вирусы (РНК риновирусов, респираторно-синцитиального (РС) вируса, метапневмовируса, вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов, коронавирусов видов ОС43, Е229, NL63, НКUI, ДНК аденовирусов групп В, С и Е и бокавируса) определяли с использованием набора «ОРВИ-Амплиценс» («Амплиценс», Москва).

Количественное определение РНК IFN  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\lambda$  в мононуклеарных клетках крови больных гриппом и здоровых доноров проводили посредством ОТ-ПЦР-РВ в соответствии с [16].

Концентрации 37 биомаркеров воспаления определяли в сыворотке крови с использованием набора «Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Panel 1 37-plex» на анализаторе MAGPIX («BioRad», США).

Статистическое сравнение выборочных долей и количеств цитокинов проводили с использованием критерия Стьюдента и ПО «Biostat». Принят уровень значимости различий при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация возбудителей респираторных инфекций в носоглоточных смывах 10 больных методом ОТ-ПЦР-РВ показала наличие вируса гриппа А(Н3N2) — у четырех, гриппа В — у шести больных. Среднетяжелое течение гриппа проходило с головной болью, ломотой, сухим кашлем вследствие трахеита, температурой 37,7°C. У 1 пациента грипп осложнился лакунарной ангиной. Необходимо отметить, что на начальных стадиях заболевания при среднетяжелом течении гриппа у обследуемых пациентов концентрации лейкоцитов и скорость оседания эритроцитов оставались в пределах физиологической нормы [6].

Тест определения функциональной активности на культуре клеток фибробластов легких эмбриона человека, клетках почки зеленой мартышки Vero сывороточного и бессывороточного ведения [16] выявил сниженные показатели продукции IFN 1 и 2 типов у больных гриппом. Так, способность к продукции IFN 1 и 2 типов лейкоцитами крови больных гриппом составила 40 [15; 80] и 8 [3; 16] ед/мл; у практически здоровых людей в сезонный эпидемический период — 160 [120; 320] и 24 [12; 48] ед/мл соответственно.

Анализ экспрессии генов IFN 3 типов показал преимущества определения

РНК в мононуклеарных клетках крови по сравнению с сыворотками как по общему количеству положительных образцов, так и по количественным оценкам (табл. 1).

Для  $IFN\alpha$  были показаны как отличия частот детекции РНК в лимфоцитах больных ( $41,2\pm 12,3\%$ ) и здоровых людей ( $26,7\pm 11,8\%$ ), так и концентрации мРНК в 1 мл крови. Концентрации белка  $IFN\alpha 2$  также были достоверно выше. Содержание  $IFN\beta$  в сыворотке крови больных гриппом и у здоровых не отличалось. Частота детекции РНК  $IFN\gamma$  (50%) и белка (2,9 пг/мл) в крови у больных гриппом и у здоровых доноров (40% и 2,1 пг/мл, соответственно) были статистически сходными. Отмечена высокая частота (80 — 100%) и уровень экспрессии гена  $IFN\lambda$  у больных и здоровых.

Необходимо отметить, что в соответствии с количественными оценками по данным ОТ-ПЦР-РВ и хMAP (табл. 1) содержание белков превышало количество молекул соответствующих мРНК в единице объема крови, что могло быть обусловлено как каскадным усилением при трансляции, так и большей стабильностью белков по сравнению с РНК.

Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ на магнитных микросферах 37 белков воспаления показал (табл. 2) повышенное содержание 7 белков в крови больных гриппом по сравнению с показателями у здоровых добровольцев, к которым относятся 4 белка семейства TNF, такие как APRIL/TNFSF13 ( $P<0,05$ ), BAFF/TNFSF13B ( $P<0,001$ ), их растворимые рецепторы sTNF-R1/sTNF-R2 ( $P<0,05$ ), а также цитокины  $IFN\alpha 2$  ( $P<0,05$ ), IL10 ( $P<0,001$ ), белок остеопонтин ( $P<0,001$ ). Концентрации двух маркеров: комплекса гликопротеина 130 с растворимым рецептором IL-6 gp130/sIL-6R $\beta$  и матриксной металлопротеиназы MMP-1 у больных гриппом были пониженными ( $P<0,05$ ) по сравнению с контролем.

Для оценки сбалансированности и направленности иммунного ответа определяли коэффициенты поляризации (КП) [1] как соотношение концентраций IL10 и  $IFN\gamma$  в сыворотках крови больных гриппом и здоровых доноров, которые составили 0,53 и 0,07, соответственно. Данные свидетельствуют о Th1 поляризации в результате эндогенной презентации антигенов при инфекции вирусами гриппа А и В в начале заболевания с последующей индукцией преимущественно клеточного иммунного ответа.

В эпидемический сезон 2014 — 2015 гг. в Москве зарегистрирована одно-временная циркуляция штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В. Вирус гриппа В проявлял высокую активность в течение всего эпидемического сезона в отличие от его появления в весеннее время в предыдущие годы [4].

Таблица 1. Количественные оценки РНК и белков  $IFN$  1, 2, 3 типов

Типы	РНК $IFN$ (ОТ-ПЦР-РВ) (в лимфоцитах, Ct)				$IFN$ (хMAP) (в сыворотке, пг/мл)				
	$IFN\alpha$	$IFN\beta$	$IFN\gamma$	$IFN\lambda$	$IFN\alpha 2$	$IFN\beta$	$IFN\gamma$	$IFN\lambda 1$ (IL29)	$IFN\lambda 2$ (IL28A)
Больные гриппом	Ct=34,75 <sup>a</sup>	—	—	Ct=23,7	12,1	79	2,9	5,9	6,3
Копии в 1 мл крови	$1,14 \times 10^2$ <sup>*</sup>	0	0	$2,4 \times 10^5$	$3,61 \times 10^8$	$2,46 \times 10^9$	$7,96 \times 10^7$	$1,78 \times 10^8$	$1,89 \times 10^8$
Здоровые доноры	Ct=36,8	Ct=29,1	—	Ct=20,2	3,8	79	2,1	3,2	5,6
Копии в 1 мл крови	$2,8 \times 10^1$ <sup>*</sup>	$5,73 \times 10^3$ <sup>**</sup>	0	$2,74 \times 10^6$	$1,25 \times 10^8$	$2,46 \times 10^9$	$6,54 \times 10^7$	$9,64 \times 10^7$	$1,75 \times 10^8$

Примечание. <sup>a</sup> Средние значения пороговых циклов (Ct) флуоресценции для образцов крови, положительных в ОТ-ПЦР-РВ; \*  $P<0,05$ ; \*\*  $P<0,001$ .

Таблица 2. Результаты определения концентраций (пг/мл) биомаркеров воспаления в сыворотке крови больных гриппом и здоровых доноров методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа xMAP с использованием магнитных микросфер

Цитокины	Грипп		Контроль		P	
	Me	min+max	Me	min+max	P<	
<b>Th1</b>						
Семейство IFN	IFN $\alpha$ 2	12,1	6+73	3,8	2,5+11,7	0,05
	IFN $\beta$	79	48+113	79	55+105	0,2
	IFN $\gamma$	2,9	1,3+6,1	2,1	1,3+4,8	0,2
	IL29/IFN $\lambda$ 1	5,9	3,2+19,6	3,2	0,9+9	0,1
	IL28A/IFN $\lambda$ 2	6,3	3,1+10,8	5,6	3,7+28,8	0,7
Семейство TNF	APRIL/ TNFSF13	3333	416+7367	491	291+2860	0,05
	BAFF/ TNFSF13B	11 680	4888+16770	3242	2896+4781	0,001
Рецептор TNF	sTNF-R1	1390	647+2505	787	390+1405	0,05
Рецептор TNF	sTNF-R2	8272	3774+12350	2710	1092+6040	0,0001
	LIGHT / TNFSF14	<0,65		<0,65		1
	TWEAK / TNFSF12	1006	617+2469	1784	586+2423	0,1
	sCD30 / TNFRSF8	277	217+1149	156	82+514	0,1
Семейство IL12	IL12(p40)	6,4	2,3+20,9	4,3	0,6+26,3	0,7
	IL12(p70)	0,12	0,03+0,4	0,08	0,03+1,2	0,1
	IL27(p28)	<0,45		<0,45		1
	IL35-Treg	44	22+77	39	26+62	0,2
	Индуктор IL12	Остеопонтин	17 860	8210+40170	5562	2181+8423
IL2		0,5	0,1+0,8	0,4	0,2+0,9	0,4
IL32		0,8	0,1+30,1	0,4	0,1+15,4	0,4
IL34		<7,14		<7,14		1
Пентраксин-3		808	127+2634	433	134+1265	0,1
Хитиназа-подобный белок 3		7718	3125+11220	7822	3018+15100	0,5
<b>Th2</b>						
Семейство IL10	IL10-Treg	1,65	0,1+2,84	0,06	0,01+1,6	0,001
	IL19	1,3	0,3+5	0,5	0,3+3,2	0,1
	IL20	9,2	5,2+16,4	8,6	5,2+25,2	0,6
	IL22	2,2	0,5+3,5	0,8	0,02+4,4	0,2
	IL26	45,1	32+138	16,8	10,4+164	0,2
Индуктор Th2	TSLP	34	12+60	22	14+44	0,1
Хемокин	IL8	9,2	1,1+19,6	10,9	5+53,8	0,2
<b>Индукторы Th17</b>						
Семейство IL6	IL6Ra	6815	3543+9367	7343	3863+13250	0,3
Рецептор IL6	gp130/sIL-6R $\beta$	49 270	34 060+55 220	66710	27 830+89 030	0,05
	IL11	0,02		0,02		1
<b>MMP</b>						
	MMP-1	264	21+944	1471	79+3644	0,005
	MMP-2	2443	953+6941	3560	1952+5911	0,2
	MMP-3	2442	619+6982	2118	1006+7637	0,2
<b>Белки воспаления</b>						
	Остеокальцин	810	383+1809	627	251+1422	0,2
	sCD163	1252	396+2167	1214	511+2635	0,5

При инфекции вирусами гриппа А и В качественные и количественные отличия РНК IFN 3 типов в лимфоцитах крови больных гриппом (табл. 1 и 2) и в клетках слизистой носоглотки [7] в первые 2 дня заболевания свидетельствуют о дифференциальной индукции их экспрессии на входных воротах инфекции, которая обеспечивает врожденную неспецифическую резистентность с провоспалительными цитокинами Th1 пути с последующим преиму-

шественно клеточным иммунным ответом. Активация экспрессии гена  $IFN\alpha$  на уровне транскрипции и трансляции в мононуклеарных клетках крови (табл. 1) при отсутствии РНК в смывах [7] сопровождалась синхронной ранней индукцией транскрипции РНК  $IFN\beta$  и  $IFN\gamma$  в клетках слизистых оболочек при полном отсутствии в клетках крови [7].

Повышенные концентрации только 7 из 37 анализируемых биомаркеров воспаления коррелировали с элиминацией вируса без последующих аллергических или аутоиммунных осложнений у больных гриппом. Из 7 биомаркеров с повышенной концентрацией у больных гриппом 6 относятся к Th1 пути (табл. 2). Для семейства TNF характерно не только увеличение продукции собственно цитокинов APRIL и BAFF, способных к взаимодействию между собой [20], но и двух растворимых рецепторов sTNF-R1 и sTNF-R2. Активация цитокинов семейства TNF приводит к индукции преимущественно клеточного иммунного ответа Th1 типа, вызывает повышение проницаемости капилляров, а при избытках — повреждение эндотелия сосудов и возникновение тромбов [5, 9]. Из двух белков семейства TNF с достоверно повышенными концентрациями у больных гриппом APRIL при связывании с рецепторами способен индуцировать апоптоз. Таким образом, необходимость связывания APRIL с BAFF и со специфическими рецепторами обуславливает односторонненность и синхронность их регуляции [12, 20] у больных гриппом (табл. 2). Статистически значимый рост концентрации полифункционального сиалопротеина остеоопонтинина, как известно, обеспечивает индукцию цитокинов семейства IL-12 и раннюю активацию лимфоцитов по Th1 пути [14].

Увеличение концентрации регуляторного противовоспалительного цитокина IL10 свидетельствует о своевременной регуляции воспаления и может служить прогностическим маркером для больных гриппом. Достоверных изменений экспрессии генов других цитокинов Th2 пути не обнаружено.

Уменьшение концентрации комплекса гликопротеина 130 и растворимого рецептора IL6 gp130/sIL-6R $\beta$ , необходимого для активации IL6 индуцируемого каскада провоспалительных и противовоспалительных реакций наряду с активацией Th17 иммунного ответа также свидетельствует о Th1 поляризации врожденного и адаптивного иммунитета в результате эндогенной презентации внутриклеточных антигенов вируса гриппа в комплексе с МНСI. Оценки КП=0,53 при гриппе позволяют количественно оценить преимущественно Th1 клеточный иммунный ответ.

Уменьшение концентрации только 1 из 3 исследованных матриксных металлопротеиназ — MMP-1, обеспечивающих регуляцию цитокиновой сети посредством протеолитического гидролиза мембранных рецепторов [19], вероятно, обусловлено завершением Th1 поляризации врожденной резистентности в первые часы после заражения вирусом гриппа и индукцией вирусспецифического преимущественно клеточного иммунитета на стадии начала инфекционного заболевания.

Многочисленное преобладание количества молекул белков по сравнению с мРНК более чем в  $10^6$  раз, вероятно, обусловлено регуляцией на стадии трансляции и обеспечивает быстрое каскадное усиление биологической активности цитокиновой сети, необходимое для подавления острой инфекции и элиминации вируса гриппа в течение нескольких суток.

На ранней стадии заболевания гриппом в клетках крови больных показана активация экспрессии гена  $IFN\alpha$  на стадии транскрипции и трансляции наряду с индукцией цитокинов семейства TNF (APRIL и BAFF) и соответствующих рецепторов (sTNF-R1 и sTNF-R2), а также активатора Т-лимфоцитов



— остеопонтина. Th1 поляризация врожденного иммунитета также обеспечивается пониженными по сравнению с контрольной группой концентрациями растворимого рецептора IL6 gp130/sIL-6R $\beta$ , необходимого для индукции Th17 ответа, и металлопротеазы ММР-1, ответственной за протеолиз рецепторов цитокинов. Своевременная регуляция цитокинов, опосредуемая IL10, обеспечивала восстановление пациентов без осложнений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Головачева Е.Г., Афанасьева В.С., Афанасьева О.И., Осидак Л.В., Образцова Е.В., Королева Е.Г. Тип иммунного ответа как фактор тяжелого и осложненного течения гриппа. Молекулярная диагностика. 2017, 1: 248-249.
2. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., Мезенцева М.В. Ранние цитокиновые реакции при вирусных инфекциях. Цитокины и воспаление. 2004, 3 (1): 3-6.
3. Иванов В.В., Шпилов М.В. Провоспалительные цитокины и их значение при гриппе рН1N1. Медиц. вестник Северного Кавказа. 2012, 4: 70-72.
4. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Дерябин П.Г., Кириллова Е.С., Трушакова С.В. и др. Особенности эпидемического сезона 2014/2015 гг. по гриппу в разных регионах России. Инфекционные болезни. 2015, 4: 59-67.
5. Недоспасов С.А. Фактор некроза опухолей и лимфотоксин: молекулярная генетика, регуляция продукции и физиологическая роль. Генетика. 2003, 39 (2): 207-214.
6. Новая популярная медицинская энциклопедия. Под ред. В.И.Покровского. М., Энциклопедия, 2004.
7. Оспельникова Т.П., Морозова О.В., Андреева С.А., Исаева Е.И., Колодяжная Л.В., Ершов Ф.И. Цитокины при гриппе. Молекулярная диагностика. 2017, 1: 232-233.
8. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Под ред. Д.К.Львова. М., Медицинское информационное агентство, 2013.
9. Симбирцев А.С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма. Цитокины и воспаление. 2002, 1: 9-17.
10. Фрейдлин И.С., Шейкин Ю.А. Эндотелиальные клетки в качестве мишеней и продуцентов цитокинов. Медицинская иммунология. 2001, 3 (4): 499-514.
11. Biron C.A. Yet another role for natural killer cells: cytotoxicity in immune regulation and viral persistence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012, 109 (6): 1814-1815.
12. Bradley J.R. TNF-mediated inflammatory disease. J. Pathol. 2008, 214 (2): 149-160.
13. Julkunen I., Pirhonen J., Ronni T. et al. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. Cytokine Growth Factor Rev. 2001, 12 (2-3): 171-180.
14. Lund S.A., Giachelli C.M., Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. J. Cell Commun Signal. 2009, 3 (3-4): 311-322.
15. Medzhitov R. Innate immunity: quo vadis? Nat. Immunol. 2010, 11 (7): 551-553.
16. Ospelnikova T.P., Morozova O.V., Isaeva E.I. et al. Respiratory viruses and proinflammatory cytokines imbalance in adults and children with bronchial asthma. J. Infectious Diseases and Preventive Medicine. 2016, 4 (2): 1000138. DOI: 10.4172/2329-8731.1000138.
17. Seth R.B., Sun L., Chen Z.J. Antiviral innate immunity pathways. Cell. Research. 2006, 16: 141-147.
18. Trinchieri G. Type interferon: friend or foe? J. Exp. Med. 2010, 207: 2053-2063.
19. Van Lint P., Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. J. Leukoc Biol. 2007, 82 (6): 1375-1381.
20. Wu Y., Bressette D., Carrell J.A. et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS. J. Biol. Chem. 2000, 275 (45): 35478-35485.

*Поступила 25.11.17*

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Е.С.Петухова<sup>1</sup>, Д.С.Воробьев<sup>2</sup>, И.Б.Семенова<sup>1</sup>*

### **РОЛЬ БЕЛКОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* В РАЗРАБОТКЕ СЕРОТИП-НЕЗАВИСИМЫХ ПНЕВМОКОККОВЫХ ВАКЦИН**

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

Инфекции, вызванные *Streptococcus pneumoniae*, являются актуальными для России и всего мира. Одним из ключевых факторов патогенности пневмококка считается полисахаридная капсула. По строению полисахаридных антигенов описано более 90 серотипов патогена. Опыт применения полисахаридных и конъюгированных пневмококковых вакцин показывает, что данные профилактические препараты защищают от ограниченного числа серотипов возбудителя. Представляет интерес исследование протективных свойств белков пневмококка, так как они консервативны и обладают высокой гомологией внутри вида, что потенциально расширяет спектр защиты от патогена. Таким образом, в настоящее время усилия исследователей сосредоточены на разработке белковых вакцин или конъюгированных вакцин на основе белков *S. pneumoniae*. В обзоре рассмотрены биологические свойства наиболее известных белков пневмококка и приведены данные о доклинических исследованиях полученных рекомбинантных белков в качестве экспериментальных вакцинных препаратов. Иммунизация различными белками *S. pneumoniae* обеспечивает защиту животных от назофарингеальной колонизации, пневмонии и сепсиса. В настоящее время с несколькими экспериментальными белковыми вакцинами проводят клинические испытания (I/II фазы). В ближайшем будущем можно будет оценить реальную эффективность таких вакцин.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 74—80

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, пневмококковые белки, пневмококковая вакцина, серотипнезависимая защита, доклинические исследования, клинические испытания

*E.S.Petukhova<sup>1</sup>, D.S.Vorobyev<sup>2</sup>, I.B.Semenova<sup>1</sup>*

### **THE ROLE OF PROTEINS OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* IN THE DEVELOPMENT OF SEROTYPE-INDEPENDENT PNEUMOCOCCAL VACCINES**

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

Infections caused by *Streptococcus pneumoniae* are relevant for Russia and the world. One of the key factors in the pathogenicity of pneumococcus is a polysaccharide capsule. The structure of polysaccharide antigens is described more than 90 serotypes of the pathogen. The experience of using polysaccharide and conjugated pneumococcal vaccines shows that these preventive drugs protect against a limited number of serotypes of the pneumococcus. It is of interest to study the protective properties of pneumococcal proteins, as they are conservative and have high homology within the species, potentially expanding serotype non-specific protection level. Thus, the efforts of researchers focus on the development of protein vaccines or conjugated vaccines based on proteins of *S. pneumoniae*. The review considers the biological properties of the most well-known proteins of pneumococcus and provides data on preclinical studies of the obtained recombinant proteins as experimental vaccine preparations. Immunization with various proteins of *S. pneumoniae* provides protection of animals from nasopharyngeal colonization, pneumonia and sepsis.

Currently, clinical trials (I/II phases) are being tested with several experimental protein vaccines. In the near future it will be possible to assess the real effectiveness of such vaccines.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 74—80

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, pneumococcal proteins, pneumococcal vaccine, serotype-independent protection, preclinical studies, clinical trials

Проблема пневмококковых инфекций в последние десятилетия остается актуальной для России и мира. *Streptococcus pneumoniae* способен вызывать как локальные формы (отит), так и тяжелые инвазивные формы (пневмония, менингит, сепсис) заболеваний. Группами риска являются дети младше 2 лет, пожилые люди старше 65 лет, лица с иммунодефицитными состояниями, больные хронической обструктивной болезнью легких, пациенты после спленэктомии [1]. Несмотря на успех применения современных вакцин на основе капсульных антигенов пневмококка [36], проблема пневмококковых инфекций по-прежнему стоит остро из-за явления замещения серотипов и появления антибиотикоустойчивых штаммов [11].

В настоящее время официально зарегистрированы два принципиально разных типа вакцин, способных предотвратить развитие инфекций, вызванных пневмококком. Это поливалентная полисахаридная вакцин «Пневмо-23» и конъюгированные вакцины, в которых капсульные полисахариды связаны с дифтерийным, столбнячным анатоксинами или D-протеином гемофильной палочки [2]. Несмотря на иммуногенность и безопасность полисахаридных вакцин, исследователи отмечают низкую эффективность в старших возрастных группах [18], неспособность обеспечить иммунитет слизистых и нестойкий иммунитет у детей до 2 лет [37]. Конъюгированные вакцины эффективны в группах риска [32], однако количество серотипов, от которых защищает вакцина, ограничено, и следовательно, усиливается колонизация слизистой носоглотки невакцинными серотипами *S. pneumoniae* [11]. Также повышается частота колонизации носоглотки другими патогенами, такими как *Staphylococcus aureus* и *Haemophilus influenzae*, а также другими стрептококками и анаэробной флорой [5].

Вышеперечисленные ограничения современных пневмококковых вакцин заставляют задуматься о необходимости разработки серотипнезависимой вакцины, которая обеспечивала бы защиту от подавляющего большинства серотипов *S. pneumoniae*. На роль протективного антигена подходят белки *S. pneumoniae*, имеющие высокую степень гомологии внутри вида. Разработка нового поколения экспериментальных пневмококковых вакцин основана на использовании рекомбинантных белков и рекомбинантных штаммов *S. pneumoniae* и ведется в нескольких направлениях 1) конъюгация рекомбинантных белков с капсульными полисахаридами; 2) один рекомбинантный белок или сочетание нескольких рекомбинантных белков; 3) рекомбинантные гибридные белки пневмококка; 4) цельноклеточная рекомбинантная убитая вакцина со сниженным уровнем экспрессии капсулы [11].

Рассмотрим более подробно возможные белки-кандидаты для создания серотипнезависимой вакцины от *S. pneumoniae*.

*Пневмолизин (Pneumolysin, Ply)*. Пневмолизин является внутриклеточным белком пневмококка. Известно, что все клинические изоляты пневмококка синтезируют пневмолизины, мало отличающиеся по аминокислотной последовательности, что делает пневмолизин весьма перспективным кандидатом для создания серотипнезависимой вакцины [37]. В основном пневмолизин не секретируется пневмококком во внешнюю среду, а белок покидает клетку после лизиса, но есть данные о расположении пневмолизина в клеточной стенке, а также о частичной секреции пневмолизина во внешнюю среду [38]. В высоких концентрациях пневмолизин образует поры в клетках млекопитающих, индуцируя гибель клетки [4].

В более низких концентрациях пневмолизин обладает несколькими эффектами: угнетает сокращение ресничек дыхательного эпителия, снижает бактерицидную активность и миграцию нейтрофилов, угнетает пролиферацию лимфоцитов и синтез антител [4]. Хотя нативный пневмолизин не может быть непосредственно включен в состав новой вакцины из-за своей токсичности, существует возможность модификации его структуры с целью снижения токсичности путем направленного мутагенеза [27].

Иммуногенность и протективный эффект пневмолизина и его нетоксичных мутантов были оценены на различных животных моделях: нативный белок вызывал задержку гибели мышей после интраперитонеального заражения [28], тогда как пневмолизин защищал мышей от нескольких серотипов пневмококка (60 — 85% выживаемость) в модели пневмонии и сепсиса [3].

*Поверхностный белок А (Pneumococcal surface protein, PspA).* Поверхностный пневмококковый белок А — это холин-связывающий белок, который затрудняет фиксацию компонента комплемента С3 на поверхности клеточной стенки бактерии, а также защищает бактерию от лактоферрина [8]. В структуре PspA выделяют 3 домена. По различиям в N-концевой последовательности белка выделяют 3 семейства и 6 клэйдов [22]. Согласно данным, полученным при секвенировании, существует гомология между поверхностным белком А и сердечным миозином человека, поэтому в целях безопасности в настоящее время ведутся исследования с участками PspA, негомологичными миозину [13].

В опыте на мышах продемонстрирована защита (до 100%) при иммунизации PspA и заражении штаммом, содержащим PspA из одного «семейства» [9, 33].

Получены гибридные белки PspA разных клэйдов: PspA3+2, PspA2+4, PspA2+5. Иммунизация мышей подкожно вариантом PspA3+2 обеспечила высокую выживаемость (60 — 100%) животных при интраназальном инфицировании штаммами с вариантами PspA клэйдов 1-5 по сравнению с контрольной группой животных и по сравнению с группами, иммунизированными вариантами PspA2+4 и PspA2+5 соответственно [30].

*Поверхностный белок С (Pneumococcal surface protein C, PspC).* По своей структуре PspC похож на поверхностный белок А и имеет в своей структуре холин-связывающий домен [8]. Поверхностный белок С связывается с секреторным IgА и фактором Н, регулирующий активность системы комплемента. Связывание с фактором Н предотвращает отложение С3 на бактериальной стенке [10]. Поверхностный белок С отличается вариативностью, выделяют 11 аллельных вариантов [17]. Эта особенность может отразиться на спектре защиты при иммунизации белком PspC.

В структуре PspC, также как и в структуре PspA, есть богатый пролином участок (proline rich region, PRR). В структуре PRR PspC и PspA есть довольно консервативный безпролиновый блок (NPB), состоящий из 33 аминокислотных остатков. Иммунизация рекомбинантными PR-молекулами и молекулами NPB показали протективный эффект (выживаемость 80%) против пневмококковой инфекции на модели сепсиса у мышей [7].

*Холин-связывающий белок А (Pneumococcal choline-binding protein A, PcpA).* По данным Selva L. et al. [35], более 90% штаммов пневмококка синтезируют поверхностный белок А. Судя по структуре (наличие LRR, lipid rich region), играет роль в адгезии пневмококка. Экспрессия этого белка регулируется концентрацией ионов марганца. Уровень экспрессии белка выше во время острого заболевания и значительно снижается в условиях колонизации слизистой носоглотки, где концентрация ионов марганца выше [8].

В опытах на мышах подкожная иммунизация PcpA способствовала отсроченной гибели в модели сепсиса [14]. Также было продемонстрировано, что человеческие антитела к PcpA препятствовали бактериальной адгезии к легочному эпителию и эпителию носоглотки в культуре клеток [21].

*Белки полигистидиновой триады (Polyhistidine triad, Phts).* Семейство поверх-

ностных белков, отличающихся высокой консервативностью. Выделяют белки PhtA, PhtB, PhtD, PhtE. Белки PhtD и PhtE относятся к адгезинам, способствуют колонизации эпителия дыхательных путей [20]. Ингибируют отложение комплекта на клеточной стенке, связывают ионы цинка [31].

Белки полигистидиновой триады при внутримышечной иммунизации защищали мышей от разных серотипов пневмококка в модели пневмонии (выживаемость 60%), назофарингеальной и легочной колонизации [15]. Антитела к Phts способны пассивно защищать мышей (60% выживаемость) при летальном интраназальном заражении [15].

*Поверхностный антиген А (Pneumococcal surface antigen, PsaA).* Липопротеин, ответственный за адгезию и колонизацию путем связывания с E-кадгеринном. Относится к поверхностным антигенам, обладает транспортной активностью, способен связывать ионы металлов (марганца), повышает устойчивость пневмококка к оксидативному стрессу [8].

Антитела к PsaA нарушают адгезию пневмококка к эпителию носоглотки человека в культуре клеток [34]. Подкожная иммунизация поверхностным антигеном А предотвращала колонизацию *S. pneumoniae* [19].

*Белки пилей (RrgA, RrgB, RrgC).* Белок RrgB образует остов структуры пилей, а RrgA и RrgC являются дополнительными белками, расположенными соответственно снаружи и внутри клетки. RrgA — белок-адгезин, участвующий в образовании биопленки. RrgB существует в трех различных вариантах. Пили присутствуют не более чем у одной трети от всех тестируемых штаммов пневмококка [8].

Иммунизация белком RrgB защищала мышей при заражении летальными дозами. Так как RrgB существует в виде трех структурных вариантов, между которыми не существует перекрестной активности, был создан RrgB321, в структуре которого содержатся все 3 варианта. При интраперитонеальной иммунизации RrgB321 вызывал выработку антител против всех трех вариантов RrgB и защищал (до 70% в зависимости от штамма) мышей в модели пневмококкового сепсиса, вызванного серотипами, имеющими пили (PI-1) [16].

*Сериновая/треониновая протеинкиназа (Serin/threonine proteinkinase, StrkP)u белок, необходимый для репарации клеточной стенки (Sell wall separation protein of group B, PcsB).* Сериновая/треониновая протеинкиназа является высококонсервативным белком, участвующим в регуляции многих процессов бактериальной клетки: экспрессия генов, захват ионов железа, репарация ДНК, биосинтез пиримидинов, метаболизм клеточной стенки [8].

Белок PcsB функционально представляет собой гидралазу, участвует в репарации клеточной стенки. Расположен поверхностно и соответственно доступен для действия протективных антител [26].

В серии исследований на животных StrkP и PcsB показали перекрестную защиту в модели сепсиса (60% выживаемость) и пневмонии. Вышеназванные белки защищали мышей от пневмококковой инфекции при интраперитонеальном и интраназальном заражении летальными дозами различных серотипов *S. pneumoniae* [12].

*Нейраминидазы (Neuraminidase, Nan).* Пневмококк синтезирует два типа нейраминидаз: NanA и NanB. NanA необходима для успешной колонизации слизистых, тогда как NanB вносит свой вклад в выживание пневмококка в крови [25]. Функциональное действие: отщепление остатка сиаловой кислоты от гликоконъюгатов, экспозиция «рецепторов» для пневмококка [23]. Протективный эффект NanA показан в модели колонизации и отита у шиншил [24].

*ABC-транспортёры (Pneumococcal iron uptake PiuA, Pia).* PiuA, PiaA являются компонентами системы захвата ионов железа. По структуре они относятся к липопротеинам, расположены в клеточной стенке. По данным анализа с помощью ПЦР, эти липопротеины присутствуют у всех штаммов пневмококка, а также имеют значительное структурное сходство с поверхностными рецепторами захвата железа других организмов [8].

Интраперитонеальная иммунизация мышей PiuA и PiaA как совместно, так и по отдельности обеспечивала защиту от системной инфекции *S. pneumoniae* (выживаемость 80, 52 и 39% соответственно) [6]. Антитела к этим белкам обладают перекрестной активностью между собой, а также взаимодействуют с PiuA и PiaA разных штаммов пневмококка [6].

**Аутолизины** (*Autolysine, LytA, LytC*). У пневмококка открыто два типа аутолизинов: LytA (амидаза) и LytC (мурамидаза) [29]. Аутолизин LytA отвечает за клеточный аутолиз, благодаря которому осуществляется высвобождение токсичных веществ, таких как пневмолизин или продукты деградации клеточной стенки, что способствует нарушению эпителиального и эндотелиального барьера и позволяет пневмококку выйти в кровеносное русло. Пневмококк защищен от литической активности LytA во время экспоненциальной фазы роста и становится восприимчив во время стационарной фазы, однако механизмы, регулирующие аутолиз, до конца не ясны [29].

Полученные рекомбинантные образцы LytA в опыте на мышах продемонстрировали при интраназальном заражении мышей выработку сывороточных IgG и IgA, а также выработку секреторных IgA. Мыши, иммунизированные интраназально рекомбинантным LytA штамма SH137 (серотип 23F), показали высокую выживаемость (75, 65, 62,5 и 60 %) при интраперитонеальном заражении штаммами серотипов 19F, 14, 6A и 6B соответственно [39].

В настоящее время многие вакцины против пневмококка на основе рекомбинантных белков находятся уже на разных стадиях клинических испытаний. «Sanofi-Pasteur» успешно провел I фазу клинических испытаний сразу нескольких вариантов потенциальных вакцин: моновалентной PlyD1; комбинированной PspA+PhtD; комбинированной PspA+PhtD+dPly [11]. «GlaxoSmithKline Biologicals» сообщили о завершении I фазы для своей вакцины, содержащей протеин D, dPly и PhtD. Моновалентная вакцина «GlaxoSmithKline Vaccines» на основе PhtD прошла I и II фазы клинических испытаний. Все указанные выше вакцины характеризуются как препараты с широкой защитой от многих серотипов пневмококка. Однако на данный момент не выработано четких критериев, по которым можно оценить эффективность этого типа вакцин [32].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Курбатова Е.А. Белки *Streptococcus pneumoniae*: перспективы создания вакцины против пневмококковой инфекции. Журн. микробиол. 2010, 6: 98-104.
2. Семенова И.Б., Михайлова Н.А. Серотипнезависимые вакцины против пневмококковой инфекции. Журн. микробиол. 2016, 4: 76-85.
3. Alexander J.E., Lock R.A., Peeters C.A.M. et al. Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 1994, 62 (12): 5683-5688.
4. Alonso Develasco E., Verheul A.F.M., Verhoef J. et al. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiol. Reviews. 1995, 59 (4): 591-603.
5. Biesbroek G., Wang X., Keijser B.J. et al. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children. Emerg. Infect. Dis. 2014, 20 (2): 201-210.
6. Brown J.C., Ogunniyi A.D., Woodrow M.C. et al. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. Infect. Immun. 2001, 69 (11): 6702-6704.
7. Daniels C.C., Coan P., King J. et al. The proline rich region of pneumococcal surface protein A and C contains surface accessible epitopes common to all pneumococci and elicits antibody mediated protection against sepsis. Infect. Immun. 2010, 78 (5): 2163-2172.
8. Darriex M., Goulart C., Briles D. et al. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines. Crit. Rev. Microbiol. 2013, DOI: 10.3109/1040841X.2013.813902.
9. Darriex M., Miyaji E.N., Ferreira D.M. et al. Fusion proteins containing family 1 and family 2 PspA fragments elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* that correlates with antibody mediated enhancement of complement deposition. Infect. Immun. 2007, 75 (12): 5930-5938.

10. Dave S., Brooks-Walter A., Pangburn M.K. et al. Pspc, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect. Immun.* 2001, 69 (5): 3435-3437.
11. Feldman C., Anderson R. Review: Current and new generation pneumococcal vaccines, *J. Infect.* 2014, DOI: 10.1016/j.jinf.2014.06.006.
12. Giefring C., Meinke A.L., Hanner M. et al. Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J. Exp. Med.* 2008, 205 (1): 117-131.
13. Ginsburg A.S., Nahm M.H., Khambaty F.M. et al. Issues and challenges in the development of pneumococcal protein vaccines: a two day international symposium, *Expert. Rev. Vaccines.* 2012, 11 (3): 279-285.
14. Glover D.T., Hollingshead S.K., Briles D.E. Streptococcus pneumoniae surface protein PcpA elicits protection against lung infection and fatal sepsis. *Infect. Immun.* 2008, 76 (6): 2767-2776.
15. Godfroid F., Hermand P., Verlant V. et al. Preclinical evaluation of the Pht proteins as potential cross-protective pneumococcal vaccine antigens. *Infect. Immun.* 2011, 79 (1): 238-245.
16. Harfouche C., Filippini S., Gianfaldoni C. et al. RrgB321, a fusion protein of the three variants of the pneumococcal pilus backbone RrgB, is protective in vivo and elicits opsonic antibodies. *Infect. Immun.* 2012, 80 (1): 451-460.
17. Iannelli F., Oggioni M.R., Pozzi G. Allelic variation in the highly polymorphic locus pspC of Streptococcus pneumoniae. *Gene.* 2002, 284: 63-71.
18. Jackson L.A., Janoff E.N. Pneumococcal vaccination of elderly adults: new paradigm for protection. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 47: 1328-1338.
19. Johnson S.E., Dykes J.K., Jue D.L. et al. Inhibition of pneumococcal carriage in mice by subcutaneous immunization with peptides from the common surface protein pneumococcal surface adhesion A. *J. Infect. Dis.* 2002, 185: 489-496.
20. Khan M.N., Pichichero M.E. Vaccine candidates PhtD and PhtE of Streptococcus pneumoniae are adhesins that elicit functional antibodies in humans. *Vaccine.* 2012, 30 (18): 2900-2907.
21. Khan M.N., Sharma S.K., Filkins L.M. et al. PcpA of Streptococcus pneumoniae mediates adherence to nasopharyngeal and lung epithelial cells and elicits functional antibodies in humans. *Microbes Infect.* 2012, 14 (12): 1102-1110.
22. Khan N., Jan A.T. Towards identifying protective B-cell epitopes: the PspA story. *Front. Microbiol.* 2017, 8: 742.
23. King S.J., Hippe K.R., Weiser J.N. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by Streptococcus pneumoniae. *Mol. Microbiol.* 2006, 59 (3): 961-974.
24. Long J.P., Tong H.H., DeMaria T.F. Immunization with native or recombinant Streptococcus pneumoniae neuraminidase affords protection in the chinchilla otitis media model. *Infect. Immun.* 2004, 72 (7): 4309-4313.
25. Manco S., Hernon F., Yesilkaya H., et al. Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis. *Infect. Immun.* 2006, 74 (7): 4014-4020.
26. Mills M.F., Marquart M.E., Mcdaniel L.S. Localization of PcsB of Streptococcus pneumoniae and its differential expression in response to stress. *J. Bacteriol.* 2007, 189 (12): 4544-4546.
27. Oloo E.O., Yethan J.A., Ochs M.M. et al. Structure guided antigen engineering yields pneumolysin mutants suitable for vaccination against pneumococcal disease. *J. Biol. Chem.* 2011, 286 (14): 12133-12140.
28. Paton J.C., Lock R.A., Hansman D.J. Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with Streptococcus pneumoniae. *Infect. Immun.* 1983, 40 (2): 548-552.
29. Perez-Dorado I., Galan-Bartual S., Hermoso J.A. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Molecular Oral Microbiology.* 2012, 27: 221-245.
30. Piao Z., Akeda Y., Takeuchi D., et al. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine.* 2014, 32: 5607-5613.
31. Plumptre C.D., Ogunniyi A.D., Paton J.C. Surface association of Pht proteins of Streptococcus pneumoniae. *Infect. Immun.* 2013, 81 (10): 3644-3651.
32. Principi N., Esposito S. Development of pneumococcal vaccines over the last 10 years. *Expert.*

- Opin. Biol. Ther. 2018, 18 (1): 7-17. Doi: 10.1080/14712598.2018.1384462. Epub 2017 Oct 12.
33. Roche H., Ren B., McDaniel L.S. et al. Relative role of genetic background and variation in PspA in the ability of antibodies to PspA to protect against capsular type 3 and 4 strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2003, 71 (8): 4498-4505.
  34. Romero-Steiner S., Pilshvili T., Sampson J.S. et al. Inhibition of pneumococcal adherence to human nasopharyngeal epithelial cells by anti-PsaA antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003, 10 (2): 246-251.
  35. Selva L., Ciruela P., Blanchette K. et al. Prevalence and clonal distribution of PcpA, PsrP and Pilus-1 among pediatric isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One.* 2012, 7 (7): e41587.
  36. Sings H.L. Pneumococcal conjugate vaccine use in adults — Addressing an unmet medical need for non-bacteremic pneumococcal pneumonia. *Vaccine.* 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.075>.
  37. Tarahomjoo S. Recent approaches in vaccine development against *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 24: 215-227.
  38. Vernatter J., Pirofski L.A. Current concepts in host-microbe interaction leading to pneumococcal pneumonia. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2013, 26 (3): 277-283.
  39. Yuan Z.Q., Lv Z.Y., Gan H.Q. et al. Intranasal immunization with autolysin (LytA) in mice model induced protection against five prevalent *Streptococcus pneumoniae* serotypes in China. *Immunol. Res.* 2011, 51: 108-115.

*Поступила 28.12.17*

Контактная информация: Петухова Екатерина Сергеевна,  
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р т. (495)917-57-74

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Д.В.Пахомов, К.В.Машилов, А.М.Костинова*

## **ИММУНОПРОФИЛАКТИКА В ЛЕЧЕНИИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ С БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ**

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

ВИЧ-инфекция является широко распространенным и социально-значимым заболеванием. ВИЧ-инфекция приводит к развитию вторичного иммунодефицитного состояния и снижает резистентность к инфекционным заболеваниям, в т.ч. к гриппу и пневмококковой инфекции. В связи с этим, актуальна вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции и гриппа в данной группе риска. По данным исследований, при использовании 23-валентной пневмококковой полисахаридной вакцины (ПКВ23) на нее отвечают 91% ВИЧ-инфицированных, а продолжительность защиты составляет не менее 5 лет. Вакцинация против гриппа эффективна в 76% случаев, что ниже, чем у здоровых, и требует разработки новых препаратов и схем вакцинации.

*Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 80—87*

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, пневмококковая инфекция, грипп, бронхолегочная патология, вакцинопрофилактика

*D.V.Pakhomov, K.V.Mashilov, A.M.Kostinova*

## **IMMUNOPROPHYLAXIS IN THE TREATMENT OF HIV-INFECTED PATIENTS IN BRONCHOPULMONARY PATHOLOGY**

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

HIV-infection is a widespread and social importance disease. HIV-infection leads to secondary immunodeficiency and lower resistance to infectious diseases, such as influenza and pneumo-



coccal infection. In this regard, the relevant vaccination against pneumococcal infection and influenza in the risk group. According to research, 91% HIV-infected respond to the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PKV23), and duration of immunity is 5 and more years. Vaccination against influenza had effect in 76% patients, it was lower, than in health control. This data suggests, that new vaccines and immunization scheme are needed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 80—87

Key words: HIV-infection, pneumococcal infection, influenza, bronchopulmonary pathology, vaccination

Как известно, ВИЧ-инфекция, обусловленная инфицированием лимфоцитов, макрофагов и нервных клеток ретровирусами, проявляется медленно прогрессирующим иммунодефицитом: от бессимптомного носительства до развития тяжелых и смертельных оппортунистических заболеваний.

Причиной их развития служит синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) — вторичный иммунодефицитный синдром, развивающийся в результате ВИЧ-инфекции. Синдром приобретенного иммунодефицита обусловлен тем, что сам вирус иммунодефицита человека поражает активированные CD4<sup>+</sup>-клетки (моноциты, макрофаги и родственные клетки, экспрессирующие CD4-подобные молекулы). ВИЧ-инфекция является причиной развития вторичного иммунодефицитного состояния, приводящего к снижению резистентности организма и активации условно патогенных инфекций. Это приводит к развитию тяжелых форм различных вторичных инфекций, которые становятся причиной смерти больных. Воротами этих инфекций часто служат дыхательные пути. Наличие у этих больных преморбидной и интеркуррентной бронхолегочной патологии делает их особенно подверженными развитию вторичных бронхолегочных инфекций.

В связи с высоким уровнем распространенности и носительства пневмококковой инфекции в популяции, данный контингент является группой риска по развитию пневмококковой пневмонии. Известно, что у ВИЧ-инфицированных пациентов страдает как клеточное, так и гуморальное звено иммунной системы, что делает их особо восприимчивыми не только к пневмококковой инфекции, но и к гриппу, что приводит к его более тяжелому течению и большей вероятности осложнений.

Пневмококковая инфекция — ведущая бактериальная оппортунистическая инфекция у ВИЧ-инфицированных детей при 40-кратном повышении риска развития инвазивной пневмококковой инфекции (ИПИ) в отсутствие высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) [40, 42, 46]. У ВИЧ-инфицированных лиц старше 18 лет риск развития ИПИ существенно возрастает во всех возрастных группах (в 22,4; 12,2; 3,3 раза в сравнении со здоровыми соответствующих возрастных категорий: 18 — 49, 50 — 64, ≥65 лет соответственно) [49]. Важно отметить, что более 50% смертельных случаев от пневмококковой инфекции среди ВИЧ-инфицированных можно было бы предотвратить своевременно проведенной вакцинопрофилактикой.

Естественно, что у таких пациентов эффект вакцинации несколько отличается от эффекта, наблюдаемого у здоровых лиц. Так, по данным литературы иммунный ответ у детей, получавших ВААРТ, наблюдался в 63 — 93% случаев (в зависимости от серотипа пневмококковой вакцины). Через 5 лет защитные титры антител были выявлены у 5 — 24% детей [38, 39]. Введение бустерной дозы вакцины усилило иммунный ответ лишь на 3 из 7 серотипов [38]. Эффективность вакцины была снижена у ВИЧ-инфицированных детей из Южной Африки (65%, с дальнейшим снижением до 39%), в сравнении с 83% у здоровых детей [33, 37]. Среди детей, получавших ВААРТ, ответ на пневмококковую вакцину наблюдался у 29 — 100% привитых [45, 50]. Положительный эффект от введения бустеризи-

рующей дозы в настоящее время полностью не изучен, так как в различных исследованиях были получены противоречивые результаты [23, 37, 45, 50]. Дети, которым ВААРТ проводится с раннего возраста, имеют иммунный ответ, сопоставимый со здоровыми детьми, тогда как у тех, кому она проводится с более позднего возраста, он ниже [47].

Иммунный ответ на 23-валентную пневмококковую полисахаридную вакцину у ВИЧ-инфицированных взрослых был ниже, чем у здоровых, при этом он был выше у тех, кто получал ВААРТ [24, 28, 48]. Отмечено также, что у взрослых с содержанием CD4+ лимфоцитов менее 200 клеток/мкл иммунный ответ к некоторым серотипам пневмококка был значительно снижен [35].

В плацебо контролируемом исследовании эффективность 7-валентной конъюгированной вакцины у взрослых составила 74% [30]. Повторное введение данной вакцины приводило к росту титров антител, но лишь в течение 6 месяцев [26].

ВИЧ-инфицированные дети и взрослые с количеством CD4 $\geq$ 200 клеток/мкл (в среднем 717,0 клеток/мкл), вирусной нагрузкой <50 000 копий/мл (в среднем 2090,0 копий/мл), с отсутствием активных СПИД-ассоциированных заболеваний и ранее не привитые пневмококковой вакциной, получали 3 дозы Превенар 13. Такие показатели, как средние геометрические концентрации IgG и опсонофагоцитарная активность специфических противопневмококковых антител были достоверно выше после первой вакцинации Превенар 13 по сравнению с довакцинальным уровнем. На вторую и третью дозы (через 6 и 12 месяцев) развивался более высокий иммунный ответ, чем после однократной вакцинации Превенар 13.

По данным российских авторов, вакцинация ВИЧ-инфицированных 23-валентной пневмококковой полисахаридной вакциной приводит к формированию напряженного поствакцинального иммунитета с высоким уровнем серопротекции и значимым профилактическим эффектом в течение 2 лет после вакцинации [15]. Исследования, проведенные Беспаловой Л.И. и Мешковой Р.Я. (2007) показали, что при изучении специфических IgG после вакцинации у ВИЧ-инфицированных взрослых была выявлена различная динамика содержания антител к разным серотипам *S. pneumoniae*. Для антител к серотипам 6 и 9 характерно выраженное увеличение через 2 недели после вакцинации и сохранение их на этом уровне через 1 месяц (более 100 UE/ml). К 6 месяцу после вакцинации отмечалось небольшое снижение их содержания, но уровень все равно был достоверно выше, чем до вакцинации. Уровень IgG к *S. pneumoniae* 9 и 6 серотипов достоверно не отличался от здоровых лиц; IgG к серотипу 3 умеренно увеличивались через 2 недели после вакцинации и затем постепенно снижались, однако оставались достоверно выше, чем до вакцинации. В контрольной группе отмечалась подобная динамика, но более выраженная. Достоверное отличие между группами было отмечено по уровню антител через 6 месяцев после вакцинации.

В другом исследовании было показано, что у ВИЧ-инфицированных детей после вакцинации против пневмококковой инфекции сохранялись особенности иммунного статуса, характерные для естественного течения заболевания, обусловленного ВИЧ, при этом предикторы иммуносупрессии не зарегистрированы. Вакцинация не сопровождалась развитием необычных явлений, а нарастание IgG через 6 мес отмечено у 81% привитых, что почти не отличалось от группы ВИЧ-контактных (92%) и здоровых (90%) [5, 10, 12, 17, 18, 20, 21].

Вирус гриппа сам может вызывать у пациентов с ослабленным иммунитетом тяжелые вирусные пневмонии, носящие геморрагический характер. Но в первую очередь, вирусы гриппа, поражая эпителий дыхательных путей, создают чрезвычайно благоприятные условия для развития интеркуррентных и оппортунистических инфекционных процессов.

С этих позиций вакцинопрофилактику гриппа можно рассматривать как эффективный метод профилактики подобных осложнений. Правомерность такого подхода подтверждается целым рядом наблюдений. Так, по результатам много-

численных проведенных исследований у детей, получавших высокоактивную антиретровирусную терапию, защитные титры против вируса гриппа А(Н1N1) были выявлены у 57 — 100%, А(Н3N2) — у 50 — 100%; В — 56 — 76% [24, 36, 42]. При этом доля детей, давших сероконверсию на введение вакцин, была аналогичной здоровым детям, но средняя геометрическая титров антител — ниже, чем у здоровых детей [24, 44]. По результатам исследований инактивированная вакцина против вирусного гриппа эффективна у ВИЧ-инфицированных взрослых. В двойном слепом плацебо контролируемом исследовании у 506 взрослых ВИЧ-инфицированных эффективность составила 76% по предотвращению подтвержденной гриппозной инфекции, а частота сероконверсии: 53% к Н1N1, 61% к Н3N2 и 54% к вирусу гриппа В [41]. Вакцина против гриппа наиболее эффективна у ВИЧ-инфицированных взрослых, имеющих уровень CD4+ Т-лимфоцитов более 100 клеток на мкл [29]. У лиц с выраженной иммуносупрессией введение повторной дозы не приводит к улучшению результата [34, 43]. По данным литературы, во время пандемии 2009 г. ВИЧ-инфицированные в целом отвечали на инактивированные противогриппозные вакцины, особенно на препараты, содержащие адъюванты [25, 31, 32]. По результатам другого исследования, проведенного в 2009 году, ВИЧ-инфицированные дети и взрослые в 100% случаев ответили на адъювантную пандемическую вакцину А/Н1N1 MF59, показатели не отличались от группы контроля [27]. Следует отметить, в РФ в пред- и постпандемический период также широко применялась отечественная иммуноадъювантная пандемическая вакцина А/Н1N1, а в настоящее время — сезонная трехвалентная вакцина против вируса гриппа, характеризующаяся клинической безопасностью и иммунологической эффективностью для всех категорий пациентов из групп риска [3, 4, 6, 8, 9, 19]. Новым в вакцинопрофилактике ВИЧ-инфицированных детей, взрослых и других иммунокомпетентных и иммунокомпрометированных пациентов является сочетание прививки с применением различных иммуностимуляторов, которые модулируют поствакцинальный иммунитет, не отличающийся синтезом антител от здоровых [1, 2, 7, 11, 13, 14, 16, 22].

Появление убедительных аргументов, подтверждающих эффективность вакцинопрофилактики в комплексном лечении данного контингента больных, привело к тому, что сегодня, согласно рекомендациям ВОЗ/ЮНИСЕФ, вакцинация против пневмококковой инфекции рекомендуется ВИЧ-инфицированным, независимо от стадии заболевания. То же самое относится к рекомендациям Американского комитета по иммунизационной практике, согласно которым вакцинация против пневмококковой инфекции рекомендуется ВИЧ-инфицированным независимо от стадии заболевания, также, как и вакцинация против гриппа.

В настоящее время вакцинация ВИЧ-инфицированных пациентов против пневмококковой инфекции проводится в соответствии с инструкциями по применению пневмококковых вакцин, зарегистрированных в РФ. Вакцинация показана лицам, не имеющим острого заболевания, а также находящимся в ремиссии имеющихся у них хронических заболеваний. Поскольку уровень ответа антител обычно коррелирует с содержанием CD4+ Т-лимфоцитов в периферической крови, для лучшего иммунного ответа рекомендуется провести курс антиретровирусной терапии при их содержании ниже нормы (у взрослых — менее 200 клеток/мкл, у детей — менее 15%). В любом случае, при принятии решения о введении вакцины, врач должен самостоятельно сравнить риск и пользу, как от введения вакцин, так и нежелательных последствий, наступающих вследствие отказа от их введения.

При этом возможно одновременное введение инактивированной противогриппозной и пневмококковой вакцин различными шприцами в разные участки тела.

Рекомендации по вакцинации против пневмококковой инфекции пациентам с ВИЧ-инфекцией дают врачи-терапевты, врачи общей практики, инфекционисты

сты, пульмонологи, аллергологи-иммунологи, врачи стационаров перед выпиской пациента с ВИЧ-инфекцией.

Осмотр пациента с ВИЧ-инфекцией перед вакцинацией против пневмококковой инфекции проводит врач-терапевт или врач другой специальности.

Вакцинацию против пневмококковой инфекции у пациентов с ВИЧ-инфекцией проводят амбулаторно: в кабинете вакцинопрофилактики поликлиник, либо в частных медицинских центрах, занимающихся вакцинацией. В редких случаях при удовлетворительном состоянии пациентов, проживающих в местах, отдаленных от медицинских учреждений и при других обстоятельствах, допускается вакцинация при выписке из стационара.

После вакцинации необходимо наблюдение за пациентом в течение 30 — 45 минут с целью выявления возможных реакций гиперчувствительности немедленного типа. В случае их возникновения (развиваются крайне редко) необходимо принять соответствующие меры: антигистаминный препарат, системный глюкокортикостероид, по показаниям адреналин и т.д.

Необходимо помнить и информировать об этом пациента, что при вакцинации возможны местные реакции в месте введения (боль, покраснение, отек мягких тканей, уплотнение), а также общие (системные) реакции (головная боль, головокружение, дискомфорт, повышение температуры тела). Они возникают в первые 1 — 2 дня после введения вакцины, как правило, носят слабовыраженный или умеренный характер и проходят самостоятельно в течение первых 2 — 3 дней. При возникновении выраженной местной реакции следует назначить один из антигистаминных препаратов (например, цетиризин, дезлоратадин и др.) в стандартной дозировке в течение 1 — 2 дней. В случае повышения температуры выше 38,5°С следует принять внутрь парацетамол 500 мг. Возникновение кашля, насморка, боли в горле, суставах и мышцах чаще связаны с присоединением респираторной инфекции и не должны рассматриваться как реакция на введение вакцины. В редких случаях на введение вакцины может возникнуть аллергическая реакция в виде сыпи, зуда, что является показанием для назначения одного из антигистаминных препаратов до исчезновения указанных симптомов.

Для проведения вакцинации против пневмококковой инфекции не привитым ранее против нее пациентам с ВИЧ-инфекцией в возрасте 19 лет и старше (с CD4 Т-лимфоцитов  $\geq 200$  клеток/мкл) сначала вводится конъюгированная полисахаридная пневмококковая вакцина ПКВ13 (Превенар 13), через год — полисахаридная пневмококковая вакцина ППВ23 (Пневмовакс23), затем через 5 лет повторное введение ППВ23.

Пациенты с ВИЧ-инфекцией, получавшие ранее вакцинацию против пневмококковой инфекции с использованием полисахаридной пневмококковой вакцины ППВ23 в последующем не ранее, чем через один год вводится однократно конъюгированная полисахаридная вакцина ПКВ13, затем через 5 лет повторное введение ППВ23.

При проведении вакцинации против гриппа использование живых противогриппозных вакцины у ВИЧ-инфицированных пациентов противопоказано, однако возможно, применение всех зарегистрированных инактивированных противогриппозных вакцин. Противопоказанием для вакцинации против гриппа является наличие в анамнезе тяжелой аллергической реакции на овальбумин (белок куриного яйца). Наилучший эффект вакцинации достигается при ее осуществлении перед началом эпидемического сезона гриппа, хотя ее можно проводить круглогодично. Следует отметить, что частота возникновения общих системных и местных реакций после введения вакцин против гриппа существенно ниже, чем при использовании пневмококковых вакцин. В последующие годы вакцинацию рекомендуется проводить ежегодно в осенний период с применением инактивированных субъединичных и сплит-вакцин (уровень CD4+ Т-лимфоцитов более 100 клеток/мкл).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. (ред.). М., ГЭОТАР-Медиа, 2014.
2. Афиногенова В.П., Лукачев И.В., Костинов М.П. Иммуноterapia: механизм действия и клиническое применение иммунокорректирующих препаратов. Лечащий врач. 2010, 4: 9.
3. Вакцинация взрослых с бронхолегочной патологией. Руководство для врачей. Костинов М.П. (ред.). М., Созвездие, 2013.
4. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. Костинов М.П. (ред.). М., Мпресс, 2013.
5. ВИЧ-инфекция. Клинико-диагностические и лечебно-профилактические аспекты. Костинов М.П., Папуашвили М.Н., Сухинин М.В. (ред.). М., Боргес, 2004.
6. Зверев В.В., Костинов М.П., Черданцев А.П. и др. Вакцинация беременных против гриппа. Федеральные клинические рекомендации. М., 2015.
7. Клинико-иммунологическая эффективность иммунобиологических препаратов. Справочник. Костинов М.П., Озерецковский Н.А. (ред.). М., Миклош, 2004.
8. Костинов М.П. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. Практическое руководство для врачей. М., 2000.
9. Костинов М.П., Лавров В.Ф. Вакцины нового поколения в профилактике инфекционных заболеваний. М., МДВ, 2010.
10. Костинов М.П., Пахомов Д.В. Эффективность и безопасность вакцины Превенар у детей и взрослых групп риска. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 3 (52): 68-71.
11. Костинов М.П. (ред.). Иммунокоррекция в педиатрии: практическое руководство для врачей. М., Медицина для всех, 1997.
12. Костинов М.П., Снегова Н.Ф. Вакцинация детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей. Аллергология и иммунология 2013, 2: 58-68.
13. Костинов М.П., Соловьева И.Л. (ред.). Иммуномодуляторы и вакцинация. М., Мпресс, 2013.
14. Костинов М.П., Тарасова А.А. Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции и гриппа при аутоиммунных заболеваниях. М., МДВ, 2009.
15. Николенко В.В., Фельдблюм И.В., Воробьева Н.Н. и др. Характеристика поствакцинального пневмококкового иммунитета у ВИЧ-позитивных пациентов через 2 года после иммунизации. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013, 4: 27-30.
16. Новое в клинике, диагностике и вакцинопрофилактике управляемых инфекций. Костинов М.П. (ред.). М., Медицина для всех, 1997.
17. Пахомов Д.В., Костинов М.П., Поддубиков А.В., Ванеева Н.П., Снегова Н.Ф., Никитина Т.Н., Зинкина Т.Н., Сулоева С.В. Иммунологический эффект вакцинации против пневмококковой инфекции у ВИЧ-инфицированных детей. Журн. микробиол. 2009, 2: 48-52.
18. Пахомов Д.В., Снегова Н.Ф., Костинов М.П. К проблеме эффективности вакцинации детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, и ВИЧ-инфицированных детей против пневмококковой инфекции. Риски и преимущества. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2005, 5 (24): 53-54.
19. Руководство по клинической иммунологии в респираторной медицине. Костинов М.П., Чучалин А.Г. (ред.). М., АТМО, 2016.
20. Снегова Н.Ф., Костинов М.П., Пахомов Д.В. Опыт вакцинации против пневмококковой инфекции у ВИЧ-инфицированных детей и детей ВИЧ-инфицированных матерей. Вопросы современной педиатрии. 2006, 5 (1): 539-540.
21. Снегова Н.Ф., Харит С.М., Таточенко В.К., Костинов М.П. Прогнозирование эффективности вакцинации. Педиатрическая фармакология. 2010, 7 (2): 36-40.
22. Соловьева И.Л. Костинов М.П., Кусельман А.И. Особенности вакцинации детей с измененным премоорбидным фоном против гепатита В, кори, эпидемического паротита. Ульяновск, УлГУ, 2006.
23. Abzug M.J., Pelton S.I., Song L.Y. et al. Immunogenicity, safety, and predictors of response after a pneumococcal conjugate and pneumococcal polysaccharide vaccine series in human immunodeficiency virus-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2006, 25 (10): 920-929.

24. Amendola A., Pariani E., Viganò A. et al. Influenza surveillance in a cohort of HIV-infected children and adolescents immunized against seasonal influenza. *Vaccine*. 2010, 28 (15): 2700-2704.
25. Bickel M., von Hentig N., Wieters I. et al. Immune response after two doses of the novel split virion, adjuvanted pandemic H1N1 influenza A vaccine in HIV-1-infected patients. *Clin. Infect. Dis*. 2011, 52 (1): 122-127.
26. Crum-Cianflone N.F., Huppler Hullsiek K., Roediger M. et al. A randomized clinical trial comparing revaccination with pneumococcal conjugate vaccine to polysaccharide vaccine among HIV-infected adults. *J. Infect. Dis*. 2010, 202 (7): 1114-1125.
27. Esposito S., Tagliaferri L., Daleno C. et al. Pandemic influenza A/H1N1 vaccine administered sequentially or simultaneously with seasonal influenza vaccine to HIV-infected children and adolescents. *Vaccine*. 2011, 29(8): 1677-1682.
28. Falcó V., Jordano Q., Cruz M.J. et al. Serological response to pneumococcal vaccination in HAART-treated HIV-infected patients: one year follow-up study. *Vaccine*. 2006, 24: 2567-2574.
29. Fine A.D., Bridges C.B., De Guzman A.M. et al. Influenza A among patients with human immuno-deficiency virus: an outbreak of infection at a residential facility in New York City. *Clin. Infect. Dis*. 2011, 32(12): 1784-1791.
30. French N., Gordon S.B., Mwalukomo T. et al. A trial of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected adults. *N. Engl. J. Med*. 2010, 362(9): 812-822.
31. Ho J., Moir S., Wang W. et al. Enhancing effects of adjuvanted 2009 pandemic H1N1 influenza A vaccine on memory B-cell responses in HIV-infected individuals. *AIDS*. 2011, 25 (3): 295-302.
32. Kajaste-Rudnitski A., Galli L., Nozza S. et al. Induction of protective antibody response by MF59-adjuvanted 2009 pandemic A/H1N1v influenza vaccine in HIV-1-infected individuals. *AIDS*. 2011, 25 (2): 177-183.
33. Klugman K.P., Madhi S.A., Huebner R.E. et al. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N. Engl. J. Med*. 2003, 349 (14): 1341-1348.
34. Kroon F.P., van Dissel J.P., de Jong J.C. et al. Antibody response after influenza vaccination in HIV-infected individuals: a consecutive 3-year study. *Vaccine*. 2000, 18 (26): 3040-3049.
35. Kroon F.P., van Dissel J.T., Ravensbergen E. et al. Antibodies against pneumococcal polysaccharides after vaccination in HIV-infected individuals: 5-year follow-up of antibody concentrations. *Vaccine*. 1999, 18 (5-6): 524-530.
36. Levin M.J., Song L.Y., Fenton T. et al. Shedding of live vaccine virus, comparative safety, and influenza-specific antibody responses after administration of live attenuated and inactivated trivalent influenza vaccines to HIV-infected children. *Vaccine*. 2008, 26 (23): 4210-4217.
37. Madhi S.A., Adrian P., Kuwanda L. et al. Long-term effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* — and associated interactions with *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* colonization — in HIV-infected and HIV-uninfected children. *J. Infect. Dis*. 2007, 196 (11): 1662-1666.
38. Madhi S.A., Klugman K.P., Kuwanda L. et al. Quantitative and qualitative anamnestic immune responses to pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected and HIV-uninfected children 5 years after vaccination. *J. Infect. Dis*. 2009, 199 (8): 1168-1176.
39. Madhi S.A., Kuwanda L., Cutland C. et al. Quantitative and qualitative antibody response to pneumo-coccal conjugate vaccine among African human immunodeficiency virus-infected and uninfected children. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2005, 24 (5): 410-416.
40. Madhi S.A., Madhi A., Petersen K. et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 infection on the epidemiology and outcome of bacterial meningitis in South African children. *Int. J. Infect. Dis*. 2001, 5 (3): 119-125.
41. Madhi S.A., Maskew M., Koen A. et al. Trivalent inactivated influenza vaccine in African adults infected with human immunodeficient virus: double blind, randomized clinical trial of efficacy, immunogenicity, and safety. *Clin. Infect. Dis*. 2011, 52 (1): 128-137.
42. Madhi S.A., Petersen K., Madhi A. et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 on the disease spectrum of *Streptococcus pneumoniae* in South African children. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2000, 19 (12): 1141-1147.
43. Miotti P.G., Nelson K.E., Dallabetta G.A. et al. The influence of HIV infection on antibody responses to a two-dose regimen of influenza vaccine. *JAMA*. 1989, 262 (6): 779-783.
44. Montoya C.J., Toro M.F., Aguirre C. et al. Abnormal humoral immune response to influenza vaccination in pediatric type-1 human immunodeficiency virus infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2007, 102 (4): 501-508.

45. Nachman S., Kim S., King J. et al. Safety and immunogenicity of a heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in infants with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatrics*. 2003, 112 (1 Pt. 1): 66-73.
46. Nunes M.C., von Gottberg A., de Gouveia L. et al. The impact of antiretroviral treatment on the burden of invasive pneumococcal disease in South African children: a time series analysis. *AIDS*. 2011, 25 (4): 453-462.
47. Pensiero S., Cagigi A., Palma P. et al. Timing of HAART defines the integrity of memory B cells and the longevity of humoral responses in HIV-1 vertically-infected children. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009, 106 (19): 7939-7944.
48. Rodriguez-Barradas M.C., Alexandraki I., Nazir T. et al. Response of human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy to vaccination with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin. Infect. Dis*. 2003, 37 (3): 438-447.
49. Shea K.M., Edelsberg J., Weycker D. et al. Rates of pneumococcal disease in adults with chronic medical conditions. *Open Forum Infect. Dis*. 2014, 1 (1): ofu024.
50. Spoulou V.I., Tsoumas D.L., Papaevangelou V.G. et al. Immunogenicity and immunological memory induced by a 7-valent pneumococcal CRM197 conjugate vaccine in symptomatic HIV-1 infected children. *Vaccine*. 2005, 23 (46-47): 5289-5293.

*Поступила 17.01.18*

Контактная информация: Пахомов Д.В.,  
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*О.А.Меринова, А.В.Топорков, Л.К.Меринова, Е.В.Антонова, Д.В.Викторов*

## **БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ: АНАЛИЗ СОВРЕМЕННОГО СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ПОДГОТОВКИ СПЕЦИАЛИСТОВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

В обзоре изложено основное содержание проблемы биологической безопасности в современный период. Обсуждаются вопросы последиplomного образования в области биологической безопасности по программам профессиональной переподготовки и повышения квалификации, а также вопросы подготовки специалистов высшей квалификации. Отмечена необходимость формирования отдельной специальности «Биологическая безопасность» для специалистов медицинского и биологического профилей.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 87—96

Ключевые слова: биологическая безопасность, последиplomное образование, профессиональная переподготовка, повышение квалификации, подготовка специалистов высшей квалификации (аспирантура)

*О.А.Merinova, A.V.Toporkov, L.K.Merinova, E.V.Antonova, D.V.Victorov*

## **BIOLOGICAL SAFETY: ANALYSIS THE CONTEMPORARY STATE OF THE SYSTEM OF TRAINING SPECIALISTS IN RUSSIAN FEDERATION**

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

The review expounds the main content issues of biological safety in the modern period. The problems of postgraduate education in the field of biological safety through professional retraining and advanced training programs, as well as training of highly qualified specialists were discussed. The need to form a separate specialty “Biological Safety” for specialists in medical and biological profiles was noted.

Key words: biological safety, professional retraining, advanced training, postgraduate education, training for highly skilled specialist (postgraduate study)

Биологическая безопасность (ББ) является важной проблемой мирового сообщества. Актуальность ее определяется угрозами, исходящими от инфекционных болезней и их возбудителей, приобретающими в современном мире глобальный характер [5, 9, 10, 22, 24].

До недавнего времени основное содержание ББ было связано, главным образом, с вопросами санитарно-эпидемиологического благополучия населения, что в концепции ББ сегодня соответствует ее «узкому формату» [6, 11]. Современный этап эволюции взглядов на биологическую безопасность характеризуется существенным расширением ее основного содержания, что стало следствием возникновения угроз, способных создать в общественном здравоохранении чрезвычайные ситуации (ЧС), масштаб которых сопоставим с угрозой национальной и международной безопасности [3, 4, 6, 8, 11].

Классификация биологических угроз в настоящее время включает перечень опасных биологических факторов как естественной природы (инфекционные заболевания возникающие, возвращающиеся, новые, появляющиеся на новых территориях, природно-очаговые), так и искусственных угроз, обусловленных профессиональной деятельностью человека (усложнение и интенсификация исследовательских работ с использованием ПБА, неконтролируемое высвобождение или распространение живых организмов с неустановленными механизмами влияния на экосистемы, увеличение количества биологически опасных объектов с предельно допустимыми или полностью исчерпанными техническими и технологическими ресурсами, аварии на объектах, где проводятся работы с патогенными микроорганизмами) [5, 8, 11, 12, 30].

Отдельное место отводится биологическим угрозам, вызванным актами преднамеренного использования ПБА (биоагрессии, биотерроризм, «экологические войны»). Именно этот вид угроз, как наименее контролируемых, по мнению многих специалистов, представляет наибольшую опасность для человечества [8, 11, 26, 30]. Ведущие специалисты в области ББ прогнозируют также возможное появление принципиально новых угроз, связанных с передовыми биотехнологиями (геномными, постгеномными), и созданием биологического («молекулярного оружия») оружия нового поколения [6, 7, 21, 29, 30].

Очевидна отмеченная многими специалистами необходимость в постоянном развитии системы биологической безопасности. Формирование широкого взгляда на ББ определило ее существенные принципы, заключенные в разработанной в Российской Федерации системе надзора (мониторинга) в виде верификации, скрининга, индикации, идентификации, диагностики опасных биологических ситуаций и контроля за проведением мероприятий профилактического и экстренного характера по локализации и ликвидации ЧС биологического (санитарно-эпидемиологического) характера [6, 11]. Интеграция России в мировое пространство также диктует необходимость в совершенствовании санитарного законодательства, модернизации и развитии информационных технологий, создании специализированных баз данных ПБА и др. [9 — 12].

Таким образом, ББ в современных условиях одновременно с обширной областью деятельности становится отдельной областью знаний, объединяющей как практику, так и теорию защиты человека от опасных биотических факторов. С этой точки зрения биологическую безопасность можно рассматривать как развивающуюся научно-практическую дисциплину, которая опирается на новейшие достижения эпидемиологии, микробиологии, молекулярной биологии, молекулярной генетики, вирусологии, молекулярной медицины и других предметных областей.

Подготовка специалистов, обладающих знанием проблемы ББ в ее современ-



ной трактовке, компетентных в различных областях медицинских и биологических знаний занимает важное место в создании эффективной системы обеспечения биологической безопасности и рассматривается как одно из приоритетных направлений государственной политики в сфере биологической безопасности [13]. В соответствии с этим, целью обучения специалистов должно стать создание образовательной основы, на которую будет опираться российская система биологической безопасности, согласованной с российскими образовательными стандартами и существующими международными аналогами [6, 19].

На сегодняшний день совершенствование процесса подготовки специалистов в области ББ приобретает особую актуальность для учреждений медико-биологического профиля, поскольку проблема биобезопасности как область специальных знаний и прикладных разработок в значительной степени имеет непосредственное отношение к медицине и биологии.

В современных условиях образовательная база по биологической безопасности должна формировать у специалистов органов здравоохранения готовность к проведению комплекса санитарно-эпидемиологических мероприятий в ЧС, а также овладение необходимыми для этого знаниями, навыками и техническими приемами. Одновременно расширение концепции ББ требует от специалистов компетенции в разрабатываемых законодательных актах, нормативно-методических документах, регламентирующих безопасность по безопасной работе с ПБА различной патогенности, в вопросах санитарной охраны и противодействия биотерроризму на территории РФ и за ее пределами [6, 9, 10, 22].

Современное состояние российской системы профильного образования и профессиональной переподготовки в области биологической безопасности демонстрирует достаточно эффективные образовательные возможности, прежде всего, в области дополнительного профессионального образования, регламентированные законодательными документами и ориентированные на существующие Санитарные правила, практические руководства, рекомендации ВОЗ и Международные медико-санитарные правила [1, 2, 25, 27, 29].

Научно-исследовательские организации Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзора) и учреждения высшего профессионального образования Министерства здравоохранения осуществляют образовательную деятельность по биологической безопасности в рамках дополнительного профессионального образования для специалистов противочумных учреждений, отделов особо опасных инфекций Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, учреждений других министерств и ведомств (Приказ Министерства образования и науки РФ № 499 от 1.07.2013 г. «Об утверждении Порядка организации и осуществления образовательной деятельности по дополнительным профессиональным программам»).

Научно-исследовательские противочумные институты ежегодно проводят курсы профессиональной переподготовки врачей и биологов по утвержденным руководителем Роспотребнадзора программам дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I — II групп», «Эпидемиология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I — II групп», «Зоология. Особо опасные зоонозные инфекции», содержащие разделы по биологической безопасности.

Указанные программы предполагают всестороннюю подготовку специалистов по разделам микробиологии, эпидемиологии, эпизоотологии, генетики, иммунологии, клинике, лечению, профилактике, лабораторной диагностике инфекций, в том числе, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации, а также способных вызывать чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения, имеющие международное значение. Определенное внимание уделяется также социально значимым инфекционным болезням, инфекциям, представляющим опасность для окружающих

или составляющие национальную и региональную проблему. Практические разделы программ направлены на приобретение слушателями навыков в лабораторной диагностике, соответствующих современным алгоритмам и методам специфической индикации и идентификации ПБА I — IV групп. По программе «Эпидемиология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I — II групп» дополнительно проводятся обучение слушателей принципам, стратегии и тактике работы врача-эпидемиолога при возникновении чрезвычайных ситуаций с эпидемическими последствиями, что предусматривает решение ситуационных эпидемиологических задач, максимально приближенных к реальным условиям, составленных на конкретных примерах выявления, локализации и ликвидации вспышек и эпидемий особо опасных инфекционных болезней (чума, холера, бруцеллез, сибирская язва, туляремия).

Программа «Зоология. Особо опасные зоонозные инфекции» направлена на приобретение современных теоретических знаний, профессиональных навыков и умений, необходимых для работы в природных очагах зоонозных инфекций. Одновременно программа включает сведения, касающиеся действующей на территории Российской Федерации законодательной, нормативно-методической документации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, санитарной охраны территорий от завода и распространения особо опасных инфекций.

Необходимо отметить, что реализуемые в Научно-исследовательских противочумных институтах Роспотребнадзора программы профессиональной переподготовки носят фундаментальный характер и отличаются широким образовательным диапазоном, позволяющим слушателям получать не только специальные теоретические знания, но приобретать практические навыки безопасной работы с ПБА I — IV групп в процессе реальных диагностических исследований с использованием вакцинных штаммов опасных патогенов и их имитаторов.

Наряду с курсами профессиональной переподготовки обучение специалистов медицинского и биологического профиля по вопросам ББ проводится в цикле образовательных программ повышения квалификации. На сегодняшний день разработано несколько таких программ: «Бактериология. Инфекционные болезни, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации», «Эпидемиология. Инфекционные болезни, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации», «Лабораторная микология», «Зоология», «Лабораторная диагностика и эпидемиологический надзор за холерой», «Бактериология», «Особо опасные инфекции», «ПЦР в диагностике инфекционных болезней и индикации патогенных микроорганизмов». Перечисленные программы составлены с учетом современного состояния знаний в соответствующих им профильных дисциплинах, одновременно они знакомят слушателей с новыми методами и приемами проведения различных исследований с соблюдением требований биологической безопасности.

Для получения дополнительного профессионального образования в сфере биологической безопасности специалистами Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» в последние годы были разработаны программы «Биологическая безопасность», «Противодействие биотерроризму», «Санитарная охрана территории Российской Федерации».

Программа повышения квалификации «Биологическая безопасность» предусматривает совершенствование у обучающихся знаний и навыков в области обеспечения биобезопасности при организации и проведении всех видов работ с ПБА, в том числе, в очагах особо опасных инфекций. Цикл усовершенствования включает теоретические разделы по биологической безопасности с оценкой биологических угроз и рисков, вопросы противодействия биологическому терроризму с акцентом на вероятные агенты биотерроризма, а также вопросы проведения специфической индикации и идентификации патогенных биологических агентов I — II групп.

Программа повышения квалификации «Противодействие биотерроризму» рассчитана на широкий круг слушателей — врачей-бактериологов, врачей-эпидемиологов противочумных учреждений, лабораторий ООИ Центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации, а также специалистов управления Роспотребнадзора, учреждений других министерств и ведомств, участвующих в предупреждении и ликвидации санитарно-эпидемиологических последствий чрезвычайных ситуаций. Программа направлена на совершенствование теоретических знаний, профессиональных навыков и умений, необходимых для организации и проведения мероприятий по ликвидации медико-санитарных последствий биотеррористического акта и связанной с ним чрезвычайной ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения противодействию биотерроризму. Содержание программы касается вопросов современной концепции биобезопасности, биологического терроризма, организации обеспечения биологической безопасности и биозащиты бактериологических лабораторий; проведения специфической индикации и диагностики особо опасных инфекций; организации, взаимодействия специализированных формирований Роспотребнадзора с лечебно-профилактическими подразделениями и учреждениями других служб и ведомств, участвующих в ликвидации последствий биологических террористических актов с применением ПБА.

Программа «Санитарная охрана территорий Российской Федерации» готовит специалистов учреждений Роспотребнадзора с высшим медицинским образованием к проведению мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации, включая санитарно-карантинный контроль в автомобильных, воздушных, морских, речных, железнодорожных пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации.

В предлагаемых образовательных циклах значительное место занимает подготовка персонала к овладению современными алгоритмами и методами лабораторной диагностики особо опасных инфекций, которые применяются не только в стационарных лабораториях, но и в полевых условиях. Учебные планы занятий содержат подробное рассмотрение вопросов биобезопасности на примере национальных правил, Рекомендаций ВОЗ и правил по биобезопасности США, Европейского Союза и Канады [25, 27, 29]. Учебный процесс организован с обязательным использованием средств индивидуальной защиты и соблюдением регламентированных СП правил биологической безопасности. Лабораторные помещения, предназначенные для проведения занятий, оборудованы инженерными системами биологической безопасности, предусмотренными соответствующими современными международными нормами [1, 2].

Отдельное внимание уделено вопросам профессионального риска сотрудников микробиологических лабораторий и мерам по его снижению. Именно высокий уровень профессиональной подготовки персонала микробиологических лабораторий, знание потенциальных источников и причин возможного заражения позволяют снизить профессиональный риск для сотрудников, осуществляющих работу с патогенными биологическими агентами [6, 20, 28].

Обязательной частью процесса обучения стали сертификационные тесты, позволяющие оптимизировать возможность проверки знаний слушателей и их самообучение. С этой целью в РосНИПЧИ «Микроб» разработана компьютерная программа «Комплексная программа самообучения и контроля знаний правил биологической безопасности работ с биологическими патогенными агентами I II групп», включающая разделы «Биобезопасность: правила работы с патогенными микроорганизмами в вопросах и ответах». Сертификационные тестовые задания в рамках учебных программ профессиональной переподготовки врачей и биологов «Бактериология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I — II групп» и повышения квалификации врачей и биологов «Бактериология. Инфекционные болезни, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации», подготовлены также

в Волгоградском НИПЧИ. Содержание тестов предполагает дифференцированный подход к контролю знаний специалистов разного профиля и уровня допуска к работе с ПБА.

Наряду с перечисленными программами профессиональной переподготовки и повышения квалификации в Научно-исследовательских противочумных институтах разработана и реализуется специальная программа «Подготовка личного состава специализированных противоэпидемических бригад для работы в чрезвычайных ситуациях». Кроме того, в РосНИПЧИ «Микроб» проводится обучение по программе «Подготовка по биологической безопасности членов специализированных противоэпидемических бригад с инженерно-техническим образованием».

Основу этих программ составляют положения нормативно-методических документов, регламентирующих функционирование СПЭБ, действующие законодательные и нормативно-методические документы по безопасности работы с ПБА, методические руководства по подготовке специализированных противоэпидемических бригад для работы в чрезвычайных ситуациях.

В соответствии с приказом Роспотребнадзора от 24.03.2015 № 231 «О деятельности специализированных противоэпидемических бригад, сформированных на базе противочумных институтов Роспотребнадзора», СПЭБ является мобильным формированием Роспотребнадзора постоянной готовности, экстренного реагирования и автономного функционирования, использующим современные диагностические, информационные технологии и оборудование, имеющим квалифицированный кадровый состав, способный решать задачи по ликвидации и предупреждению ЧС [6, 18]. Подготовка специалистов для работы в СПЭБ включает также получение знаний в области выявления и оценки рисков, возникающих при функционировании СПЭБ, применения технологий управления рисками и проведение учений и занятий по ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций с использованием мобильных лабораторий.

Среди учреждений Роспотребнадзора образовательную деятельность по подготовке и повышению квалификации специалистов проводят ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» по профилю биологической безопасности при работе с вирусами, в том числе I — II групп патогенности, и Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора по программам «Химическая, биологическая и бактериологическая безопасность. Основы безопасной работы» для слушателей со средним и высшим инженерным, техническим или технологическим образованием и «Биологическая безопасность и биозащита» для лиц с высшим и средним медицинским, медико-биологическим, биологическим, фармацевтическим, ветеринарным, техническим образованием. Для слушателей, имеющих медико-биологическое, биологическое, фармацевтическое, ветеринарное, техническое образование дополнительно реализуется программа «Прикладные аспекты биологической безопасности».

Помимо перечисленных специализированных учреждений медико-биологического профиля последипломное профессиональное образование в области биологической безопасности осуществляет также ряд учебных заведений высшего профессионального медицинского и биологического образования и учреждений науки. В частности, в Первом московском государственном медицинском университете им. И.М.Сеченова (медико-профилактический факультет послевузовского профессионального образования) разработана программа «Управление биологической безопасностью». Программа направлена на повышение профессиональной подготовки специалистов в области биологической безопасности и включает изучение принципов и основ организации систем управления биологической безопасностью, процедур и международных практик работы научно-исследовательских лабораторий уровней защиты BSL1-2, биотехнологических и микробиологических производств, клинических лабораторий; ознакомление с условиями и методами, обеспечивающими безопасность работы

с биологическими агентами, соответствующими уровню международных требований к обеспечению биологической безопасности в микробиологических лабораториях и производствах.

Некоторые университеты предлагают программы по биотехнологии и биологической безопасности, ориентированные на студентов и широкий круг специалистов медико-биологического профиля и реализуются в форме лекционных циклов и тематических семинаров. Этой цели служат также издаваемые практические руководства, монографии и периодически публикуемые материалы, посвященные различным вопросам биологической безопасности [5, 17, 23].

Однако изначальная подготовка не может считаться вполне достаточной для эффективного выполнения профессиональных функций. Поэтому ряд исследователей указывает на необходимость целенаправленно формировать у специалистов комплекс знаний и навыков, необходимых для определенных видов деятельности, которые в современном понимании определяются как «совокупность компетенций» [6, 14]. С этой целью для обеспечения безопасной работы с ПБА в программы обучения введен раздел «Профессиональные требования», разработан спектр общих и предметных (профессиональных) компетенций, составляющих модель компетентного специалиста в области ББ [16].

В рамках проблематики настоящего обзора в обсуждении нуждаются вопросы, касающиеся подготовки специалистов высшей квалификации. В существующем сегодня перечне направлений подготовки кадров высшей квалификации по программам обучения научно-педагогических кадров в аспирантуре (Приказ Министерства образования и науки № 1061 от 12 сентября 2013 года) отсутствует квалификация «Исследователь. Преподаватель-исследователь» по профилю «биологическая безопасность» и отсутствует соответствующий ей ФГОС. Нельзя не отметить, что квалификация «Исследователь» и «Преподаватель-исследователь» относятся к различным видам деятельности, которые осуществляются в различных учреждениях. Совершенно очевидно, что квалификация «Преподаватель-исследователь» может быть присвоена специалисту высшего учебного заведения, тогда как реальные проблемы ББ решаются профильными специалистами и требуют подготовки в специализированных областях знаний (эпидемиология, микробиология, биотехнология и т.д.).

Кроме того, на основании «Таблицы соответствия» отдельных направлений подготовки специалистов высшего образования, перечень которых утвержден данным приказом министерства образования и науки Российской Федерации и «Номенклатуры специальностей научных работников» (Письмо МОН РФ от 06.11.2013 г. № АК-2589/05 «О таблице соответствия»), подготовка научно-педагогических кадров в аспирантуре по специальности 05.26.06 «Химическая, биологическая и бактериологическая безопасность» проводится по направлению 20.06.01 «Техносферная безопасность».

При этом направление подготовки кадров 20.06.01 «Техносферная безопасность» включает наряду со специальностью 05.26.06 «Химическая, биологическая и бактериологическая безопасность» ряд других, в соответствии с номенклатурой специальностей научных работников, утвержденной Приказом Министерства образования и науки Российской Федерации от 25 февраля 2009 г. № 59. Однако, за исключением 05.26.02 «Безопасность в чрезвычайных ситуациях», все остальные специальности, по которым ведется подготовка кадров высшего образования, относятся к различным отраслям технических наук и лишь отчасти охватывают предметные области биологической безопасности.

В свою очередь, в паспорт специальности 05.26.06 «Химическая, биологическая и бактериологическая безопасность» также входят четыре отрасли науки: химические, технические, биологические и медицинские. Частично медицинский и биологический профиль ББ отражает «Формула специальности», в которой биомедицинские аспекты относятся к разработке научных основ биологической и бактериологической безопасности, технологий и средств защиты от воздействия

опасных биологических и бактериологических факторов, планированию угроз и ликвидации последствий, вызванных этими факторами. «Области исследований» специальности 05.26.06 «Химическая, биологическая и бактериологическая безопасность» также включают различные специализированные направления.

Таким образом, как следует из приведенных данных, область подготовки специалистов, обозначенная как 05.26.06 «Химическая, биологическая и бактериологическая безопасность», представлена обширным перечнем самостоятельных отраслей знаний и соответствующих им направлений исследований, которые с учетом их специфики могут рассматриваться в рамках отдельных специальностей. В то же время, в паспорте специальности 05.26.06 «Химическая, биологическая и бактериологическая безопасность» в разделах «Формула специальности» и «Области исследований» нет четкого разграничения между понятиями «биологическая» и «бактериологическая» безопасность, тогда как, с точки зрения современной трактовки ББ, «бактериологическая безопасность» является лишь частным определением «биологической безопасности».

Все сказанное позволяет считать вполне обоснованной необходимость формирования отдельной специальности «Биологическая безопасность» с медицинским и биологическим профилем, включая ветеринарные науки, тем более, что по направлению подготовки 06.06.01 «Биологические науки» специальность «биологическая безопасность» не представлена в принципе.

В настоящее время, образовательную деятельность в рамках подготовки научно-педагогических кадров высшей квалификации (аспирантура) по биологической безопасности из научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора осуществляет лишь РосНИПЧИ «Микроб» по специальности 05.26.02 «Безопасность в чрезвычайных ситуациях» (по отраслям). Исходя из «Формулы специальности» и «Области исследований», подготовка аспирантов проводится с учетом актуальных проблем обеспечения безопасности в чрезвычайных ситуациях природного, техногенного, биолого-социального и военного характера.

Последипломное профессиональное образование по программам подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению 20.00.00 «Техносферная безопасность и природообустройство» по специальности 05.26.02 «Безопасность в чрезвычайных ситуациях» (по отраслям) реализуется также в ряде организаций высшего профессионального образования различной ведомственной принадлежности.

Необходимо заключить, что как в образовательных учреждениях медицинского, ветеринарного и биологического профиля, так и в специализированных научно-исследовательских учреждениях отсутствует подготовка по специальности «Биологическая безопасность», как и соответствующая специальность ВАК, что создает трудности при планировании и представлении к защите диссертаций, выполненных в таких учреждениях.

Таким образом, развитие концепции биологической безопасности и ее обеспечения в современных условиях диктует необходимость в постоянном совершенствовании системы профильного высшего и дополнительного профессионального образования в этой области. Необходимость обеспечения биологической безопасности и управления биологическими рисками в таких областях научно-практической деятельности как эпидемиология, микробиология, иммунология, биологическая токсикология, молекулярная биология, генетика микроорганизмов, лабораторная и промышленная биотехнология, клиническая лабораторная диагностика требует разработки, внесения изменений и дополнений в стандарты обучения и содержание образовательных программ по биологической безопасности в рамках дополнительного профессионального образования (профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов), а также подготовки кадров высшей квалификации (аспирантура) с формированием отдельной специальности «Биологическая безопасность» для специалистов медицинского и биологического профиля.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.3118-13. Бюл. норм. и метод. докум. Госэпиднадзора. 2013, 3: 13 — 95-115.
2. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.2322-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2009.
3. Биологическая безопасность. М., Медицина, 2006.
4. Биологическая безопасность. Термины и определения. Изд. 2-е, испр. и доп. Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. М., Медицина, 2011.
5. Ковтун А.Л., Поклонский Д.Л. Анализ значимости технологий двойного назначения в современном рассмотрении проблем биологической безопасности. Молекулярная медицина. 2012, 5: 17-24.
6. Ляпин М.Н. Научное обоснование и совершенствование нормативно-методической базы профилактических (противоэпидемических) мероприятий на биологически опасном объекте: Автореф. дис. д-ра мед. наук. М., 2016.
7. Ляпин М.Н., Ежов И.Н., Дроздов И.Г., Кутырев В.В. Эволюция взглядов на проблему биобезопасности и формирование области специальных знаний. Молекулярная медицина. 2006, 3: 15-19.
8. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. Вестник РАН. 2003, 73: 195-204.
9. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Актуальные проблемы биологической безопасности в современных условиях. Часть 1. Концептуальные основы биологической безопасности. Вестник РАМН. 2013, 10: 4-13.
10. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Актуальные проблемы биологической безопасности в современных условиях. Часть 2. Понятийная, терминологическая и определительная база биологической безопасности. Вестник РАМН. 2013, 11: 4-11.
11. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Актуальные проблемы биологической безопасности в современных условиях. Часть 3. Научное обеспечение национального нормативирования широкого формата биологической безопасности. Вестник РАМН. 2014, 11: 118-127.
12. Онищенко Г.Г. О мерах по обеспечению биологической безопасности на территории Российской Федерации. Журн. микробиол. 2008, 5: 54-57.
13. Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу. Приказ Президента РФ от 1.11. 2013 № Пр-2573.
14. Пермяков О.Е., Менькова С.В. П.26. Диагностика формирования профессиональных компетенций. М., ФИРО, 2010.
15. Победимская Д.Д., Боровик Р.В., Коломбет Л.В., Тюрин Е.А., Нетесов С.В., Ремнев Ю.В., Пальцев М.А. Разработка и опыт реализации образовательной программы «Управление биологической безопасностью». Молекулярная медицина. 2009, 5: 5-10.
16. Попов Ю.А., Малюкова Т.А., Тихомирова Л.А., Кутырев В.В. Система подготовки специалистов по биологической безопасности в Российской Федерации. Инфекц. бол.: новости, мнения, обучение. 2016, 1: 11-18.
17. Противодействие биологическому терроризму. Практическое руководство по противоэпидемическому обеспечению. Под ред. Г.Г.Онищенко. М., 2003.
18. Пчелинцева М.В. Совершенствование нормативно-методического обеспечения системы противоэпидемических мероприятий при проведении работ с возбудителями инфекционных болезней в мобильных лабораториях специализированных противоэпидемических бригад: Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 2002.
19. Симонова Е.Г. Научно-методические и организационные основы системы управления эпидемическим процессом: Автореф. дис. д-ра мед. наук. М., 2010.
20. Симонова Е.Г. Разработка профилактических программ на основе оценки эпидемиологического риска. М., Первый МГМУ им. И.М.Сеченова, ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014.

21. Суранова Т.Г., Никифорова В.В. Состояние нормативной правовой базы по классификации биологических угроз. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2016, 21: 188-195.
22. Шкарин В.В., Ковалишена О.В. Новые инфекции: систематизация, проблемы, перспективы. Н. Новгород, НГМА, 2012.
23. Biorisk management. Laboratory biosecurity guidance. World Health Organization. 2013: Available from: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_EPR\\_20066.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_20066.pdf).
24. Biosafety and the environment. An introduction to the Cartagena Protocol on Biosafety. United Nations Environment Programme DEC/Information Unit for Conventions International Environment House, Geneva11-13, CH-1219, Switzerland. iuc@unep.ch, www.unep.org GE.03-01836/E.
25. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2009-2010 WHO-2008. World Health Organization [cited 2013 April 17]. Available from: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_HSE\\_EPR\\_2008\\_10.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_HSE_EPR_2008_10.pdf).
26. James B. Petro, Theodore R. et al. Biotechnology: Impact on Biological Warfare and Biodefense. J. Bioterr and Biodef. 2003, 1: 161-167. <http://www.medscape.com/viewarticle/462541> (accessed October 14, 2009).
27. Laboratory Biorisk Management Standard (CWA 15793:2008). Canada. 2008, 7-41. Available from: [www.cen.eu/CENORM/sectors/technicalcommitteesworkshops/workshops/ws31.asp](http://www.cen.eu/CENORM/sectors/technicalcommitteesworkshops/workshops/ws31.asp).
28. Perkins D., Danskin K. On the Front Line of Biodefense: The U.S. Department of Health and Human Services Support to International Biological Risk Management Regimes. J. Bioterr. Biodef. 2011, 2: 111.
29. Public health response to biological and chemical weapons: WHO guidance World Health Organization. 2004. Available from: <http://www.who.int/csr/delibepidemics/biochemguide/en>.
30. Suk G., Zmorzynska A., Hunger I. et al. Dual-use research and technological diffusion: re-considering the bioterrorism threat spectrum. PLoS Pathog. 2011, 7: 111.

*Поступила 10.11.17*

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

© Е.В.МАТОСОВА, Б.Г.АНДРЮКОВ

*Е.В.Матосова, Б.Г.Андрюков*

## **АНТИМИКРОБНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙТРОФИЛОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА**

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

Ключевую роль в неспецифической защите макроорганизма играют нейтрофилы — самый многочисленный пул лейкоцитов. Во время развития инфекции эти клетки фагоцитируют микроорганизмы, а также секретируют протеолитические ферменты, которые разрушают патогены в процессе дегрануляции. Кроме того, они образуют структуры, называемые внеклеточными нейтрофильными ловушками (NETs). В свою очередь, микроорганизмы выработали ряд механизмов, позволяющих им уклоняться от нейтрофильных атак, в том числе развиваясь в виде биопленок в организме хозяина. В связи с развитием молекулярных исследований и появлением в науке новых методов визуализации цель обзора охарактеризовать известные противомикробные механизмы нейтрофилов. В условиях нарастающей резистентности бактерий к антибиотическим препаратам антимикробные механизмы являются перспективными мишенями для фармакологической модуляции неспецифической защиты организма.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 96—105



Ключевые слова: нейтрофилы, инфекции, фагоцитоз, дегрануляция, внеклеточные нейтрофильные ловушки, нетоз, биопленки, планктонные формы микроорганизмов, антибиотикорезистентность

*E.V.Matosova, B.G.Andryukov*

## **ANTIMICROBIC MECHANISMS OF NEUTROPHILES AS PERSPECTIVE TARGETS FOR PHARMACOLOGICAL MODULATION OF NON-SPECIFIC PROTECTION OF THE ORGANISM**

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

Key roles in nonspecific protection of the macroorganism are played by neutrophils — the most numerous pool of leukocytes. During the development of infection these cells phagocytose of microorganisms and also secrete proteolytic enzymes that destroy extracellular pathogens. In addition, they form structures called neutrophil extracellular traps (NETs). But in response, microorganisms have developed a number of mechanisms that allow them to evade neutrophilic attacks, including developing in the form of biofilms in the host organism. In this case, biofilms introduce negative properties into the infectious process: a recurring course, a tendency to chronization, resistance to traditional antimicrobial agents, which can also indicate the inaccessibility of biofilm for cells of the immune system. The purpose of the review: in connection with the development of molecular research and the appearance in science of new methods of visualization, it is necessary to characterize the known antimicrobial mechanisms of neutrophils. In conditions of increasing resistance of bacteria to antibiotic drugs, antimicrobial mechanisms are promising targets for pharmacological modulation of nonspecific defense of the body.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 96—105

Key words: neutrophils; infections, phagocytosis, degranulation, neutrophil extracellular traps, NETosis, biofilms, planktonic forms of microorganisms, antibiotic resistance

Несмотря на то, что фагоцитарная гипотеза была предложена еще в 1883 году И.И.Мечниковым, значение нейтрофильных гранулоцитов в защите организма остается недооцененным. Долгое время нейтрофилы считались пассивными участниками эффекторного звена иммунной системы. Однако многочисленные исследования показали, что это наиболее активные и многочисленные фагоцитарные клетки, которые, препятствуя инфицированию организма хозяина, могут использовать как фагоцитоз, так и дегрануляцию, а также генерировать нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs).

Первой реакцией на микробную инвазию организма является покидание нейтрофилами сосудистого русла и их миграция к очагу инфицирования. Этот процесс состоит из трех основных этапов: иницирование адгезии нейтрофилов к активированным эндотелиальным клеткам, проникновение через сосудистую стенку и их миграция к месту заражения.

Процесс фагоцитоза протекает в несколько этапов: хемотаксис к микроорганизму, распознавание рецепторов, активация клеток, всасывание и переваривание патогена [1]. Хемотаксис — направленная миграция лейкоцитов в ткани хозяина в ответ на инфекцию и воспаление. Градиент концентрации хемоаттрактанта определяет направленное движение фагоцитов. Исследователи определяют две группы хемоаттрактантов как эндогенных, так и экзогенных [3]. Молекулы, высвобождаемые при гибели клеток, биоактивные пептиды (лейкотриен LTB<sub>4</sub>), хемокины (IL-8, CXCL2, CXCL1), провоспалительные цитокины (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), продуцируемые стромальными, эпителиальными и иммунными клетками, также могут быть хемоаттрактантами [7].

При инфицировании организма эндотоксины попадают в кровь, извлекаясь через

клеточные мембраны бактерий или при разрушении патогена. После этого они распознаются LPS-связывающим белком (LBP), циркулирующим в сыворотке крови и относящимся к острофазным белкам. Полученный белково-рецепторный комплекс LBP-LPS связывается с провоспалительными рецепторными комплексами, расположенными на поверхности нейтрофилов, содержащих Toll-подобный рецептор 4 (TLR4), кластер дифференцировки 14 (CD14) и миелоидный фактор дифференцировки 2 (MD-2). Дальнейший иммунный ответ организма инициируется с участием внутриклеточного TIR-домена сигнального рецептора и цитозольного адаптационного белка MyD88 [46].

Узнавание микроорганизмов нейтрофилами основано на обнаружении микроорганизмов с использованием классов поверхностных и внутриклеточных рецепторов. Нейтрофилы распознают посторонние объекты с использованием PRR [11]. В организме человека наиболее значимыми нейтрофильными структурами подобного типа являются Toll-подобные рецепторы (TLRs): TLR1, TLR2, TLR3, ... TLR10. Эти рецепторы имеют родственное родство в структуре и механизме действия. Каждый из TLRs связывается с его высококонсервативным микробным лигандом для распознавания. Лиганд является специфическим для больших групп микроорганизмов. TLRs также связываются с многочисленными эндогенными лигандами, которые образуются при повреждении собственных тканей организма (фибриноген, белки теплового шока и др.). Например, липопептиды являются лигандами для TLR1, а пептидогликаны грамположительных и грамотрицательных бактерий являются лигандами для TLR2, эндотоксин грамотрицательных бактерий — лиганд для TLR4 [34]. Связывание TLRs со специфическими лигандами приводит к активации нейтрофилов, замедляет их апоптоз и индуцирует секрецию цитокинов.

Опсонизация патогенов с участием классических опсонин IgG и с3b и рецепторов нейтрофилов Fcγ (FcγRI, FcγRII, FcγRIII) и лектинов C-типа (маннозные рецепторы, лектины, мутантные рецепторы) является мощным усилителем активности. Фагоцитоз неэффективен в отсутствие опсонизации патогена [7, 11, 46]. Однако при взаимодействии нейтрофилов с биопленками микробов опсонизация патогена не требуется, так как в матриксе содержатся вещества, которые активируют нейтрофилы [22].

Процесс разрушения инфекционных объектов нейтрофилами зависит от трех основных механизмов: 1) связанного с рецептором поглощения патогена с образованием вакуоли; 2) продуцирование в вакуолях высокотоксичных активных форм кислорода (ROS); 3) слияние вакуолей с нейтрофильными гранулами, содержащими различные антимикробные компоненты, с образованием фагосомы [12].

Далее образуется фаголизосома путем слияния фагосомы и содержимого гранул нейтрофилов (внутриклеточная дегрануляция). Внутриклеточное «переваривание» инфекционных агентов реализуется в результате активации двух сложных механизмов внутриклеточного уничтожения. Микроорганизмы внутри фаголизосомы уничтожаются действием содержимого гранул, таких как дефенсины, кателицины, катепсины, пентаксины и лактоферрин, при кислород-независимом механизме киллинга [36, 43].

Окислительное уничтожение основывается исключительно на производстве противомикробных ROS с помощью NADPH-оксидазного комплекса (NOX). Этот процесс также называют «респираторным взрывом», потому что потребление глюкозы и кислорода увеличивается в несколько раз в течение нескольких секунд [43].

NOX инициирует окислительный или респираторный взрыв, превращая кислород в супероксид, который с помощью супероксиддисмутаза расщепляет перекись водорода. Перекись водорода, в свою очередь, используется миелопероксидазой (MPO) для образования более токсичных ROS [11]. ROS одинаково токсичны как для объектов фагоцитоза, так и для нейтрофилов. Поэтому перекись водорода может быть превращена в воду под действием каталазы [36]. Кроме того, миелопероксидаза превращает перекись водорода в хлорноватистую кислоту, которая обладает мощной антимикробной активностью и является аутокринным регулятором активации нейтрофилов [13].

Респираторный взрыв изменяет экспрессию ряда генов, в результате чего гранулоцит подвергается апоптозу после фагоцитоза. Другая форма программированной гибели нейтрофилов, возникающая после фагоцитоза — некроз, при котором нарушается целостность внешней мембраны и теряется сегментация ядра. Некроз связан с влиянием факторов бактериальной патогенности, которые вызывают повреждение и гибель нейтрофилов [2].

В результате контакта опсонизированного объекта с мембраной фагоцита фагосомы и гранулы сливаются. Для максимальной эффективности пищеварения это происходит в определенной последовательности [36, 37]. Процесс поглощения опсонизированных частиц при нейтрофильном фагоцитозе происходит менее чем за 20 секунд [40]. Однако микробные клетки в биопленках менее доступны для фагоцитоза, чем отдельные клетки, называемые «планктонными» клетками. Когда нейтрофилы взаимодействуют с биопленками *Staphylococcus aureus in vitro*, почти полное отторжение двухдневной биопленки происходит в течение 45-минутного воздействия. Это является следствием разрушения внеклеточного матрикса ферментативными продуктами фагоцитов, а также прямого фагоцитоза биопленки стафилококков нейтрофилами. Исследования показали, что внеклеточный матрикс биопленок (независимо от таксономической принадлежности образующих их микроорганизмов) содержит структуры, ослабляющие фагоцитарные реакции [9].

Биопленка — уникальное сообщество микробов, закрепленных на поверхности или между собой, заключенных в матрикс полимерных веществ, выделяемых клетками. Микробам в биопленке свойственен модифицированный фенотип, характеризующийся иными параметрами роста и экспрессии специфических генов [8]. Таким образом, свойства свободноживущих планктонных клеток и микроорганизмов, входящих в биопленку, существенно различаются. Например, клетки бактерий в биопленке обладают повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды, включая влияния различных антимикробных агентов [6, 21]. В этом случае биопленки вносят отрицательные свойства в инфекционный процесс: повторяющийся курс, склонность к хронизации, устойчивость к традиционным антибиотическим препаратам.

Популяция клеток в бактериальной биопленке неоднородна. Бактерии, которые образуют биопленки, могут быть как сессильными (находясь в составе самой биопленки), так и планктонными (при их дисперсии из биопленки). Планктонные бактерии могут впоследствии образовывать новые биопленки, то есть входить в сессильную форму, когда они фиксируются на биотическом или абиотическом субстрате [10]. Согласно исследованиям, клетки, высвобождаемые из биопленки, могут быть особенно эффективными при активации воспалительных и антиген-представляющих клеток и индукции клеточного апоптоза, а также вызывать более высокую продукцию провоспалительных цитокинов [26]. Вместе с быстрорастущими бактериями существуют так называемые «persisters» — особый тип микробных клеток, в которых замедляются обменные процессы, что помогает биопленке переживать неблагоприятные условия. Клетки-persisters формируются из свободноплавающих бактерий. Эти клетки повышают устойчивость к антибиотикам, что значительно усложняет лечение бактериальных инфекций [10, 44].

Структура биопленок включает бактериальные клетки (от 5 до 35% от общего объема биопленки), часто разных видов, могут присутствовать клетки грибов и вирусов. Основной объем занят слизистым межклеточным слоем, называемым матриксом биопленки или внеклеточным полимерным веществом. Матрикс состоит из полимеров мукополисахаридов и белков. Кроме того, матрикс включает липополисахариды, протеогликаны, гликопротеины, эндополисахариды, липиды, нуклеиновые кислоты и ионы металлов [8, 10]. Нуклеиновые кислоты представлены внеклеточной ДНК (eDNA) [23]. Химический состав матрикса отличается для разных микроорганизмов. Большинство бактерий в качестве экзополисахарида содержат либо линейный гомогликан  $\beta$ -1,6-N-ацетилглюкозамин, либо целлюлозу. Некоторые микроорганизмы одновременно синтезируют несколько внеклеточных полисахаридов, включая  $\beta$ -1,6-N-ацетилглюкозамин, целлюлозу и колановую кислоту [6]. Даже в пределах вида

состав внеклеточного полимерного матрикса может быть разнообразным: например, полисахариды различных штаммов термофильного стрептококка имеют различные мономерные композиции, коэффициенты и различные молекулярные массы [35].

Биопленка формируется в несколько этапов: первичная адгезия из окружающей среды, фиксация или окончательное (необратимое) прикрепление, созревание (созревание-I), рост (созревание-II), дисперсия (распространение).

По-видимому, нейтрофилы действуют на биопленку на начальных стадиях ее образования и на планктонные клетки в момент их распространения из биопленки. Когда образуется биопленка, клетки иммунной системы образуют физический барьер на поверхности биопленки. В этих местах накопления нейтрофилов их внутриклеточное содержимое (AMP, ROS и провоспалительные вещества) часто выделяется, нанося вред поверхностным слоям биопленки, а также тканям хозяина [29].

Дегрануляция нейтрофилов является одним из процессов экзоцитоза, в результате чего нейтрофильные гранулы сливаются с цитоплазматической мембраной, высвобождая арсенал ферментов, антимикробных пептидов и других молекул в окружающие ткани [11]. Вокруг активированных нейтрофилов в результате дегрануляции образуется мощная протеолитическая среда, которая необходима для хемотаксиса иммунных клеток и развития защитной воспалительной реакции [5].

Все типы гранул нейтрофила различаются по составу и обеспечивают антимикробную функцию нейтрофилов. В своих гранулах нейтрофилы содержат более 50 соединений: ферменты, пептиды, рецепторы, а также в процессе активации образуют токсические метаболиты кислорода, азота, липидов, цитокинов и антицитокинов, вторичные продукты протеолиза [4]. Гранулы делятся на четыре типа: первичные (азурофильные), возникающие в процессе дифференцировки на стадии промиелоцита; вторичные (специфические), возникающие при трансформации нейтрофилов в миелоциты; третичные или желатиновые гранулы [25]; секреторные (везикулы), появляющиеся в зрелых сегментированных формах [14]. Содержимое гранул высвобождается в цитоплазму и в межклеточное пространство строго детерминировано. Интенсивность этого процесса регулируется структурными изменениями актинового цитоскелета, которые зависят от ответа клеточных рецепторов на внешнее стимулирование сигнала [5].

Дегрануляция инициируется активацией нейтрофилов молекулярными паттернами грамотрицательных бактерий (липополисахаридов, ЛПС) и сопровождается секрецией провоспалительных цитокинов [39] при киллинге опсонизированных микроорганизмов или взаимодействии с белками внеклеточного матрикса, такими как фибронектин, коллаген и ламинин [47]. В качестве маркера дегрануляционной активности нейтрофилов используется ряд количественных показателей, таких как увеличение внеклеточной активности эластазы, снижение внутриклеточного содержимого первичных гранул, содержащих эластазу и сериновые протеазы [33], увеличение уровня ПМН-эластаза/альфа 1-протеиназа ингибиторов (PMN-E/alpha 1-PI) в плазме [20].

Нейтрофилы используют дегрануляцию вместе с фагоцитозом против биопленок [29]. Jesaitis et al. [30] обнаружили, что нейтрофилы оседали на биопленках *Pseudomonas aeruginosa*, где они подвергались дегрануляции, лишались подвижности из-за потери своих псевдоподий, и показывали изменение в структуре мембраны на стороне, прилегающей к бактериям. В присутствии бактерий опсонизированной сывороткой миелопероксидаза высвобождалась в среду. Выделение миелопероксидазы сопровождалось высвобождением другого компонента первичной гранулы,  $\beta$ -глюкуро니다зы. Лактоферрин, составляющий специфические гранулы нейтрофилов, высвобождался после контакта нейтрофилов с опсонизированными и неопсонизированными сывороткой биопленками, предотвращал образование биопленок *P. aeruginosa* путем повышения подвижности адгезивных бактерий [30]. Meyle et al. наблюдали дегрануляцию как ответ на биопленки *S. aureus*, что подтверждалось измерением высвобожденного лактоферрина и эластазы [38].

Морфологические изменения, происходящие в нейтрофильных гранулоцитах и отличающиеся от процесса апоптоза и некроза, были описаны Takei H. et al. в 1996

году [45]. В 2004 году Brinkmann V. et al. доказали существование внеклеточных ловушек нейтрофилов (NETs) и установили их антимикробный эффект в качестве важного звена врожденного иммунитета [15]. Результаты многочисленных научных исследований и наблюдений подтвердили и расширили первоначальные суждения о роли NETs в патогенезе бактериальных, вирусных, протозойных и грибковых инфекций. Некоторое время цель создания нейтрофильных внеклеточных ловушек была не совсем ясна, но вскоре после того, как это свойство было обнаружено в тучных клетках и эозинофилах, стало понятно, что эти большие внеклеточные структуры обеспечивают физический барьер против микробного распространения, изолируют и уничтожают микробные патогены, предотвращая дальнейшую колонизацию организма хозяина [17]. В настоящее время стратегия NETs прочно утвердилась в качестве одного из основных биологических механизмов, используемых нейтрофилами при инфекционных заболеваниях. Кроме того, нейтрофильные внеклеточные ловушки вовлечены во многие воспалительные и аутоиммунные нарушения и участвуют в регуляции неинфекционных процессов [16, 32]. Феномен формирования NETs — перспективная форма программируемой клеточной гибели (нетоз).

NETs состоят из деконденсированных волокон хроматина, покрытых антимикробными гранулированными и цитоплазматическими белками, такими как миелопероксидаза, нейтрофильная эластаза (NE),  $\alpha$ -дефенсины [42], положительно заряженные гистоновые белки (в 100 раз больше бактерицидной активности, чем у дефенсинов), а также различные ферменты и белки — более 30 компонентов [24].

Результаты многолетних исследований позволили установить механизмы образования внеклеточных ловушек нейтрофилов. На данный момент существуют данные о трех моделях формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек. Первая модель рассматривается как suicidal NETosis, длительностью 2 — 4 часа. Это наиболее описанная модель нетоза, как формы программируемой гибели клеток, связанная с нарушением целостности плазматической мембраны и высвобождением деконденсированного хроматина и содержимого гранул во внеклеточное пространство [27]. Эта модель NETosis зависит от NADPH-оксидазы и характеризуется изменением морфологии ядра, которое теряет свою специфическую структуру.

После связывания белково-рецепторного комплекса LBP-LPS с провоспалительными рецепторными комплексами, расположенными на поверхности нейтрофилов, кальциевые хранилища эндоплазматического ретикулаума выделяют  $Ca^{++}$  в цитоплазму (стадия 1). Повышенный уровень цитоплазматического кальция активирует семейство протеин киназы C (protein kinase C, PKC), которое непосредственно отвечает за активацию NADPH-оксидазы. NOX генерирует ROS и, в частности, супероксидные ионы. Генерация ROS приводит к разрыву гранул и ядерной оболочки (стадия 2). NE и MPO, обычно хранящиеся в азурофильных гранулах, мигрируют в ядро. NE разрушает линкер гистонов H1 и обрабатывает основные гистоны. В это же время катионы  $Ca^{++}$  действуют как кофакторы для пептидил-аргинин-деиминазы 4 (PAD4). Преобразование некоторых остатков аргинина в цитруллины в основных гистонах с помощью PAD4 исключает положительный заряд из этого остатка и, таким образом, ослабляет связывание гистонов с ДНК, способствуя деконденсации хроматина. MPO усиливает деконденсацию хроматина (стадия 3) [24, 49]. Наконец, нити цитоскелета сокращаются, цитоплазматическая мембрана теряет свою целостность, и активные вещества в виде молекулярного облака высвобождаются во внеклеточное пространство, формируя NETs. Это приводит к гибели клетки (стадия 4) [15].

Вторая модель формирования нейтрофильных ловушек — vital NETosis [48]. Остается открытым вопрос, можно ли считать этот процесс настоящим нетозом, поскольку после высвобождения NETs нейтрофилы все еще способны фагоцитировать патогены, и продолжительность их жизни не зависит от потери ДНК. Pilszczek F. et al. обнаружили диффузные структуры NETs, сформированные уже через 5 мин после инкубации с *S.aureus*. NETs были выпущены через небольшую область на поверхности нейтрофилов. Со временем NETs заполнили всю область обзора, и NETs из нескольких нейтрофилов слились. Признаков лизиса нейтрофилов авторы не обнаружили [41]. Byrd A. S. et al. сообщили, что наблюдали высвобождение NETs через 30 минут

после контакта нейтрофилов с *Candida albicans*, обработанных фибронектином. Фибронектин подавлял продуцирование ROS [19], что указывает на отличие между этой моделью образования внеклеточных нейтрофильных ловушек и суицидальным нетозом. Из-за короткого периода времени, необходимого для формирования NETs, этот процесс также был назван быстрым нетозом.

После стимуляции *S. aureus* нейтрофилы подверглись массивному расширению между внутренней и внешней ядерными мембранами, называемому blebbing. Внутри этого разделения ядерной мембраны были пряди ДНК со связанными нуклеосомами, имевшие ультраструктурный вид «бисера на струне». Позднее в цитоплазме активированных нейтрофилов наблюдались везикулы, отпочкованные из ядерной оболочки, в просвете которых были «бусины на струне» нитей ДНК. Но разрушение ядерной мембраны не было очевидным. Эти везикулы высвобождались во внеклеточное пространство, где они затем лизировались, а их содержимое формировало NETs. Некоторые цитоплазматические гранулы также высвобождались во внеклеточное пространство или сливались с плазматической мембраной, при этом содержимое гранул и ДНК везикул смешивалось во внеклеточном пространстве. Полное разрушение ядерной оболочки чаще всего наблюдалось через 60 мин, и ДНК заполняла цитоплазму. Но это не приводило к гибели нейтрофила [41].

Третья модель рассматривается как альтернативный механизм vital NETosis, который связан с образованием внеклеточных нейтрофильных ловушек из митохондриальной ДНК интактных нейтрофилов при индукции ROS. Везикулы, выпущенные из митохондрий во внеклеточное пространство, содержат ДНК, которые собираются в NETs. Исследования Yousefi S. et al. показали, что в высвобожденной из клетки ДНК были обнаружены только митохондриальные гены, что указывало на то, что активированные нейтрофилы специфически выделяют митохондриальную ДНК. Также как vital NETosis с выделением ядерной ДНК, этот механизм требует активации нейтрофилов, протекает быстро (уже через 15 — 20 минут после активации) и не связан с гибелью клеток [50].

Независимо от модели образования нейтрофильные внеклеточные ловушки представляют собой большие внеклеточные структуры с электростатическим зарядом [18] и сильно локализованной бактериальной активностью. Они способны обеспечивать физиологический барьер, предотвращать распространение микроорганизмов и увеличивать интерстициальную локализацию противомикробных веществ, что в конечном итоге инактивирует факторы бактериальной патогенности [16]. Микроорганизмы, попавшие в ловушки, теряют мобильность и впоследствии устраняются макрофагами. Исследования показали влияние NETs на планктонные формы грамположительной и грамотрицательной флоры, грибов, на внутриклеточные микроорганизмы, а также на простейших, которые во много раз больше нейтрофилов [17, 18, 28, 49]. Имеются данные об образовании NETs при взаимодействии нейтрофилов и биопленок *S. epidermidis* [22].

С биопленками *S. albicans* ситуация несколько отличается. Johnson C. et al. [31] исследовали реакцию нейтрофилов во время роста биопленки *S. albicans*. В отличие от планктонных *S. albicans*, биопленки вызывали незначительное высвобождение внеклеточных ловушек нейтрофилов. После опознавания биопленки нейтрофилы округлились и стали прилипать к гифам. Через 1 час нейтрофилы были явно прикреплены к гифам и демонстрировали расширенные филоподии, часто растягивающиеся на несколько гиф. Однако через 4 ч нейтрофилы снова оказались округлыми и неактивными. Нейтрофилы оставались жизнеспособными в это время, но очень немногие из них выпустили NETs. По мнению авторов, матрикс биопленки *S. albicans* ингибирует высвобождение внеклеточных ловушек нейтрофилов, способствуя уклонению от иммунитета и обеспечивая преимущество выживания [31].

Таким образом, в настоящее время общепризнаны 3 механизма антибактериальной защиты нейтрофилов: фагоцитоз, дегрануляция, формирование нейтрофильных

внеклеточных ловушек (NETs). Открытие NETs произошло благодаря развитию молекулярных биологических методов и улучшению качества методов визуализации. Образование NETs характеризуется выбросом генетического материала с содержимым цитоплазмы и гранул на скопление крупных патогенов, формированием сетеподобных фибриновых структур. Номенклатурный комитет по клеточной гибели (NCCD) в 2009 году рекомендовал феномен формирования NETs считать новой формой ПКГ под названием нетоз (NETosis). Антибактериальные стратегии нейтрофилов рассматриваются как перспективное направление для фармакологических модуляций в условиях нарастающей резистентности к традиционной антибиотической терапии.

*Авторы выражают признательность Быниной Марине Павловне (НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова) за помощь в подготовке материалов.*

*Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток», проект № 18-5-099.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Матосова Е.В. Антимикробные стратегии нейтрофилов при инфекционной патологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2016, 61 (12): 825-833.
2. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Матосова Е.В. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов от патогенных бактерий. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2017, 68 (1): 4-18.
3. Гоженко А.И., Бабий В.П., Котюжинская С.Г., Картавенко Н.П. Механизмы хемотаксиса лейкоцитов при воспалении. Актуальные проблемы транспортной медицины. 2006, 3 (5): 56-63.
4. Долгушин И.И., Савочкина А.Ю. Секреторные функции нейтрофилов. Аллергология и иммунология. 2015, 16 (2): 210-212.
5. Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П. Секреторная дегрануляция нейтрофилов как триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль сериновых лейкоцитарных протеаз и протеолитически активируемых рецепторов. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011, 1 (56): 79-87.
6. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Кутырев В.В. Бактериальная биопленка и особенности ее образования у возбудителя чумы и других патогенных иерсиний. Проблемы особо опасных инфекций. 2011, 4 (110): 5-11.
7. Лядова И.В., Цыганов Е.Н., Костюкевич М.В. Нейтрофилы при туберкулёзе: протекция или патология? Туберкулез и болезни легких. 2012, 89 (7): 12-21.
8. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка? Практическая медицина. 2011, 5 (53): 7-10.
9. Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета. Вестник РАМН. 2012, 12: 22-29.
10. Шлепотина Н.М., Плоткин Л.Л., Белов В.В. Микробиологическое и клиническое значение биопленочных инфекций. Уральский медицинский журнал. 2014, 4 (118): 106-112.
11. Bardoel B.W., Kenny E.F., Sollberger G. et al. The balancing act of neutrophils cell host and microbe. Cell Host Microbe. 2014, 15 (5): 526-536.
12. Benarafa C., Simon H.U. Role of granule proteases in the life and death of neutrophils. Biochem Biophys Res. Commun. 2017, 482 (3): 473-481.
13. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity. 2010, 33 (5): 657-670.
14. Borregaard N., Sørensen O.E., Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. Trends Immunol. 2007, 28 (8): 340-345.
15. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004, 303 (5663): 1532-1535.
16. Brinkmann V., Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. Nat. Rev. Microbiol. 2007, 5 (8): 577-582.
17. Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? J. Cell Biol. 2012, 198 (5): 773-783.
18. Bruns S., Kniemeyer O., Hasenberg M. et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. PLoS Pathog. 2010, 6 (4): e1000873.
19. Byrd A.S., O'Brien X.M., Johnson C.M. et al. An extracellular matrix-based mechanism of rapid

- neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J. Immunol.* 2013, 190 (8): 4136-4148.
20. Cojocaru I.M., Cojocaru M., Burcin C. Evaluation of granulocyte elastase as a sensitive diagnostic parameter of inflammation in first ischemic stroke. *Rom. J. Intern. Med.* 2006, 44 (3): 317-21.
  21. Cooper R.A., Bjarnsholt T., Alhede M. Biofilms in wounds: a review of present knowledge. *J. Wound Care.* 2014, 23 (11): 570, 572-574, 576-580.
  22. Dapunt U., Hansch G.M., Arciola C.R. Innate immune response in implant-associated infections: neutrophils against Biofilms. *Materials.* 2016, 9(5); 387.
  23. Das T., Sehar S., Manefield M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ. Microbiol. Rep.* 2013, 5 (6): 778-786.
  24. Delgado-Rizo V., Martínez-Guzmán M.A., Iñiguez-Gutierrez L. et al. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An overview. *Front. Immunol.* 2017, 8: 81.
  25. Faurischou M., Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microb Infect.* 2003, 5 (14): 1317-1327.
  26. Franca A., Perez-Cabezas B., Correia A. et al. *Staphylococcus epidermidis* biofilm-released cells induce a prompt and more marked in vivo inflammatory-type response than planktonic or biofilm cells. *Front. Microbiol.* 2016, 7: 1530.
  27. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biology.* 2007, 176 (2): 231-241.
  28. Guimarães-Costa A.B., Nascimento M.T., Froment G.S. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *PNAS USA.* 2009, 106 (16): 6748-6753.
  29. Hirschfeld J. Dynamic interactions of neutrophils and biofilms. *J. Oral Microbiol.* 2014, 6: 26102.
  30. Jesaitis A.J., Franklin M.J., Berglund D. et al. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J. Immunol.* 2003, 171 (8): 4329-4339.
  31. Johnson C.J., Cabezas-Olcoz J., Kernien J.F., et al. The extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* 2016, 12 (9): e1005884.
  32. Jorch S.K., Kuberski P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.* 2017, 23 (3): 279-287.
  33. Katsumata S., Nagashima M., Kato K. et al. Changes in coagulation-fibrinolysis marker and neutrophil elastase following the use of tourniquet during total knee arthroplasty and the influence of neutrophil elastase on thromboembolism. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2005, 49 (4): 510-516.
  34. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011, 34 (5): 637-650.
  35. Li X., Kong H., Mout R. et al. Rapid identification of bacterial biofilms and biofilm wound models using a multichannel nanosensor. *ACS Nano.* 2014, 8 (12): 12014-12019.
  36. Mankovich A.R., Lee C.Y., Heinrich V. Differential effects of serum heat treatment on chemotaxis and phagocytosis by human neutrophils. *PLoS One.* 2013, 8 (1): e54735.
  37. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2011, 11 (8): 519-531.
  38. Meyle E., Brenner-Weiss G., Obst U. et al. Immune defense against *S. epidermidis* biofilms: components of the extracellular polymeric substance activate distinct bactericidal mechanisms of phagocytic cells. *Int. J. Artif. Organs.* 2012, 35 (10): 700-712.
  39. Naegelen I., Beaume N., Plançon S. et al. Regulation of neutrophil degranulation and cytokine secretion: A novel model approach based on linear fitting. *J. Immunol. Res.* 2015, 2015: 817038.
  40. Nordenfelt P., Tapper H.J. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc Biol.* 2011, 90 (2): 271-284.
  41. Pilszczek F.H., Salina D., Poon K.K. et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 2010, 185 (12): 7413-7425.
  42. Porto B.N., Stein R.T. Neutrophil extracellular traps in pulmonary diseases: Too much of a good thing? *Front. Immunol.* 2016, 7: 311.
  43. Silva L.M., Muñoz-Caro T., Burgos R.A. Far beyond phagocytosis: Phagocyte-derived extracellular traps act efficiently against protozoan parasites in vitro and in vivo. *Mediators Inflamm.* 2016, 2016: 5898074.



44. Singh R., Ray P., Das A. et al. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *J. Med. Microbiol.* 2009, 58: 1067-1073.
45. Takei H., Araki A., Watanabe H. et al. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J. Leukoc Biol.* 1996, 59 (2): 229-240.
46. Tamassia N., Le Moigne V., Calzetti F. et al. The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J. Immunol.* 2007, 178 (11): 7344-7356.
47. Tavares N., Afonso L., Suarez M. et al. Degranulating neutrophils promote leukotriene B4 production by infected macrophages To kill leishmania amazonensis parasites. *J. Immunol.* 2016, 196 (4): 1865-1873.
48. Yang H., Biermann M.H., Brauner J.M. et al. New insights into neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in inflammation. *Front. Immunol.* 2016, 7: 302.
49. Yipp B.G., Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013, 122: 2784-2794.
50. Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009, 16 (11): 1438-1444.

*Поступила 04.12.17*

Контактная информация: Матосова Екатерина Владимировна,  
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1, р.т. 8 (423) 244-26-04

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*А.О.Семенцова<sup>1</sup>, В.Г.Дедков<sup>2,3</sup>, В.А.Терновой<sup>1</sup>, Е.В.Чуб<sup>1</sup>,  
С.А.Пьянков<sup>1</sup>, А.П.Агафонов<sup>1</sup>, Р.А.Максютов<sup>1</sup>, В.В.Малеев<sup>2</sup>, А.Ю.Попова<sup>4,5</sup>*

## **КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА. АНАЛИЗ СУЩЕСТВУЮЩИХ МЕТОДИК И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

<sup>1</sup>ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская обл.; <sup>2</sup>Центральный НИИ эпидемиологии; <sup>3</sup>НИИ медицины труда; <sup>4</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; <sup>5</sup>Российская медицинская академия последиplomного образования, Москва

Лихорадка Эбола — особо опасная вирусная инфекция, протекающая в виде геморрагической лихорадки, характеризующейся острым течением и высокой летальностью, обусловленной полиорганной недостаточностью и развитием инфекционно-токсического шока. Природные очаги лихорадки Эбола расположены в лесных районах центральной и западной частей Африканского континента. Долгие годы считалось, что заболеваемость лихорадкой Эбола носит спорадический характер и бремя ее актуально исключительно для эндемичных районов. Однако беспрецедентная по своим масштабам эпидемия лихорадки Эбола в 2013 — 2016 гг., вызванной вирусом Заир, существенно изменила представления о данном заболевании и о закономерностях его распространения. Во время эпидемии были выявлены слабые места в организации противоэпидемических мероприятий, эффективность которых оказалась на начальном этапе не очень высокой, в том числе и по причине отсутствия диагностических средств. Тем не менее, в ходе ликвидации эпидемии в Западной Африке система противоэпидемических мероприятий была существенно изменена, во многом благодаря оперативно разработанным средствам лабораторной диагностики. Данный обзор посвящен анализу методов и средств лабораторной диагностики лихорадки Эбола с учетом опыта, полученного в ходе эпидемии 2013 — 2016 гг. в Западной Африке.

*Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 105—116*

Ключевые слова: лихорадка Эбола, молекулярная диагностика, иммунохроматография, ИФА

*A.O.Sementsova<sup>1</sup>, V.G.Dedkov<sup>2,3</sup>, V.A.Ternovoy<sup>1</sup>, E.V.Chub<sup>1</sup>,  
S.A.Pyankov<sup>1</sup>, A.P.Agafonov<sup>1</sup>, R.A.Maksyutov<sup>1</sup>, V.V.Maleev<sup>2</sup>, A.Yu.Popova<sup>4,5</sup>*

## **IN VITRO DIAGNOSIS FOR EBOLA VIRUS DISEASE. A COMPARISON OF CURRENT TECHNIQUES AND DIAGNOSTIC ASSAYS**

<sup>1</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region; <sup>2</sup>Central Research Institute of Epidemiology; <sup>3</sup>State Institute of Occupational Health; <sup>4</sup>Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; <sup>5</sup>Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia

Ebola virus disease is dangerous viral infection, occurring in the form of hemorrhagic fever, characterized by acute clinical symptoms and high mortality rate due to multiple organ failure. Ebola virus natural foci are located in forested areas of the central and western parts of Africa. It was believed for many years, the incidence of Ebola virus disease has been sporadic and the burden of it is true only in endemic areas. However, the unprecedented Ebola epidemic caused by Zaire virus in 2013 — 2016, has significantly changed our understanding of this disease and the patterns of its distribution. We have also identified weaknesses in the organization of anti-epidemic measures, the effectiveness of which was not very effective at the onset of the epidemic, in particular due to weak development of in vitro diagnostics (IVD). However, during the elimination of the epidemic in West Africa, anti-epidemic system has been modified substantially, largely due to quickly developed IVD kits. This review is devoted to analysis of trends in IVD for Ebola virus disease based on the experience obtained in the course of the West-African epidemic in 2013 — 2016.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 105—116

Key words: Ebola fever, molecular diagnostics, immunochromotography, ELISA

Лихорадка Эбола — особо опасное заболевание человека и животных, этиологическими агентами которого являются вирусы рода *Ebolavirus*, принадлежащего к семейству *Filoviridae*. В настоящее время род *Ebolavirus* насчитывает пять самостоятельных видов: Заир эболавирус (*Zaire ebolavirus*, ZEBOV), Судан эболавирус (*Sudan ebolavirus*, SUDV), Бундибугё эболавирус (*Bundibugyo ebolavirus*, BDBV), Таи Форест эболавирус (*Tai Forest ebolavirus*, TAFV) и Рестон эболавирус (*Reston ebolavirus*, RESTV) [25]. Вирусы ZEBOV, SUDV и BDBV при инфицировании человека вызывают острые лихорадки, которые объединены в общую нозологическую форму, получившую название лихорадка Эбола [28]. Вирус TAFV также патогенен для человека, однако вызывает лихорадочные состояния, напоминающие клинически лихорадку денге [30]. Вирус RESTV вызывает тяжелую геморрагическую лихорадку у приматов, но не патогенен для человека [15].

Лихорадка Эбола характеризуется высокой летальностью, которая при отсутствии надлежащего лечения варьируется по разным оценкам от 65 — 75% для ZEBOV до 55 — 58% для SUDV и BDBV [28, 31]. С эпидемиологической точки зрения лихорадка Эбола является природно-очаговым зоонозом с контактным механизмом передачи. При этом в качестве наиболее вероятного резервуара для ее возбудителей принято рассматривать крыланов из подотряда *Megachiroptera* рукокрылых (*Chiroptera*), включающего единственное семейство *Pteropodidae* [4]. Однако окончательно вопрос о природном резервуаре вирусов рода *Ebolavirus* к настоящему времени не разрешен.

Впервые человечество столкнулось с лихорадкой Эбола в 1976 г., когда сначала в Судане, а затем и в республике Заир (в настоящее время Демократическая республика Конго, ДРК) возникли вспышки, вызванные вирусами SUDV и ZEBOV. Наибольшее количество пострадавших было зарегистрировано в республике Заир. Оно составило 318 случаев [12, 13]. В период с 1976 по 2013 гг. ВОЗ зарегистрировала 24 спорадические

вспышки лихорадки Эбола. При этом суммарное количество заболевших составило 1716 случаев, а летальность варьировалась в диапазоне от 25% до 90% [16]. Однако вспышка 1976 г. в ДРК до недавнего времени считалась крупнейшей.

В декабре 2013 г. на территории республики Гвинея возникла вспышка лихорадки Эбола, вызванная вирусом ZEBOV, которая распространилась на пять стран, включая Гвинею, Либерию, Нигерию, Сенегал и Сьерра Леоне. Особенностью данной вспышки, переросшей в эпидемию, стало то обстоятельство, что территорией распространения инфекции стала западная Африка, где ранее циркуляция вирусов рода *Ebolavirus* не наблюдалась. По этой причине и в силу плохого оснащения лабораторной службы выявление возбудителя произошло с большой задержкой, что привело к запаздыванию соответствующих противоэпидемических мероприятий и распространению инфекции из сельской местности на городские территории с общим количеством населения около 25 миллионов человек. Суммарное количество пострадавших в результате эпидемии 2013 — 2016 гг. составило 28 652, при этом 11 325 случаев закончилось летально [22]. Фактически, будучи занесенным в городскую черту, вирус распространялся как контактный антропоноз, при этом оценочное значение показателя базовой скорости репродукции составило около 1,8 [24].

Эпидемия лихорадки Эбола 2013 — 2016 гг. продемонстрировала слабую готовность как национальных, так и международных организаций здравоохранения к оперативному реагированию на возникающие вызовы подобного типа. Понадобилось более двух лет и усилия всего мирового сообщества, чтобы взять под контроль и ликвидировать эту эпидемию. Одной из серьезных проблем оказалось и слабое развитие средств лабораторной диагностики. Однако острая необходимость диктовала свои условия, вследствие чего за короткий промежуток времени было разработано большое количество как коммерчески доступных наборов для диагностики лихорадки Эбола, так и *in house* диагностик, основанных на различных методологических подходах. Данный обзор посвящен сравнению различных методов и средств диагностики лихорадки Эбола, применявшихся в ходе ликвидации эпидемии 2013 — 2016 гг. в Западной Африке.

*Принципы клинической лабораторной диагностики лихорадки Эбола.* Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний базируется на двух принципиально разных подходах: молекулярном, позволяющем выявлять нуклеиновые кислоты инфекционного агента в биологическом материале, и серологическом, основанном на выявлении продуктов реакции антиген-антитело — взаимодействии антигена инфекционного агента с антителами инфицированного макроорганизма. Оба подхода имеют право на существование и в клинической практике дополняют друг друга в общем случае. Однако при диагностике острых инфекций, таких как лихорадка Эбола, эффективность применения этих подходов существенно зависит от сроков проведения анализа. Это связано с запаздыванием развития иммунного ответа на внедрение возбудителя в организм.

Клинический дебют заболевания при инфицировании вирусом Эбола сопровождается лихорадкой и астенизацией больного, обусловленных виремией [34]. Наличие вируса в периферическом кровотоке, а также и в других биологических жидкостях позволяет осуществлять прямую детекцию его молекулярных маркеров либо антигенных структур на раннем этапе заболевания [10]. Анализ вспышки лихорадки Эбола в Киквите (1995, Демократическая Республика Конго) показал, что иммуноглобулины класса М обнаруживаются практически у всех больных на 10 — 29 сутки после появления симптомов заболевания, в большом проценте случаев иммуноглобулины класса М обнаруживаются с 2 до 168 дня с появления симптомов заболевания. Иммуноглобулины класса G обнаруживаются практически у всех больных, начиная с 19 суток и до 749 (срок наблюдения) суток после появления симптомов заболевания, к моменту вероятной смерти пациента [40].

Таким образом, выявление специфических антител к вирусам Эбола хотя и воз-

можно, но, согласно рекомендациям ВОЗ, используется исключительно как подтверждающий метод, метод ретроспективной диагностики либо скрининговый метод для изучения сероконверсии в популяционных эпидемиологических исследованиях [47]. Еще одним существенным ограничением на применение серологических методов диагностики лихорадки Эбола является необходимость проведения работ в помещениях с уровнем биологической безопасности BSL-4, что практически нереализуемо в странах, где данное заболевание является эндемичным [9].

Тем не менее, в настоящее время существует большое количество серологических протоколов для диагностики лихорадки Эбола, главным образом, в формате ИФА. Часть из них была разработана еще до эпидемии 2013 — 2016 гг. и предназначалась как для специфической диагностики отдельных эболавирусов [23, 27, 43], так и для скрининговых исследований на наличие антител ко всем представителям рода *Ebolavirus* [33, 35, 41]. Другая часть была разработана непосредственно в ходе последней эпидемии [21, 26]. При этом диагностическая специфичность методов на основе ИФА достигает 96%, а диагностическая чувствительность может достигать 100% при условии проведения исследований в оптимальное время [26].

Однако не одна из данных методик не была доведена до состояния коммерчески доступной тест-системы и ни одна не была рекомендована ВОЗ для использования в качестве диагностического теста. Тем не менее, на рынке диагностических препаратов стали появляться коммерчески доступные тесты в формате ИФА, например набор на основе рекомбинантного антигена нуклеопротеина (NP) — Human Anti-Zaire Ebola virus Nucleoprotein (NP) IgG ELISA Kit (AE-320520-1, Alpha Diagnostics International, USA), либо набор Human Ebola Virus IgG (EV-IgG) ELISA Kit (MBS9391225, My Bio Source, USA) «Human Anti-ZEBOV GP IgG» (AE-320620-1, Alpha Diagnostic Intl. Inc., USA). Следует отметить, что их диагностические характеристики не определены и данные наборы могут быть использованы исключительно в научных целях.

В Российской Федерации сотрудниками ГНЦ ВБ «Вектор» разработана и зарегистрирована в 2015 году в качестве изделия медицинского назначения диагностическая система в формате ИФА на основе очищенного природного антигена вируса Эбола «Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин». Данная система успешно применялась в ходе диагностических исследований, проведенных специализированной противоэпидемической бригадой Роспотребнадзора (СПЭБ) в Гвинейской Республике в 2014 — 2016 годах. При этом диагностическая специфичность системы достигала 99%, а чувствительность 98%, при доверительных вероятностях 90% [1].

*Иммунохроматографические экспресс-тесты.* «Быстрые» диагностические тесты (Rapid diagnostic tests, RDT) получили распространение в странах третьего мира, в том числе и африканских, в силу ряда неоспоримых преимуществ, а именно простоты использования, отсутствия необходимости в квалифицированном персонале и специализированном оборудовании, небольшого времени, необходимого для проведения исследования.

Принцип работы подобных тестов основан на выявлении антигенных детерминант возбудителя, связывающегося со специфическими антителами, в результате чего происходит образование иммунных комплексов. Далее иммунный комплекс вторично связывается с мечеными антивидовыми антителами против специфических антител к возбудителю. В результате реакции образуются окрашенные иммунные комплексы типа «сэндвич». Как правило, реализация работы данных тестов осуществляется в формате латеральной проточной ячейки, представляющей собой полосу фильтровальной бумаги, на которой в виде отдельных полос последовательно нанесены специфические и антивидовые антитела. Для анализа могут быть использованы любые биологические жидкости, содержащие вирус, но, как правило, используется кровь либо моча.

В ходе текущей эпидемии немецкая компания Senova GmbH активно продвигала свой быстрый хроматографический тест *Dediatest — Ebola kit*, выявляющий антиген VP40 вируса ZEBOV. Однако тест показал себя не с лучшей стороны и не получил одобрения ВОЗ по причине низкой чувствительности и специфичности. Другой бы-

стрый хроматографический тест ReEBOV Antigen rapid Test kit от компании Corgenix Inc., USA все же получил одобрение ВОЗ и Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, USFDA) на применение данного теста при проведении диагностики в полевых условиях. Также, категорически не рекомендовано применение данного теста в аэропортах, на железнодорожных вокзалах и прочих местах массового скопления людей для экспресс-диагностики лихорадки Эбола [47]. Это связано с достаточно низкими диагностическими характеристиками разработанного теста. Хотя разработчики утверждают, что диагностическая чувствительность составляет 100% при диагностической специфичности 92,2% [5]. Это, в общем-то, является приемлемым результатом, однако следует учитывать, что при проведении испытаний тестировались положительные образцы от пациентов в разгаре заболевания, т.е. имевших высокий титр вируса в крови. В то же время, при проведении независимых испытаний в процессе аккредитации были получены следующие диагностические показатели: диагностическая чувствительность 91,8%, диагностическая специфичность 84,6%. Значение аналитической чувствительности при этом составило всего  $2,1 \times 10^8$  копий/мл [48], что в десятки тысяч раз ниже чувствительности самых худших систем молекулярной диагностики вируса Эбола.

Уже после завершения эпидемии в Западной Африке еще два хроматографических теста — OraSure Ebola Rapid Antigen test (OraSure Technologies, USA) и SD Q Line Ebola Zaire Ag (SD Biosensor, South Korea) получили одобрение ВОЗ, однако результаты тестирования «быстрыми» тестами должны обязательно быть подтверждены молекулярными методами.

*Методы диагностики на основе ОТ-ПЦР.* Применение молекулярных методов для диагностики лихорадки Эбола имеет довольно длинную историю. Еще в 1995 году во время вспышки лихорадки Эбола в Киквите (ДРК) сотрудниками CDC (Center for Disease Control and Prevention, USA) была применена ОТ-ПЦР методика с электрофоретической детекцией ПЦР-продукта, основанная на амплификации фрагментов L, GP и NP генов определенной длины [42]. Методика продемонстрировала более высокие диагностические характеристики в сравнении с методом ИФА и методами, выявляющими антиген. В 1999 году CDC рекомендовал метод ОТ-ПЦР для диагностики острых случаев лихорадки Эбола. С тех пор данная методика прочно вошла в арсенал средств диагностики лихорадки Эбола и успешно применяется до сих пор, преимущественно в формате ОТ-ПЦР в реальном времени [6].

К началу эпидемии 2013 — 2016 гг. было разработано и апробировано большое количество протоколов на основе ОТ-ПЦР как в реальном времени, так и с электрофоретической детекцией, предназначенных для диагностики как отдельных представителей рода *Ebolavirus*, так и всей совокупности известных филовирусов. При этом в качестве мишени использовались фрагменты генов полимеразы (L-ген) [37, 42], гликопротеина (GP) [14], нуклеопротеина (NP) [20] и белка VP40 [11]. В виду небольшой востребованности из коммерчески доступных наборов на рынке существовала лишь одна тест-система RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 производства компании Altona GmbH, Germany, предназначенная для видовой идентификации всех представителей семейства Filoviridae. Данная тест-система явилась результатом коммерциализации методики, разработанной институтом тропической медицины им. Бернхарда Нохта в Гамбурге и была признана «золотым стандартом» диагностики филовиральных геморрагических лихорадок [37]. Однако в ходе проведения диагностических исследований оказалось, что существующие методики требуют корректировки в виду генетических различий ранее известных штаммов ZEBOV и штамма Маккона, вызвавшего эпидемию 2013 — 2016 гг. Наличие данной проблемы было теоретически продемонстрировано в работе Gire S.K. et al. [17]. Однако авторы затруднились оценить влияние этих генетических различий на диагностические характеристики существующих методик молекулярной диагностики. Проблема варибельности в целевой области коснулась и набора компании Altona, однако данная проблема была оперативно решена производителем, и к концу 2014 года появилась обновленная версия набора RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit, а также

и набор для определения только вируса ZEBOV — RealStar® Zaire Ebola virus RT-PCR Kit.

Отсутствие надежных средств молекулярной диагностики, а также драматическое увеличение количества пострадавших в ходе эпидемии послужило стимулирующим фактором развития молекулярных методик и коммерческих наборов на их основе для диагностики лихорадки Эбола. К сожалению, из-за большого количества исследовательских групп, принимавших участие в лабораторном обеспечении мероприятий по ликвидации эпидемии на разных ее этапах, а также в силу различной национальной принадлежности и подчиненности, использовались различные протоколы диагностики, сравнительную эффективность которых оценить затруднительно. Тем не менее, *post factum* стали появляться исследования, посвященные сравнению эффективности различных протоколов диагностики лихорадки Эбола, вызванной штаммом ZEBOV Маккона. Наиболее полным исследованием подобного рода является работа швейцарских специалистов, которые провели сравнительное тестирование 11 различных методик ОТ-ПЦР детекции вируса ZEBOV [7]. Шесть методик были представлены коммерчески доступными наборами: RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 (кат № 441013, Altona, Hamburg, Germany), RealStar® Zaire Ebola virus RT-PCR Kit 1.0 (кат № 451003, Altona, Hamburg, Germany), Roche LightMix® Modular Ebola Virus Zaire (кат № 40-0666-96, Roche, Rotkreuz, Switzerland), FTD® Ebola (кат № FTD-71-64, Fast-track Diagnostics (FTD), Sliema, Malta), Lifetech Ebola Virus (Zaire 2014) и Lifetech Lyophilized Ebola Virus (Zaire2014) (кат № 4489990, Life Technologies, Waltham, USA).

В ходе испытаний было выявлено, что коммерческие наборы, принимавшие участие в исследовании, обладают лучшими характеристиками, чем *in house* методики. Наилучшие результаты показал набор Lifetech Lyophilized Ebola Virus (Zaire 2014). Его чувствительность (предел детекции) составила 62,5 копии транскрибируемого положительного РНК-контроля и 1:243 разведения сыворотки больного лихорадкой Эбола, в то время как остальные наборы имели предел детекции транскрибируемого положительного РНК-контроля от 625 до 1250 копий в мл и детектировали разведения сыворотки больного в диапазоне от 1:27 до 1:81 [7].

В Российской Федерации к началу эпидемии 2013 — 2016 гг. существовал единственный набор для диагностики лихорадки Эбола «Вектор-ПЦР<sub>РВ</sub>-Эбола-RG» [2], разработанный в ГНЦ ВБ «Вектор». Были получены данные по использованию набора для исследования лиофильно высушенного супернатанта клеток, зараженных вирусом Эбола штамм Заир, инактивированный прогреванием и  $\gamma$ -излучением. Образец (Ebola virus standard preparation for diagnostic purposes) был приготовлен институтом им. Р.Коха (Berlin, Germany) и предоставлен Европейской диагностической сетью завозных вирусных болезней (ENIVD). Специфическая активность образца подтверждена институтами Robert Koch-Institut и Bernhard-Nocht Institute, а также университетом г. Марбург (ФРГ) в реакции ПЦР. Согласно документу препарат содержит  $2 \times 10^7$  геном-эквивалентов (ГЭ) на мл вируса Эбола. Методом ПЦР РНК в нативном препарате детектируется примерно на 21 — 22 цикле (по Ct) и на 24 — 25 цикле — в разведении 1:10.

В 2014 году в связи с необходимостью лабораторно-диагностического обеспечения работы СПЭБ Роспотребнадзора в очаге лихорадки Эбола в республике Гвинея Центральным НИИ эпидемиологии была разработана и зарегистрирована диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl», обладающая высокой аналитической чувствительностью (500 копий в мл), продемонстрировавшая в ходе полевых испытаний высокую диагностическую чувствительность и специфичность [8]. Кроме того, в 2016 г. в России была зарегистрирована тест-система ОМ-Скрин-Эбола Заир/Эбола Судан/Марбург-РВ, производства ЗАО «Синтол».

Помимо наборов и методик с традиционной архитектурой были разработаны также коммерческие системы, позволяющие проводить реакцию ОТ-ПЦР в автоматическом режиме — так называемые системы Lab-on-Chip. Данные системы содержат расходную часть, представляющую закрытые картриджи, содержащие в себе как реагенты для экстракции нуклеиновых кислот, так и реагенты для проведения ОТ-ПЦР

в реальном времени. Помимо картриджа для исследований также необходим специализированный прибор. В картридж посредством прокола вносится исследуемый материал, картридж помещается в прибор, после чего все стадии анализа происходят автоматически без участия оператора.

Среди разработок подобного рода наибольшую известность и распространенность получила система GeneExpert Ebola assay от компании Cepheid, USA [8], а также наборы FilmArray NGDS BT-E и FilmArray Biothreat-E test компании BioFire Defense, USA [39, 44]. Данные системы были испытаны в полевых условиях в Западной Африке и получили одобрение ВОЗ и FDA в качестве изделий медицинского назначения. Этому способствовал ряд неоспоримых преимуществ подобных изделий, а именно: простота проведения анализа, простота интерпретации результата, низкий риск кросс-контаминации, небольшое время проведения анализа (60 — 90 минут, включая этап выделения нуклеиновых кислот, против 4 часов для стандартной процедуры экстракции и ОТ-ПЦР). Последняя особенность оказалась чрезвычайно важной постольку, поскольку на Африканском континенте слабо развита электрическая сеть и нестабильная подача электричества вынуждают пользоваться портативными генераторными установками либо батареями ограниченной емкости. В этой связи, время проведения анализа становится драматически важным параметром успешного применения диагностической системы. Помимо очевидных плюсов подобные системы имеют и существенные недостатки, а именно: более низкую чувствительность по сравнению с традиционными ОТ-ПЦР системами, необходимость покупки специализированного оборудования при ограниченном выборе разработанных производителем картриджей для детекции прочих патогенных микроорганизмов, а также высокая стоимость одного исследования. Так, например, стоимость одной реакции Gene Expert Ebola assay в настоящее время составляет около 50 долларов США. Тем не менее, подобные методики могут быть использованы в полевых условиях, например, в рамках деятельности мобильных лабораторий, действующих непосредственно в эпидемиологическом очаге. Однако их применение в референсных лабораториях не обосновано в силу низкой чувствительности и высокой стоимости анализа. Скорее всего, данные методики следует рассматривать в качестве альтернативы хроматографическим тестам.

*Методы диагностики на основе альтернативных принципов амплификации.* Помимо традиционных методик на основе ПЦР/ОТ-ПЦР в последние годы активно развиваются молекулярно-диагностические методики на основе петлевой изотермической амплификации, так называемой LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) осуществляемой с помощью фермента Bst ДНК-полимеразы, представляющей собой *in silico* гомолог большой субъединицы ДНК-полимеразы I *Vacillus stearrowthermophilus*. Фермент обладает 5'-3' ДНК-полимеразной активностью и высокой вытесняющей способностью, но не проявляет 5'-3' экзонуклеазной активности. Для Bst ДНК-полимеразы характерны высокая скорость амплификации, высокая производительность, повышенная толерантность к содержанию солей и температурный оптимум активности в пределах 60 — 65°C [32]. Сочетание данных свойств позволяет осуществлять амплификацию без создания ступенчатого режима, характерного для ПЦР и, следовательно, не требует наличия такого сложного дорогостоящего оборудования, как амплификатор. Для постановки LAMP можно использовать стандартные термостатирующие приборы или даже водяную баню.

LAMP является относительно новым методом амплификации нуклеиновых кислот, который был разработан Notomi T. et al. в 2000 г. [36]. Сущность данного метода заключается в удвоении участка ДНК с высокой специфичностью, эффективностью и скоростью за счет вытесняющей активности Bst ДНК-полимеразы и образования петлевых структур в условиях постоянной температуры. К преимуществам LAMP относятся простота, скорость, высокая специфичность и чувствительность (количество ПЦР-продукта в течение 15 — 60 мин достигает  $10^9$  —  $10^{10}$  копий ДНК мишени), экономическая эффективность. В отличие от классической ПЦР в методе LAMP используется четыре либо шесть праймеров, что обеспечивает высокий уровень специфичности.

Учет результатов LAMP осуществляется по свечению интеркалирующего красителя, например SYBR Green I, добавляемого в реакционную смесь, что дает возможность визуализировать продукты реакции в ультрафиолетовом свете [45]. Данный способ пригоден для полевых исследований. Другой способ основан на колориметрической детекции (турбидиметрии) побочных продуктов реакции LAMP, в частности, ионов пирофосфата, образованием которых сопровождается синтез специфического продукта амплификации, что приводит к возрастанию оптической плотности в реакционной смеси [18]. Оба варианта детекции могут быть осуществлены как по конечной точке, так и в реальном времени с помощью специализированных приборов, например, прибора для автоматической детекции флуоресцентного сигнала Genie III (OptiGene, West Sussex, UK) при использовании интеркалирующего красителя либо турбидиметра LA-200 (Eiken Chemical Co. Ltd, Tokyo, Japan) в случае детекции ионов пирофосфата.

Возможность успешного использования LAMP либо RT-LAMP для диагностики различных патогенов человека и животных было продемонстрировано в [38].

В последующие годы было разработано большое количество коммерческих тест-систем для диагностики широкого спектра патогенов бактериальной и вирусной этиологии. В качестве основной точки приложения подобных тест-систем является так называемая диагностика point-of-care (у постели больного).

В 2007 году Kurosaki et al. разработали первую методику на основе метода RT-LAMP для диагностики ZEBOV. В качестве мишени для амплификации был выбран фрагмент гена нуклеопротеина (NP). По данным авторов аналитическая чувствительность (предел детекции, Limit of Detection, LOD) составила 20 копий в реакцию, что сравнимо с лучшими методиками на основе ОТ-ПЦР в реальном времени. Таким образом, был продемонстрирован высокий диагностический потенциал наборов с подобной архитектурой в случае детекции молекулярных маркеров ZEBOV.

Во время эпидемии 2013 — 2016 гг. методика LAMP, разработанная Kurosaki et al. также применялась в Гвинее, причем в модифицированном варианте, использующем детекцию по двум мишеням. В качестве первой мишени использовался фрагмент гена нуклеопротеина (NP), выбранный ранее, а в качестве второй — фрагмент 5'-UTR нетранслируемой области. Регистрация результата осуществлялась прибором для автоматической детекции флуоресцентного сигнала Genie III (OptiGene, West Sussex, UK) по свечению интеркалятора [29]. Методика была проверена на 100 клинических образцах (44 сыворотки и 56 буккальных соскобов) от больных с подозрением на лихорадку Эбола в Гвинее. Диагностическая специфичность данной методики для обеих мишеней составила 100%, в то время как чувствительность для фрагмента NP составила 97,9%, а для фрагмента 5'-UTR не транслируемой области — 100%. При этом время проведения реакции составляло 60 минут.

Другая методика на основе LAMP, применявшаяся в Гвинее и Сьерра-Леоне, была разработана Huan L. et al. [19]. В качестве мишени разработчики использовали фрагмент гена нуклеопротеина (NP). Детекция результатов реакции осуществлялась с помощью автоматического турбидиметра LA-200 (Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) по образованию ионов пирофосфата. Реакция занимала 60 минут. Аналитическая чувствительность методики составила  $4,56 \times 10^3$  копий контрольной РНК в мл, что также сравнимо с чувствительностью методик на основе ОТ-ПЦР в реальном времени. Было показано отсутствие перекрестных реакций с другими возбудителями геморрагических лихорадок и арбовирусных инфекций.

Таким образом, методики на основе LAMP являются перспективным инструментом диагностики лихорадок, вызванных представителями семейства Ebolavirus, особенно в лабораториях со слабо развитой инфраструктурой и плохой оснащенностью, в качестве альтернативы методам на основе ОТ-ПЦР в реальном времени. Однако существует ряд опасений, ограничивающих применение данных методов. А именно, пока остается неясным влияние замен в области посадки праймеров на диагностические свойства наборов на основе LAMP. Из соображений общего характера ясно, что вероятность возникновения замен под четырьмя (шестью) праймерами, используе-



**Сравнительная характеристика коммерческих тест-систем для молекулярной диагностики лихорадки Эбола, получивших одобрение в качестве изделий медицинского назначения**

Набор	Производитель	Формат	Плексность	Мишень	Контроль	Время	Предел детекции	Одобрено
RealStar® Filovirus RT-PCR Kit 1.0 (CE-IVD)	Altona Diagnostics GmbH (Qiagen)	ОТ-ПЦР PB	Все фило-вирусы	L	†K+, ††ПКО (IVTC)*, †††ВКО (глобин)	4—6 (2)***	3,4 x 10 <sup>3</sup> к/мл	ВОЗ
RealStar® Ebolavirus RT-PCR Kit 1.0 (FDA EUA)*	Altona Diagnostics GmbH (Qiagen)	ОТ-ПЦР PB	Все эбола-вирусы	L	K+, ПКО (IVTC), ВКО (глобин)	4—6 (2)	3,4 x 10 <sup>3</sup> к/мл	ВОЗ
Liferiver™ Ebola virus (EBOV) real time RT-PCR kit	Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd	ОТ-ПЦР PB	Все эбола-вирусы. без дифференцировки	NP	K+, ВКО (глобин)	4—6 (2)	4,23 x 10 <sup>4</sup> к/мл	ВОЗ
Xpert® Ebola Assay (Also FDA EUA)**	Cepheid	Lab-on-chip ОТ-ПЦР PB	ZEBOV	NP, GP	K+, ПКО (IVTC), ВКО (глобин)	1,5	(1,34—4,23) x 10 <sup>4</sup> к/мл	ВОЗ
FilmArray Biothreat-E test	BioFire, Biomerieux	Lab-on-chip ОТ-ПЦР PB	ZEBOV	L	—	1,25	6 x 10 <sup>4</sup> ФОЕ/мл = 2x10 <sup>5</sup> к/мл	USFDA
FilmArray NGDS BT-E Assay	BioFire Defense, LLC for US Dept. of Defense	Lab-on-chip ОТ-ПЦР PB	ZEBOV	NP	—	1,25	10 <sup>4</sup> ФОЕ/мл = 3,4x10 <sup>4</sup> к/мл	USFDA
LightMix® Ebola Zaire rRT-PCR test	Roche	ОТ-ПЦР PB	ZEBOV	L	K+, ПКО (IVTC), ВКО (глобин)	4—6 (1,5)	4,78 ФОЕ/мл = 2x10 <sup>4</sup> к/мл	USFDA
Вектор-ПЦР <sub>PB</sub> -Эбола-RG	ГНЦ ВБ «Вектор»	ПЦР PB	ZEBOV, SUDV	L	K+	4—6 (1,5)	2x10 <sup>3</sup> к/мл	Росздав-надзор
Ампли-сенс® EBOV (Zaire)-FL	ЦНИИЭ	ОТ-ПЦР PB	ZEBOV	L	K+, ПКО (ARPC)**, ВКО STI	4—6 (1,5)	5x10 <sup>2</sup> к/мл	Росздав-надзор
ОМ-Скрин-Эбола Заир/Эбола Судан/Марбург-PB	ЗАО «Синтол»	ОТ-ПЦР PB	ZEBOV, SUDV, MARV	—	K+, ПКО (IVTC), ВКО (глобин)	4—6 (1,5)	10 <sup>3</sup> к/мл	Росздав-надзор

Примечание. \*IVTC (полож. РНК-контроль), \*\*ARPC (полож. защищенный РНК-контроль), \*\*\*В скобках время проведения этапа ОТ-ПЦР без учета процедуры пробоподготовки, †K+ полож. контроль этапа ПЦР, ††ПКО полож. контроль ОТ-ПЦР, †††ВКО внутр. контр. образец; к/мл — копий/мл.

мыми для проведения LAMP, существенно выше, чем таковая для двух праймеров и зонда, используемых для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени. Подобными опасениями, вероятно, обусловлено стремление Kurosaki et al. в модифицированном варианте методики использовать двухмишенную схему LAMP для повышения надежности. Однако пока отсутствуют коммерчески доступные LAMP наборы для диагностики лихорадки Эбола.

Подводя итог выше сказанному, следует отметить, что в настоящее время клиническая лабораторная диагностика лихорадки Эбола может быть осуществлена с помощью наборов на основе метода ОТ-ПЦР в реальном времени либо с помощью «быстрых» хроматографических тестов. При этом результаты иммунохроматографии

должны быть обязательно подтверждены методом ОТ-ПЦР. В качестве «золотого стандарта» ОТ-ПЦР диагностики принято рассматривать наборы производства компании Altona Diagnostics GmbH, Germany. На момент написания данного обзора ВОЗ одобрила применение пяти наборов на основе метода ОТ-ПЦР в реальном времени и три иммунохроматографических теста, USFDA одобрила применение шести наборов на основе метода ОТ-ПЦР и два иммунохроматографических теста. В Российской Федерации зарегистрированы три набора на основе ПЦР/ОТ-ПЦР в реальном времени.

Сравнительные характеристики тест-систем для молекулярной диагностики лихорадки Эбола, получивших одобрение тех или иных разрешающих инстанций, в качестве изделий медицинского назначения представлены в табл. Аккредитованные наборы имеют достаточно широкий диапазон чувствительности, от 500 копий в мл до  $4,2 \times 10^4$  копий в мл. Тем не менее, даже наименее чувствительные из них вполне пригодны для диагностических целей, так как уже на ранних этапах заболевания содержание вирусных частиц в периферическом кровотоке больных достигает значений  $10^7$  копий/мл и выше [46]. В качестве мишеней для амплификации разработчики использовали различные фрагменты генома вируса Эбола, большей частью фрагменты L-гена, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу. Это связано с высокой консервативностью данного гена. Однако диагностикумы, основанные на использовании в качестве мишени фрагментов генов GP (гликопротеина) и NP (нуклеопротеина) также разработаны и имеют право на существование, поскольку сравнительным анализом изолятов ZEBOV показано чередование участков высокой и низкой гомологии на всем протяжении генома [17]. Поэтому не существует особых ограничений при выборе областей генома, которые могут быть использованы в качестве мишеней для ПЦР. Тем не менее, ряд разработчиков в своих тест-системах для большей надежности используют сразу две мишени [7], а некоторые диагностические лаборатории в ходе работы применяют одновременно две и более диагностические системы или методики.

В Российской Федерации также продолжают работы по совершенствованию диагностических систем на основе молекулярных методик для детекции возбудителей филовиральных лихорадок. В частности в Центральном НИИ эпидемиологии разработаны и готовятся к проведению клинических испытаний наборы в формате мультипрайм ОТ-ПЦР в реальном времени для дифференциальной диагностики вирусов ZEBOV, SUDV и MARV — «Амплисенс® Filoscreen A-Fl» и вирусов BDBV, TAFV и RESTV — «Амплисенс® Filoscreen B-Fl» [48]. В ГНЦ ВБ «Вектор» ведутся разработки диагностических систем для обнаружения вируса Эбола на основе методики LAMP и xMAP технологий [3].

Таким образом, Российская Федерация располагает необходимым набором диагностических средств собственного производства, по своим характеристикам не уступающих лучшим мировым аналогам, что позволяет с большим запасом прочности осуществлять надзорные мероприятия по недопущению завоза на территорию нашей страны особо опасных филовиральных лихорадок, а также оказывать помощь в проведении подобных мероприятий другим странам в рамках существующих международных соглашений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пьянков С.А., Пьянков О.В., Найденова Е.В., Агафонов А.П., Воиро М.У., Солодкий В.В., Зайковская А.В., Максимов Н.Л., Маренникова С.С., Бочаров Е.Ф., Офицеров В.И., Лопатин А.А., Щербакова С.А., Кутырев В.В., Михеев В.Н., Демина Ю.В. Опыт использования метода ИФА для выявления антител к вирусу Эбола при работе бригады СПЭБ в республике Гвинея. Проблемы особо опасных вирусных инфекций. 2016, 3: 71-75.
2. РУ № РЗН 2013/1322 на медицинское изделие «Набор реагентов для амплификации кДНК вируса Эбола (Заир, Судан) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (для приборов Rotor Gene 6000) «Вектор ПЦР РВ-Эбола-RG» по ТУ 9398-017-05664012-2011.

3. Терновой В.А., Семенцова А.О., Чуб Е.В., Пьянков О.В., Локтев В.Б., Агафонов А.П. Высокоэффективное xMAP-мультиплексирование для обнаружения и идентификации геморрагических лихорадок, включая Эбола. Проблемы особоопасных инфекций. 2015, 3: 94-97.
4. Щелканов М.Ю., Магассуба Н.Ф., Дедков В.Г., Шипулин Г.А., Галкина И.В., Попова А.Ю., Малеев В.В. Природный резервуар филовирюсов и типы связанных с ними эпидемических вспышек на территории Африки. Вестник РАМН. 2017, 72 (2): 112-119. doi: 10.15690/vramn803.
5. Boisen M.L., Cross R.W., Hartnett J.N. et al. Field validation of the ReEBOV Antigen Rapid Test for Point-of-Care Diagnosis of Ebola Virus Infection. *J. Infect. Dis.* 2016, 214 (Suppl. 3): S203-S209.
6. Broadhurst M.J., Brooks T.J., Pollock N.R. Diagnosis of Ebola Virus Disease: Past, Present, and Future. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016, 29 (4): 773-793. doi: 10.1128/CMR.00003-16.
7. Cherpillod P., Schibler M., Vieille G. et al. Ebola virus disease diagnosis by real-time RT-PCR: A comparative study of 11 different procedures. *J. Clin. Virol.* 2016, 77: 9-14.
8. Dedkov V.G., Magassouba N.F., Safonova M.V. et al. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for the detection of Ebola virus (Zaire) during an Ebola outbreak in Guinea in 2014-2015. *J. Virol. Methods.* 2016, 228: 26-30. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.11.007.
9. de La Vega M.-A., Bello A., Chaillet P. et al. Diagnosis and management of Ebola samples in the laboratory. *Expert Review of Anti-infective Therapy.* 2016, doi: 10.1080/14787210.2016.1176912.
10. El Sayed S.M., Abdelrahman A.A., Ozbak H.A. et al. Updates in diagnosis and management of Ebola hemorrhagic fever. *J. Res. Med. Sci.* 2016, 21: 84. doi: 10.4103/1735-1995.192500. eCollection 2016.
11. Erickson B.R., Sealy T.K., Flietstra T. et al. Ebola virus disease diagnostics, Sierra Leone: Analysis of Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Values for Clinical Blood and Oral Swab Specimens. *J. Infect. Dis.* 2016, 214, Suppl. 3: S258-S262.
12. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. Report of an International Commission. *Bull World Health Organ.* 1978, 56 (2): 271-293.
13. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO / International study team. *Bull World Health Organ.* 1978, 56 (2): 247-270.
14. Gibb T.R., Norwood D.A., Jr., Woollen N. et al. Development and evaluation of a fluorogenic 5' nuclease assay to detect and differentiate between Ebola virus subtypes Zaire and Sudan. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39: 4125-4130.
15. Geisbert T.W., Jahrling P.B. Use of immunoelectron microscopy to show Ebola virus during the 1989 United States epizootic. *J. Clin. Pathol.* 1990, 43 (10): 813-816. doi: 10.1136/jcp.43.10.813.
16. Gilbert S.C., Warimwe G.M. Rapid development of vaccines against emerging pathogens: The replication-deficient simian adenovirus platform technology. *Vaccine.* 2017, 35: 4461-4464. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.04.085.
17. Gire S.K., Goba A., Andersen K.G. et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science.* 2014, 345 (6202): 1369-1372. doi:10.1126/science.1259657.
18. Goto M., Honda E., Ogura A. et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxynaphthol blue. *Biotechniques.* 2009, 46: 167-172.
19. Huan L., Wang H., Wei L. et al. Survey and visual detection of Zaire ebolavirus in clinical samples targeting the nucleoprotein gene in Sierra Leone. *Frontiers in Microbiology.* 2015, 6: 1332-1339.
20. Huang Y., Wei H., Wang Y. et al. Rapid detection of filoviruses by real-time TaqMan polymerase chain reaction assays. *Virol. Sin.* 2012, 27: 273-277.
21. Huang Y., Zhu Y., Yang M. et al. Nucleoprotein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) for detecting antibodies specific to Ebola virus and Marburg virus. *Virol. Sin.* 2014, 29: 372-380 14.
22. <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/history/chronology>.
23. Ikegami T., Saijo M., Niikura M. et al. Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiol. Infect.* 2003, 130: 533-539.
24. Jiang S., Wang K., Li C. et al. Mathematical models for devising the optimal Ebola virus disease eradication. *J. Transl. Med.* 2017, 15 (1): 124-134. doi: 10.1186/s12967-017-1224-6.
25. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. et al. Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012.
26. Kraehling V., Becker D., Rohde C. et al. Development of an antibody capture ELISA using inactivated Ebola Zaire Makona virus. *Med. Microbiol. Immunol.* 2015, 205 (2): 173-183. doi: 10.1007/s00430-015-0438-6.

27. Ksiazek T.G., West C.P., Rollin P.E. et al. ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *J. Infect. Dis.* 1999, 179 (Suppl. 1): S192-S198.
28. Kuhn H.J., Dodd E.L., Wahl-Jensen V. et al. Evaluation of perceived threat differences posed by filovirus variants. *Biosec. Bioterr.* 2011, 9 (4): 361-371.
29. Kurosaki Y., Magassouba N., Oloniniyi O.K. et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay coupled with a portable device for rapid diagnosis of Ebola virus diseases in Guinea. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016, 10:e004472. DOI:10.1371/journal.pntd.0004472.
30. Le Guenno B., Formenty P., Wyers M. et al. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet.* 1995, 345 (8960): 1271-1274. doi: 10.1016/s0140-6736(95)90925-7.
31. Lefebvre A., Fiet C., Belpois-Duchamp C. et al. Case fatality rates of Ebola virus diseases: A meta-analysis of World Health Organization data. *Med. Mal. Infect.* 2014, 44 (9): 412-416.
32. Ma Y., Zhang B., Wang M. et al. Enhancement of polymerase activity of the large fragment in DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* by Site-Directed Mutagenesis at the active site. *Biomed Res. Int.* 2016, 2016: 2906484.
33. Macneil A., Reed Z., Rollin P.E. Serologic cross-reactivity of human IgM and IgG antibodies to five species of Ebola virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011, 5: e1175 17.
34. Marie-Astrid Vernet M., Reynard S., Fizet A. et al. Clinical, virological, and biological parameters associated with outcomes of Ebola virus infection in Macenta, Guinea. *JCI Insight.* 2017, 2 (6): e88864. doi: 10.1172/jci.insight.88864.
35. Nakayama E., Yokoyama A., Miyamoto H. et al. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of filovirus species specific antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010, 17: 1723-1728.
36. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28: E63.
37. Panning M., Laue T., Olschlager S. et al. Diagnostic reverse-transcription polymerase chain reaction kit for filoviruses based on the strain collections of all European biosafety level 4 laboratories. *J. Infect. Dis.* 2007; 196 (Suppl. 2): S199-S204.
38. Parida M., Posadas G., Inoue S. et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42: 257-263.
39. Pinsky B.A., Sahoo M.K., Sandlund J. et al. Analytical performance characteristics of the Cepheid GeneXpert Ebola Assay for the detection of Ebola virus. *PLoS One.* 2015, 10 (11): e0142216.
40. Rowe A.K., Bertolli J., Khan A.S. et al. Clinical, virologic, and immunologic follow-up of convalescent Ebola hemorrhagic fever patients and their household contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *Commission de Lutte contre les Epidemies à Kikwit. J. Infect. Dis.* 1999, 179 (Suppl. 1): S28-35.
41. Saijo M., Niikura M., Morikawa S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39 (1): 1-7.
42. Sanchez A., Ksiazek T.G., Rollin P.E. et al. Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. *J. Infect. Dis.* 1999, 179 (Suppl 1): S164-169.
43. Sobarzo A., Perelman E., Groseth A. et al. Profiling the native specific human humoral immune response to Sudan Ebola virus strain Gulu by chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012, 19: 1844-1852.
44. Southern T.R., Racsá L.D., Albari o C.G. et al. Comparison of FilmArray and quantitative real-time reverse transcriptase PCR for detection of Zaire Ebola virus from contrived and clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53 (9): 2956-2960.
45. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008, 3: 877-882.
46. Towner J.S., Rollin P.E., Bausch D.G. et al. Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. *J. Virol.* 2004, 78: 4330-4341.
47. World Health Organization, 2015a. Selection and use of Ebola in vitro diagnostic assays. Emergency guidance. <http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ivd-assays/en/> (29.06.2016).
48. World Health Organization (2015b). Annex. 2. Considerations for the selection of PCRs for the diagnosis of Ebola disease. <http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ivd-assays/en/> (29.06.2016).

*Поступила 30.10.17*

Контактная информация: Семенцова Александра Олеговна,  
630559, Кольцово, Новосибирская обл.

*Е.В.Молчанова, Н.П.Агеева*

## **НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КОЛЛЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ВОЛГОГРАДСКОГО НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

В обзоре отражено современное состояние коллекционной деятельности и представлены направления ее совершенствования в рамках проведенной паспортизации коллекции патогенных *Burkholderia* spp. Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Рассмотрены пути модернизации существующих методов консервации, оптимизации современных методов фенотипической и молекулярно-генетической характеристики штаммов патогенных микроорганизмов, а также предложена информационная система каталогизации с формированием универсальной базы данных.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 117—126

Ключевые слова: паспортизация, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, коллекционные штаммы, VITEK 2, MALDI ToF MS, DFR, MLVA, MLST

*E.V.Molchanova, N.P.Ageeva*

## **SCIENTIFIC AND METHODOLOGICAL SUPPORT FOR DEVELOPMENT OF PATHOGENIC MICROORGANISM COLLECTION OF VOLGOGRAD RESEARCH INSTITUTE FOR PLAGUE CONTROL**

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

The review reflects the current state of the working in collection and presents the directions of its improvement within the framework of the carried out certification of the collection of pathogenic *Burkholderia* spp. of Volgograd Research Institute for Plague Control. The ways of modernization of existing methods of conservation, optimization of modern methods of phenotypic and molecular-genetic characteristics of strains of pathogenic microorganisms are considered, and an information cataloging system with the formation of a universal database is proposed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 117—126

Key words: certification, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, collection strains, VITEK 2, MALDI ToF MS, DFR, MLVA, MLST

Коллекции патогенных микроорганизмов играют важную роль в целом ряде мероприятий, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Изучение свойств возбудителей инфекционных заболеваний необходимо при мониторинге территорий в случае природно-очаговых инфекций и расследовании путей завоза и распространения на неэндемичных для них регионах.

К направлениям совершенствования деятельности учреждений коллекций патогенных микроорганизмов относятся: оптимизация существующих методов и разработка новых технологий консервации, использование современных методов фенотипической и молекулярно-генетической паспортизации, внедрение новых информационных технологий каталогизации, паспортизации и учета движения патогенных штаммов, а также формирование универсальной единой базы данных.

Возбудители мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) и сапа (*Burkholderia mallei*)

относятся к микроорганизмам II группы патогенности (опасности) и являются потенциальными агентами биотерроризма группы В [9, 25, 33].

Роль *V. pseudomallei* и *V. mallei* в инфекционной заболеваемости человека и некоторых животных рассматривается, главным образом, в связи с существованием эндемичных регионов и появлением завозных случаев инфекций. Сап — зоонозная антропоургическая инфекция, регистрируемая в Монголии, Турции, Иране, Ираке, странах Аравийского полуострова, Китае, Индии, Индонезии, Филиппинах [33]. Случаи заражения человека связаны с профессиональной деятельностью: ветеринары, работники мясоперерабатывающих предприятий, сотрудники лабораторий, дрессировщики лошадей. *V. pseudomallei* входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоемов. К странам, где распространен возбудитель мелиоидоза, относятся Индия, Шри-Ланка, Филиппины, Индонезия, Таиланд, Сингапур, Вьетнам, Малайзия, Бирма, Бразилия, Пуэрто-Рико, страны Тихоокеанского региона, Иран и Австралия. В исследовании Sarovich D.S. et al., показано распространение *V. pseudomallei* в мире с указанием эндемичности мелиоидоза также и для Африки [30]. В США, странах Европы встречаются спорадические случаи этого заболевания у людей, прибывших с эндемичных территорий [18]. Так, в 2016 г. был зарегистрирован случай заражения мелиоидозом во Франции у туриста, прибывшего из Вьетнама [23].

Потенциальная возможность завоза мелиоидоза и сапа на территорию Российской Федерации, а также опасность преднамеренного использования *V. pseudomallei* и *V. mallei* в качестве средства биологического терроризма диктует необходимость наличия представительной коллекции охарактеризованных штаммов этих микроорганизмов как базы для проведения исследований (изучения свойств возбудителей, разработки и испытания средств диагностики, внедрения современных методов и новых технологий и др.).

Коллекция микроорганизмов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора входит в перечень биологических и генетических коллекций РФ (<http://www.sevin.ru/collections/microorganisms.html>) и включает 14 штаммов *V. mallei*, выделенных в различных географических регионах (Монголия, Югославия, Венгрия, Польша, Индия, Индонезия), и 59 штаммов *V. pseudomallei* (Вьетнам, Австралия, Таиланд), полученных в 1970 — 1980 гг. прошлого столетия из научно-исследовательских учреждений Советского Союза. Штаммы возбудителя мелиоидоза и сапа содержатся и в коллекциях микроорганизмов США, Великобритании, Бразилии, Венесуэлы, Таиланда и Малайзии, а также в государственных коллекциях патогенных бактерий РФ (Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», ГКПМ, Оболенск). Основная роль в изучении данных видов микроорганизмов в РФ отводится Волгоградскому научно-исследовательскому противочумному институту Роспотребнадзора, на базе которого функционирует «Референс-центр по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза» — координирующий, консультативно-методический, учебный, диагностический и экспертный орган по вопросам индикации, экспресс-диагностики, идентификации и типирования *V. pseudomallei* и *V. mallei* на территории Российской Федерации.

*Технологии консервации.* Первостепенной задачей коллекции микроорганизмов является сохранение штаммов в неизменном состоянии в течение длительного периода времени. Это осуществляется чаще всего с помощью методов сублимационного высушивания или криоконсервации при низких температурах (-20—85°C), каждый из которых имеет преимущества и недостатки [12].

Лиофилизация (сублимационное высушивание, замораживание-высушивание) — широко распространенный способ высушивания биоматериалов из замороженного состояния, при котором вода испаряется в условиях вакуума без оттаивания льда, что позволяет полностью сохранять первичную структуру объекта. В зависимости от способа размещения биопрепаратов при высушивании различают сублимационные установки коллекторного и камерного типа [12].

Процесс лиофилизации представляет собой стрессовый фактор, вызывающий у

микробных клеток ряд различных изменений [2]. Отмечено, что после 24 лет хранения в ампулах в лиофилизированном состоянии штаммы возбудителя сапа при высеве на питательные среды оставались жизнеспособными. Однако с увеличением сублимационных циклов высушивания наблюдалось снижение окислительной активности штаммов *V.mallei* по отношению к желатине, зависящей от сроков хранения штамма [4]. Аналогично, вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ после 60 лет хранения в лиофилизированном состоянии при высеве на питательные среды всё еще сохранял жизнеспособность, однако характеризовался снижением иммуногенных свойств и незначительными изменениями в геноме [13]. Такой длительный срок хранения коллекционных штаммов с сохранением в целом основных свойств является преимуществом рассматриваемого метода. Однако используемая для этого установка К.Е.Долинова морально и физически устарела, но до сих пор является единственной, на которую имеется регламентирующий документ федерального уровня «Инструкция по лиофильному высушиванию возбудителей инфекционных заболеваний I — IV групп на коллекторном аппарате системы К.Е.Долинова». Современные аппараты для лиофильного высушивания предназначены для консервирования биологического и фармацевтического материала и не имеют регламентирующих документов, разрешающих их использование в работе с микроорганизмами I — IV группы патогенности. Кроме того, современные установки не могут полностью обрабатываться дезинфектантами и не подлежат автоклавированию.

В исследовании по оценке возможности применения различных сублимационных систем для лиофилизации патогенных микроорганизмов бактериальной природы было установлено, что препараты, полученные на трех лиофильных сушках коллекторного типа (аппарат системы К.Е.Долинова, Martin Christ Alpha 1-4 LDplus и Heto Power Dry), сохраняют максимальное количество жизнеспособных клеток в процессе хранения. Показатели выживаемости у штаммов, высушенных на этих аппаратах, находились в интервале от 97,3 до 98,7%. При этом биопрепараты, полученные с помощью современной установки Heto Power Dry, обладали максимальным прогнозируемым сроком хранения до 105 лет [11]. В работе Червяковой Н.С. и др. получены данные по лиофилизации во флаконах при помощи современной сушки камерного типа Martin Christ Epsilon 2-6D штаммов III — IV группы патогенности. Авторы указывают на недостаток камерной системы из-за наличия жизнеспособных клеток микроорганизмов на рабочих поверхностях лиофильной камеры, что обуславливает высокий риск создания аварийной ситуации с ПБА. Для обеспечения биологической безопасности необходимо модернизировать данное инженерно-техническое оборудование с возможностью проводить дезинфекцию камеры в автоматическом режиме до момента ее разгерметизации. В то же время, показатели жизнеспособности клеток, лиофилизированных с помощью камерной сушки Martin Christ Epsilon 2-6D, зависели от вида микроорганизмов и были в целом ниже, чем у препаратов, лиофилизированных на системах коллекторного типа [15].

В Волгоградском НИПЧИ для сублимационного высушивания микроорганизмов IV группы патогенности используется лиофильная сушка коллекторного типа нового поколения CoolSafe 110 Freeze Dryer. К преимуществам данной системы следует отнести короткий временной цикл лиофилизации (2,5 ч) и возможность обработки дезинфектантами ее составляющих частей; к недостаткам — ограниченное количество ампул, получаемых за один цикл работы (16) и риск возможной аварии с ПБА на этапе их запаивания в ручном режиме. Для использования этого метода консервации патогенных микроорганизмов необходима инженерно-техническая модернизация системы CoolSafe 110 Freeze Dryer, обеспечивающая биологическую безопасность на всех этапах работы. Кроме того, также необходимо создание регламентирующих документов, разрешающих использование данной системы для работы с микроорганизмами I — IV группы патогенности с утверждением их на федеральном уровне.

Известно, что лиофилизированные культуры и в ампулах, и во флаконах необходимо хранить в темноте при 1 — 4°C. При комнатной температуре и тем более при

30°C наблюдается быстрое отмирание клеток [5]. Поэтому для данного способа хранения микроорганизмов необходимо наличие системы основного и резервного холодильного оборудования в лаборатории коллекции.

Низкотемпературная консервация по сравнению с лиофилизацией для хранения микроорганизмов более универсальна в связи с наличием и доступностью оборудования — низкотемпературных холодильников. Однако данный способ предполагает наличие системы постоянного температурного контроля, аварийной сигнализации с уведомлением об изменении температурного состояния, системы охлаждения помещения хранилища, дублированное энергоснабжение, а также резервные морозильные камеры. Кроме того, время хранения биоматериала при этих температурах также ограничено. Длительность хранения бактерий при этом зависит от биологических особенностей штамма и от условий замораживания и хранения (скорость охлаждения-оттаивания, температура и среда культивирования). По данным Gibson L.F. и Khoury J.T., в холодильнике при температуре -70°C время хранения разных видов бактерий колебалось в пределах 12 — 40 месяцев [24]. По данным De Paoli P. метод криоконсервации при низких температурах позволял сохранять бактериальные клетки без пересевов до 10 лет [20]. Результаты исследований по хранению штаммов патогенных микроорганизмов в государственной коллекции Роспотребнадзора показывают, что штаммы *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus* устойчивы к замораживанию и хранению при -70°C с использованием оптимальной среды и в присутствии криопротекторов [3, 7]. Для холерных вибрионов наиболее высокая выживаемость с сохранением основных диагностических признаков наблюдалась при применении лактозо-желатиновой среды, для штаммов возбудителя туляремии и бруцеллеза — сахарозо-желатиновой среды и бульона Альбими с 10% глицерином. При этом установлено некоторое снижение количества жизнеспособных клеток как на этапе замораживания, так и в процессе хранения.

В целом, оба описанных метода сохранения референтных штаммов патогенных микроорганизмов необходимы для одновременного использования в коллекциях. Культуры в лиофилизированном состоянии в виде ампул/флаконов удобны для транспортировки при передаче из учреждения в учреждение, а также в качестве резервного многолетнего источника штаммов в замороженном состоянии — для оперативной повседневной деятельности (выдача в структурные подразделения, изучение свойств и т.д.).

*Современные методы фенотипической и молекулярно-генетической паспортизации.* Важным направлением деятельности коллекций микроорганизмов является установление таксономической принадлежности штаммов и подтверждение их аутентичности в процессе воспроизводства. Систематика бактерий постоянно обновляется и совершенствуется, в связи с чем существует необходимость в периодическом проведении номенклатурной ревизии штаммов коллекций. Нередки случаи, когда штамм, идентифицированный по фенотипическим свойствам классическими методами как определенный вид, при более детальном изучении оказывался иной видовой принадлежности [10, 14]. Внедрение в лабораторную практику новых методов и технологий обуславливает применение их как для верификации видовой принадлежности коллекционных штаммов, так и для изучения их свойств [10]. Поэтому в крупных международных коллекциях и государственных коллекциях патогенных микроорганизмов РФ для подтверждения аутентичности референтных штаммов сегодня используется ряд современных автоматических технологий, в частности биохимическое профилирование с применением микробиологических анализаторов, масс-спектрометрия по технологии MALDI-ToF, рибопринтинг, фрагментарное, мультилокусное и полногеномное секвенирование [10].

В 2012 г. 20 лабораторий, представляющих государственные, промышленные и частные испытательные центры США, провели масштабные совместные испытания по оценке идентификационной возможности тест-карты Gram-negative (GN) микробиологической системы VITEK 2 «bioMerieux» (Франция) по идентификации 720 культур микроорганизмов, включая *Brucella melitensis*, *F.tularensis*, *B. mallei*, *B. pseudo-*



*mallei* и *Yersinia pestis*. В результате видовая принадлежность 707 штаммов была определена верно, что позволило сделать вывод о приемлемости анализатора VITEK 2 GN для быстрой идентификации [17].

В РосНИПЧИ «Микроб» с помощью микробиологического анализатора VITEK 2 проводилось подтверждение аутентичности референтных штаммов патогенных микроорганизмов, при этом было установлено, что некоторые из них не соответствовали видовой принадлежности, указанной в паспортных данных [10, 14].

Однако диагностические возможности любой современной системы идентификации ограничены полнотой сведений, заложенных в базу данных (БД) прибора. Идентификационные ключи для отдельных видов микроорганизмов II группы патогенности либо отсутствуют в БД анализатора VITEK 2, либо представлены в ограниченном количестве. В связи с этим, штаммы *Brucella suis* 1330 и *B. abortus* 19VA были определены только до рода [14]. Кроме того, штаммы, имеющие особенности в своем профиле биохимической активности, не совпадающим с заложенным стандартом, могут быть неверно идентифицированы. Так, авторы ряда работ указывали, что клинические изоляты возбудителя мелиоидоза бактериологический анализатор VITEK 2 в некоторых случаях идентифицировал как виды комплекса *Burkholderia ceracia*, а бактерий возбудителя сапа как виды *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida*, что было связано со спецификой биохимического профиля отдельных штаммов [27, 29, 36]. В исследовании Van den Beld M.J. et al. при идентификации бактерий *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas gessardii* или *Pseudomonas proteolytica*, выделенных из промышленных вод в Нидерландах, автоматический анализатор VITEK 2 определил как вид *F. tularensis* [32]. Проведенная расширенная характеристика по биохимической активности коллекционных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза Волгоградским НИПЧИ с помощью данного анализатора показала, что 31 из 40 штаммов возбудителя мелиоидоза и 8 из 12 штаммов возбудителя сапа обладали типичным биохимическим профилем и были идентифицированы верно с вероятностью 90 — 99%. Остальные штаммы имели определенные особенности в биохимическом профиле, что обуславливало их идентификацию как виды комплекса *B. ceracia* или *Sphingomonas paucimobilis*. Для правильной идентификации системой VITEK 2 культур возбудителя мелиоидоза решающее значение имело наличие  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазной и  $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидазной активности и отсутствие активности фермента целлюлазы, для культур возбудителя сапа — неспособность к утилизации сахарозы и D-трегалозы, наличие активности L-пролинариламидазы и тирозинариламидазы, отсутствие глицинариламидазной активности [8].

В целом, использование системы VITEK 2 позволяет проводить паспортизацию по биохимическим свойствам микроорганизмов. Вместе с тем, для применения данного анализатора в коллекциях очевидна необходимость расширения его БД идентификационными ключами по отдельным видам микроорганизмов II группы патогенности.

Еще одним современным методом идентификации и биотипирования микроорганизмов является времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией. На данный момент для идентификации патогенных микроорганизмов во многих лабораториях применяют аппаратно-программные комплексы MALDI Biotyper «Bruker» (США) и S.A.R.A.M.I.S.<sup>™</sup> «Anagnostec GmbH» (Германия), основанные на использовании MALDI-ToF масс-спектрометров линейки Microflex<sup>™</sup> «Bruker» (США) и Axima<sup>™</sup> «Shimadzu» (Япония) соответственно. Идентификационные БД содержат масс-спектры порядка 5 тыс. видов микроорганизмов, но референсные масс-спектры возбудителей особо опасных инфекций в коммерческих сборках БД представлены в ограниченном количестве. В связи с этим, на практике встречались случаи неправильной идентификации штаммов возбудителя сапа и мелиоидоза [26]. Wang H. et al. (2016) в своем исследовании указали на отсутствие масс-спектров *B. pseudomallei* в текущей версии базы данных системы Bruker Biotyper (DB 5627), что затрудняло идентификацию клинических изолятов возбудителя мелиоидоза. Внесение только что полученных в работе масс-спектров изучаемых

штаммов в базу данных MALDI-ToF MS (включая масс-спектры трех штаммов, неправильно определенных анализатором как виды *V. putida* и комплекса *V. serasia*) обусловило их верную 100% идентификацию как вид *V. pseudomallei* со значением Score >2,000.

В работе Лопастейской Я.А. и др. приведены результаты исследования по дополнению БД S.A.R.A.M.I.S.<sup>TM</sup>, «Anagnostec GmbH» (Германия) масс-спектрами клеточных белков 10 референтных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза коллекции Волгоградского НИПЧИ для повышения эффективности дальнейшей идентификации. В результате проведенной работы все коллекционные штаммы *V. pseudomallei* и *V. mallei* были корректно идентифицированы до вида, а в их паспорта были внесены масс-спектрометрические белковые профили с их детальным анализом пиков с определенными молекулярными массами (3780, 4815, 5202, 6560, 7090, 7560, 9624 и 10460 Da), характерными для этих видов [6].

В 2014 году были утверждены методические рекомендации «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I — II групп патогенности». В этом документе отражены такие разделы, как культивирование исследуемых штаммов, получение из них белковых препаратов, снятие спектров, дополнение базы данных спектрами референтных штаммов, проведение идентификации, интерпретация полученных результатов. Представленный унифицированный алгоритм позволяет проводить экспресс-идентификацию и хемотипирование микроорганизмов — возбудителей опасных инфекционных заболеваний и стандартизует результаты, полученные методом масс-спектрометрии.

Для паспортизации коллекционных штаммов микроорганизмов необходима полная характеристика не только фенотипических свойств, но и их генотипов. Универсального алгоритма молекулярно-генетической паспортизации не существует. Полиморфность геномов таких видов как *Vibrio cholerae*, *V. pseudomallei* и *Y. pestis* позволяет использовать большинство известных методов для их типирования. Выбор методов исследования определяется возможностями каждой отдельной лабораторией. Генотипы одних и тех же референтных штаммов, хранящихся в различных коллекциях, зачастую охарактеризованы с помощью разных методов и поэтому не поддаются сопоставлению.

Из всего многообразия методов генотипирования микроорганизмов, в отношении изолятов патогенных буркхольдерий наиболее эффективными оказались VAT, DFR, MLVA, MLST и полногеномное секвенирование. Метод амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК используют для генетической паспортизации, внутривидового дифференцирования и анализа филогенетических взаимоотношений штаммов *V. pseudomallei* с определением наличия 14 локусов и *V. mallei* с определением наличия 9 локусов [1, 21]. При использовании метода MLVA для типирования штаммов возбудителя мелиоидоза определяют число tandemных повторов в 23 переменных локусах [31] или в четырех, по упрощенной системе [19], для типирования штаммов возбудителя сапа — в 6 локусах [31]. Метод мультилокусного сиквенса-типирования (MLST) применяется для выяснения географической принадлежности коллекционных штаммов [30]. Для некоторых микроорганизмов, в том числе для возбудителя сапа, метод MLST малоэффективен, так как у штаммов *V. mallei* было зарегистрировано всего лишь два сиквенса-типа ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)).

Для стандартизации получаемых результатов в рамках государственного санитарно-эпидемиологического нормирования РФ учреждениями Роспотребнадзора совместно разработаны методические указания «Порядок молекулярного типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности». Данный документ определяет объем молекулярно-генетических исследований и методические основы получения характеристик для каждого вида патогенных микроорганизмов I-II группы, а также требования к организации и оснащению лабораторий. Таким образом, согласно методическим указаниям для генетической паспортизации штаммов воз-

будителя мелиоидоза показано использовать методы VAT, MLVA и MLST/полногеномное секвенирование, для штаммов возбудителя сапа — DFR, MLVA и полногеномное секвенирование.

*Формирование универсальной единой базы данных.* В 1960-х годах Всемирная федерация коллекций культур (WFCC, <http://www.wfcc.info>) инициировала разработку международной базы данных о мировых биоресурсах. Был создан Всемирный центр данных микроорганизмов (WDCM, [www.wdcm.org](http://www.wdcm.org)), содержащий информацию о коллекциях в мире (CCINFO, <http://www.wfcc.info/ccinfo/home/>), представленную в виде глобального (GCM) и справочного каталогов микроорганизмов (ПКК) и программы по сбору и анализу информации о штаммах из внешних источников (ABC) [28]. GCM на данный момент содержит информацию о более, чем 368 000 штаммах из 708 коллекций из 72 стран и регионов всего мира [34, 35]. В этих каталогах на текущий момент отображены 25 коллекций РФ.

В 1985 году была создана Микробная информационная сеть Европы (MINE), инициированная структурными подразделениями коллекций микроорганизмов Германии, Нидерландов, Великобритании, Бельгии и Португалии [Gams W. et al., 1990]. В результате была создана первая крупная многонациональная модель общего каталога, который охватывал все микроорганизмы включая вирусы. Ключевой особенностью этой информационной системы было определение общих минимальных универсальных наборов данных, включающих приблизительно 60 характеристик, таких как таксономию, физиологические и биохимические свойства, географическое происхождение, среды культивирования и т.д. [22], [Stalpers J.A. et al., 1990]. К сожалению, краткосрочный характер финансирования не дал этому направлению дальнейшего развития. С 2000 г. с целью объединения и обеспечения всеобщего доступа к фрагментированным ресурсам, информации и экспертным знаниям, имеющимся в европейских общественных коллекциях микроорганизмов, была создана общеевропейская научно-исследовательская инфраструктура (MIRRI), включающая более 40 коллекций общественных фондов и исследовательских институтов из 19 европейских стран. Ключевым компонентом данной структуры является разработка динамичной информационной системы. На сегодня отдельные каталоги различных коллекций стран Европы доступны в режиме онлайн и взаимодействуют друг с другом, продвигаясь к созданию совместимых баз данных. Этого во многом способствует создание инфраструктуры исследований микробиологических ресурсов (MIRRI, <http://www.mirri.org/>) [16].

В России коллекции, обеспечивающие хранение генетических и биологических ресурсов, представлены самостоятельными специализированными организациями — ботаническими садами РАН, структурными подразделениями научно-исследовательских организаций (коллекции микроорганизмов и клеточных культур, рабочими коллекциями лабораторий, ведущих исследования в области генетики и селекции, а также рядом организаций, для которых хранение генетического материала не является основной функцией (питомники, зверофермы, зоопарки и т.п.). Эти организации принадлежат различным ведомствам (в т.ч. РАН, Минсельхоз, Минобрования и науки, Минздрав, Минобороны, Роспотребнадзор и др.). В 2004 г. была создана информационная система, состоящая из каталога-перечня коллекций РФ (92 коллекции биологических и генетических ресурсов различных организаций) и единый каталог микроорганизмов Российских коллекций немедицинского профиля, <http://www.sevin.ru/collections/microorganisms.html>. Открытый каталожный фонд ВКМ ([www.vkm.ru](http://www.vkm.ru)) представлен микроорганизмами более 750 родов и 3300 видов и превосходит по таксономическому разнообразию каталогизированные фонды других микробных коллекций РФ. Сведения по культурам открытого фонда ВКМ включены в электронный сводный каталог российских коллекций и WFCC Global Catalogue of Microorganisms (GCM — [gcm.wfcc.info/](http://gcm.wfcc.info/)).

Во всех учреждениях Роспотребнадзора, на базе которых имеются структурные подразделения коллекций патогенных микроорганизмов, разработано информационное сопровождение оперативной коллекционной деятельности. Информация в

базах данных достаточно разнородна и зависит, в частности, от исходных данных по единицам хранения, предназначения коллекции, наличия инструментов информационных технологий и персонала. Такая гетерогенность каждой конкретной коллекции как по содержанию, так и по формату затрудняет информационный взаимообмен.

В настоящий момент в рамках унификации коллекционной деятельности в учреждениях Роспотребнадзора разрабатывается «Положение об обеспечении коллекционной деятельности в области патогенных микроорганизмов». Целью данного документа является создание единой формы учетной документации, единого алгоритма выборки изолятов, подлежащих хранению, единой процедуры паспортизации коллекционного штамма и общего электронного каталога патогенных микроорганизмов для обеспечения информационного обмена между структурами этого ведомства.

В Волгоградском НИПЧИ создан электронный каталог (Microsoft Excel) коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и база данных (Microsoft Access) «Коллекционные штаммы патогенных буркхольдерий ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора» (государственная регистрация № 2017620285).

Главной задачей при создании БД являлось проектирование такой системы, которая была бы достаточно гибкой и позволяла в дальнейшем включать в нее новые разделы. При разработке структуры базы данных учитывалась необходимость отражения всего многообразия свойств и связей рассматриваемых объектов, обеспечения быстрого и удобного способа получения информации. Созданная БД является реляционной и представляет собой систему связанных таблиц, каждая из которых описывает определенную информационную категорию, определяемую рядом характерных признаков. Наиболее значимыми являются категории «штамм», «фенотипические свойства» и «генотипические свойства», каждая из которых несет определенную функциональную информацию. Большое значение имеют подразделы, выполненные в форме справочников и описывающие биохимические свойства и особенности генетических характеристик. В них характеризуются свойства, важные для определения таксономического положения штамма и его практического использования.

Разработанная структура БД позволяет хранить и отображать разнообразную информацию о содержащихся объектах, формализованную, текстовую и графическую информацию, а также документы, созданные другими приложениями. Структурированная таким образом информация по коллекционным штаммам *V. pseudomallei* и *V. mallei* представляет единую систему, обеспечивающую быстрый переход между логически связанными объектами, целенаправленный отбор объектов и их групп по определенным признакам и упрощает повседневную оперативную деятельность коллекции. Вместе с тем, очевидна необходимость создания ежегодно обновляемого единого каталога коллекционных штаммов организаций держателей государственных и учрежденческих коллекций Роспотребнадзора.

В обзоре рассмотрены основные направления совершенствования коллекционной деятельности. Для сохранения коллекционных штаммов в виде лиофилизированных культур необходима разработка регламентирующих документов, определяющих порядок использования современных аппаратов для сублимационного высушивания микроорганизмов I — IV группы патогенности, а также мер по соблюдению требований биологической безопасности и снижения риска возникновения аварии с ПБА. В случае применения метода низкотемпературной консервации необходимо наличие системы постоянного температурного контроля низкотемпературных холодильников, аварийной сигнализации с уведомлением об изменении температурного состояния, системы охлаждения помещения хранилища, дублированное основное энергоснабжение и аварийное от дизельного генератора, а также резервные морозильные камеры. Проведение ревизии с подтверждением таксономической принадлежности штаммов и паспортизации коллекций патогенных буркхольдерий необходимо осуществлять с использованием современных автоматических бактериологических

анализаторов, например VITEK 2, метода MALDI ToF масс-спектрометрии, а также методов исследования генома: VAT, MLVA и MLST/полногеномное секвенирование — для *B. pseudomallei*, DFR, MLVA и полногеномное секвенирование — для *B. mallei*. Создание единого электронного каталога реализовано в программе Microsoft Excel, а базы данных — Microsoft Access, как универсального и доступного информационно-обеспечения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарева О. С., Савченко С.С., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Лемасова Л.В., Антонов В.А. Генотипирование штаммов *Burkholderia mallei* на основе метода амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016, 1: 33-37.
2. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред. Пробл. особо опасных инф. 2016, 3: 5-12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.
3. Грачева И.В., Осин А.В. Низкотемпературная консервация коллекционных штаммов холерных вибрионов. Пробл. особо опасных инф. 2014, 4: 39-42.
4. Гришкина Т.А., Тимофеева Е.В., Спиридонов В.А. Оценка результатов хранения музейных штаммов возбудителя сапа в течение длительного периода. Пробл. особо опасных инф. 2004, 87: 40-42.
5. Куплетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. Микробиология. 2011, 80 (6): 842-846.
6. Лопастейская Я.А., Молчанова Е.В., Шаров Т.Н., Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Викторов Д.В., Топорков А.В. Применение времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза. Клин.лаб.диагн. 2016, 61 (8): 502-507.
7. Малахаева А.Н., Ляшова О.Ю., Плотников О.П., Осин А.В. Хранение штаммов *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Brucella abortus* 19 ВА в жизнеспособном состоянии путем их глубокого замораживания. Пробл. особо опасных инф. 2015, 1: 63-66.
8. Молчанова Е.В., Лопастейская Я.А., Незнамова А.В., Кузютина Ю.А., Агеева Н.П., Захарова И.Б., Викторов Д.В., Топорков А.В. Особенности идентификации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* с помощью микробиологического анализатора Vitek 2 compact 30. Пробл. особо опасных инф. 2016, 3: 57-61.
9. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. Вестник РАН. 2003, 73 (3): 195-204.
10. Осин А.В., Червякова Н.С., Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Куклев В.Е. Применение автоматизированных систем идентификации микроорганизмов для верификации таксономической принадлежности коллекционных штаммов патогенных бактерий. Пробл. особо опасных инф. 2016, 1: 79-83. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-79-83.
11. Осин А.В., Червякова Н.С., Валова Т.В. Лиофилизация штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационных установках разного типа и оценка качества полученных препаратов. Пробл. особо опасных инф. 2016, 3: 66-70.
12. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденция развития. Известия вузов. 2009, 4: 99-121.
13. Соловьев Е. А., Саяпина Л. В., Осина Н. А., Давыдов Д. С., Бондарев В. П. Характеристика фенотипических и генетических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ с длительными сроками хранения. Пробл. особо опасных инф. 2015, 4: 91-95. DOI: <http://dx.doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-91-95>.
14. Червякова Н.С., Осин А.В. Установление аутентичности референтных штаммов патогенных микроорганизмов с применением автоматического микробиологического анализатора Vitek 2. Пробл. особо опасных инф. 2017, 1: 100-104. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-100-104.
15. Червякова Н.С., Валова Т.В., Осин А.В. Использование лиофильных аппаратов камерного типа в коллекциях патогенных микроорганизмов. Пробл. особо опасных инф. 2014, 3: 65-68.
16. Casaregola S., Vasilenko A., Romano P. et al. An Information System for European culture collections: the way forward. 2016, 5: 772-783.
17. Crowley E., Bird P., Fisher K. et al. Evaluation of the VITEK 2 Gram-negative (GN) microbial identification test card: collaborative study. J. AOAC Int. 2012 May-Jun; 95 (3): 778-85. PMID:22816270.
18. Currie B.J., Dance D.A., Cheng A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and

- melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008 Dec; 102 Suppl. 1: S1-4. PMID: 19121666.
19. Currie B.J., Haslem A., Pearson T. et al. Identification of melioidosis outbreak by multilocus variable number tandem repeat analysis. *Emerg. Infect. Dis.* 2009 Feb; 15 (2): 169-174.
  20. De Paoli P. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, 29 (5): 897-910.
  21. Duangsonk K., Gal D., Mayo M. et al. Use of a variable ampli-con typing scheme reveals considerable variation in the accessory genomes of isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44 (4): 1323-1334.
  22. Gams W., Hennebert G., Stalpers J. et al. Structuring strain data for storage and retrieval of information on fungi and yeasts in MINE, the Microbial Information Network Europe. *J. Gen. Microbiol.* 1988, 134: 1667-1689.
  23. Gauthier J., G r me P., Defez M. et al. Melioidosis in travelers returning from Vietnam to France. *Emerg. Infect. Dis.* 2016 Sep; 22 (9): 1671-1673. Doi: 10.3201/eid2209.160169. PMID: PMC4994359.
  24. Gibson L.F., Khoury J.T. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. *Lett. Appl. Microbiol.* 1986, 3 (6): 127-129.
  25. Gilad J., Harary I., Dushnitsky T. et al. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness. *IMAJ.* 2007, 9: 499-503.
  26. Karger A., R. Stock, Ziller M. et al. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. *BMC Microbiology.* 2012, 12: 229.
  27. Kiratisin P., Santanirand P., Chantratita N. et al. Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007, 59: 277-281.
  28. Ma J., Miyazaki S., Sugawara H. A handy database for culture collections worldwide: CCINFO-PC. *Comput. Appl. Biosci.* 1995 Apr; 11 (2): 209-212.
  29. Podin Y., Kaestli M., McMahon N. et al. Reliability of automated biochemical identification of *Burkholderia pseudomallei* is regionally dependent. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51 (9): 3076.
  30. Sarovich D.S., Garin B., De Smet B., et al. Phylogenomic analysis reveals an Asian origin for African *Burkholderia pseudomallei* and Further Supports Melioidosis Endemicity in Africa. *Mosphere.* 2016 Mar 9; 1 (2). Pii: e00089-15. Doi: 10.1128/msphere.00089-15.
  31. U'Ren J.M., Schupp J.M., Pearson T. et al. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC Microbiol.* 2007, 7: 23.
  32. Van den Beld M.J., Reinders E., Notermans D.W. et al. Possible misidentification of species in the *Pseudomonas fluorescens* lineage as *Burkholderia pseudomallei* and *Francisella tularensis*, and emended descriptions of *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas gessardii* and *Pseudomonas proteolytica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016 Sep; 66 (9): 3420-3425. DOI: 10.1099/ijsem.0.001206. Epub. 2016 Jun 3.
  33. Van Zandt K.E., Greer M.T., Gelhaus H.C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet J. Rare Dis.* 2013 Sep 3; 8: 131. DOI: 10.1186/1750-1172-8-131.
  34. Wu L., Sun Q., Sugawara H. et al. Global catalogue of microorganisms (gcm): a comprehensive database and information retrieval, analysis, and visualization system for microbial resources. *BMC Genomics.* 2013 Dec 30; 14: 933. DOI: 10.1186/1471-2164-14-933.
  35. Wu L., Sun Q., Desmeth P. et al. World data centre for microorganisms: an information infrastructure to explore and utilize preserved microbial strains worldwide. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4; 45 (D1): D611-D618. DOI: 10.1093/nar/gkw903. Epub 2016 Oct 7.
  36. Zong Z., Wang X., Deng Y. et al. Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the VITEK 2 system. *JMM.* 2012, 61: 1483-1484.

*Поступила 10.11.17*

Контактная информация: Елена Владимировна Молчанова, к.б.н.,  
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)37-37-74

## СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Тюленева Е.Г., Москвитина Э.А.* Эпидемиологическая оценка миграции населения в возможности заноса холеры в субъекты Российской Федерации..... 3  
*Tyuleneva, E.G., Moskvitina, E.A.* Epidemiological assessment of population migration in the possibility of cholera importation into Russian Federation constituents
- Тутков А.В., Платонов А.Е., Стуколова О.А., Миронов К.О., Дмитриева Г.М., Кострыкина Т.В., Сорокина О.В., Черных В.И., Миноранская Н.С.* Эпидемиологические особенности иксодовых клещевых боррелиозов в Красноярском крае в контексте изучения распространенности инфекции, вызываемой *Borrelia miyamotoi*..... 10  
*Titkov, A.V., Platonov, A.E., Stukolova, O.A., Mironov, K.O., Dmitrieva, G.M., Kostrykina, T.V., Sorokina, O.V., Chernykh, V.I., Minoranskaya, N.S.* Epidemiological features of Ixodes tick-borne borelioses in the Krasnoyarsk territory in the context of searching for the cases of infection caused by *Borrelia miyamotoi*
- Кравцов А.Л., Генералов С.В., Кожевников В.А., Гаврилова Ю.К., Абрамова Е.Г., Кочкин А.В., Никифоров А.К.* Определение доли инфицированных вирусом бешенства клеток линии Vero с помощью проточной цитометрии..... 18  
*Kravtsov, A.L., Generalov, S.V., Kozhevnikov, V.A., Gavrilova, Yu.K., Abramova, E.G., Kochkin, A.V., Nikiforov, A.K.* Determination of the rabies virus-infected Vero line cell portion by flow cytometry
- Кудряшова А.М., Галстян А.Г., Файзулов Е.Б., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В., Зверев В.В., Борисова О.В.* Выявление аденовирусного антигена методом твердофазного иммуноферментного анализа с ГКР-детекцией сигнала ..... 25  
*Kudryashova, A.M., Galstian, A.G., Faizuloev, E.B., Olenin, A.Yu., Lisichkin, G.V., Zverev, V.V., Borisova, O.V.* Detection of adenovirus antigen by a Surface-Enhanced Raman Scattering enzyme-linked immunosorbent assay
- Самарцева Т.Г., Оксанич А.С., Гаврилова Н.Ф., Яковлева И.В., Свиридов В.В., Зверев В.В.* Применение универсальных плазмидных конструкций для получения полноразмерных рекомбинантных антител заданной специфичности в эукариотических клетках ..... 32  
*Samartseva, T.G., Oksanich, A.S., Gavrilova, N.F., Yakovleva, I.V., Sviridov, V.V., Zverev, V.V.* Using of universal plasmid constructions for design of recombinant antibodies with defined specificity in eukaryotic cells
- Соломенный А.П., Зубарева Н.А.* Особенности рекомбинационной геномики бактерий рода *Acinetobacter* — патогенов человека ..... 40  
*Solomennyi, A.P., Zubareva, N.A.* Peculiarities of recombinative genomics of *Acinetobacter* — human pathogen
- Образцова О.А., Алейникова К.А., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г.* Вариабельность нуклеотидных последовательностей гена *arp* у российских изолятов *Treponema pallidum*.... 45  
*Obraztsova, O.A., Aleinikova, K.A., Kubanov, A.A., Deryabin, D.G.* *Arp* gene nucleotid sequences variability in russian *Treponema pallidum* isolates
- Фельдблум И.В., Романенко В.В., Меньшикова М.Г., Окунева И.А., Макаров А.Е., Исаева Н.В., Радзивил М.Г.* Сравнительная оценка безопасности и иммуногенности вакцины для профилактики полиомиелита инактивированной (Нидерланды) и вакцины «Имовакс Полио» (Франция) при трехкратной иммунизации детей ..... 53  
*Feldblyum, I.V., Romanenko, V.V., Menshikova, M.G., Okuneva, I.A., Makarov, A.E., Isaeva, N.V., Radzivil, M.G.* Comparative evaluation of safety and immunogenicity inactivated vaccine for polyomieltis prevention (Netherlands) and vaccine «Imovax Polio» (France) in children using triple immunization
- Мокроусов И.В., Пасечник О.А., Вязовая А.А., Блох А.И., Черняева Е.Н., Стасенко В.Л.* О важности применения эволюционно надежных маркеров для детекции штаммов *Mycobacterium tuberculosis* генетического семейства LAM ..... 60  
*Mokrousov, I.V., Paschenik, O.A., Vязовая, A.A., Blokh, A.I., Chernyaeva, E.N., Stasenko, V.L.* O важности применения эволюционно надежных маркеров для детекции штаммов *Mycobacterium tuberculosis* генетического семейства LAM

*Mokrousov, I.V., Pasechnik, O.A., Vyazovaya, A.A., Blokh, A.I., Chernyaeva, E.N., Stasenko, V.L.* On importance of using evolutionarily robust markers for detection of *Mycobacterium tuberculosis* strains of LAM genetic family

*Оспельникова Т.П., Морозова О.В., Андреева С.А., Исаева Е.И., Колодяжная Л.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Бурцева Е.И., Мукашева Е.А., Ершов Ф.И.* Особенности биомаркеров воспаления при гриппе .....67

*Ospelnikova, T.P., Morozova, O.V., Andreeva, S.A., Isaeva, E.I., Kolodyazhnaya, L.V., Kolobukhina, L.V., Merkulova, L.N., Burtseva, E.I., Mukasheva, E.A., Ershov, F.I.* Influenza inflammation biomarkers features

#### ОБЗОРЫ (REVIEWS)

*Петухова Е.С., Воробьев Д.С., Семенова И.Б.* Роль белков *Streptococcus pneumoniae* в разработке серотипнезависимых пневмококковых вакцин .....74

*Petukhova, E.S., Vorobyev, D.S., Semenova, I.B.* The role of proteins of *Streptococcus pneumoniae* in the development of serotype-independent pneumococcal vaccines

*Пахомов Д.В., Машилов К.В., Костинова А.М.* Иммунопрофилактика в лечении ВИЧ-инфицированных пациентов с бронхолегочной патологией .....80

*Pakhomov, D.V., Mashilov, K.V., Kostinova, A.M.* Immunoprophylaxis in the treatment of HIV-infected patients in bronchopulmonary pathology

*Мерينو́ва О.А., Топорков А.В., Мерино́ва Л.К., Антонова Е.В., Викторов Д.В.* Биологическая безопасность: анализ современного состояния системы подготовки специалистов в Российской Федерации .....87

*Merinova, O.A., Toporkov, A.V., Merinova, L.K., Antonova, E.V., Victorov, D.V.* Biological safety: analysis the contemporary state of the system of training specialists in Russian Federation

*Матосова Е.В., Андриюков Б.Г.* Антимикробные механизмы нейтрофилов как перспективные мишени для фармакологической модуляции неспецифической защиты организма .....96

*Matosova, E.V., Andryukov, B.G.* Antimicrobial mechanisms of neutrophils as perspective targets for pharmacological modulation of non-specific protection of the organism

*Семенцова А.О., Дедков В.Г., Терновой В.А., Чуб Е.В., Пьянков С.А., Агафонов А.П., Максютов Р.А., Малеев В.В., Попова А.Ю.* Клиническая лабораторная диагностика лихорадки Эбола. Анализ существующих методик и диагностических средств .....105

*Sementsova, A.O., Dedkov, V.G., Ternovoy, V.A., Chub, E.V., Pyankov, S.A., Agafonov, A.P., Maksyutov, R.A., Maleev, V.V., Popova, A.Yu.* In vitro diagnosis for Ebola virus disease. A comparison of current techniques and diagnostic assays

*Молчанова Е.В., Агеева Н.П.* Научно-методические аспекты совершенствования деятельности коллекции патогенных микроорганизмов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института .....117

*Molchanova, E.V., Ageeva, N.P.* Scientific and methodological support for development of pathogenic microorganism collection of Volgograd Research Institute for Plague Control