

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

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

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

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

4

июль—август

МОСКВА 2019

ИЗДАТЕЛЬ: ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

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

Адрес редакции:

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

Статьи посылать: mech.inst@mail.ru

Зав. редакцией Л.В.Иваничева

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.
Свидетельство ПИ № ФС77-75442

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

Формат 70x108 1/16. Печать офсетная.

Отпечатано в ООО «Буки Веди»
117246, г. Москва, проезд Научный,
д. 19, этаж 2, ком. 6Д, оф. 202
Тел.: (495)926-63-96
www.bukivedi.com
E-mail: info@bukivedi.com

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 2019

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

С.А.Солонин¹, М.И.Корабельникова², А.И.Баженов¹, Е.Н.Кудрявцева², С.Н.Кузин², М.А.Годков¹

ЧАСТОТА ОБНАРУЖЕНИЯ МАРКЕРОВ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ МНОГОПРОФИЛЬНЫХ СТАЦИОНАРОВ КАК ПАРАМЕТР МОНИТОРИНГА СИСТЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА

¹НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, ²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва

Цель. Сравнить частоту определения ВИЧ-инфекции у пациентов крупных многопрофильных стационаров по оказанию экстренной и плановой медицинской помощи и оценить значение многолетней динамики этого показателя в качестве количественной характеристики эпидемического процесса ВИЧ-инфекции. *Материалы и методы.* Ретроспективно проанализированы результаты освидетельствования на ВИЧ-инфекцию пациентов в НИИ СП им. Н.В. Склифосовского (НИИ СП) и МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского за 2008-2017 гг. Многолетнюю динамику показателей выявляемости ВИЧ-инфекции анализировали с помощью расчета величины тенденции методом наименьших квадратов. Выраженность тенденций (рост/снижение) оценивали по критериям, предложенным В.Д. Беляковым с соавт. (1981). *Результаты.* За исследованный период в НИИ СП и МОНИКИ на ВИЧ-инфекцию освидетельствованы 251 213 и 165 194 человек, соответственно. За десять лет количество госпитализаций ВИЧ-инфицированных пациентов в НИИ СП увеличилось в 1,7 раза, в МОНИКИ — в 3,1 раза. Выявляемость ВИЧ-инфекции у пациентов НИИ СП превышала показатели МОНИКИ от 3,2 до 6,0 раз. При этом в МОНИКИ отмечена статистически значимая тенденция к росту госпитализаций ВИЧ-инфицированных граждан ($R^2=0,8049$, $p=0,0004$) с выраженным среднегодовым темпом прироста 9,6% в год. *Заключение.* Полученные нами данные свидетельствует о наличии тенденции к увеличению числа обращений за медицинской помощью ВИЧ-инфицированных граждан в многопрофильные общесоматические стационары Москвы и Московской обл. Наиболее существенные темпы прироста зафиксированы в отделениях реанимационного ($T=14,2\%$) и хирургического ($T=9,8\%$) профиля МОНИКИ. Индикаторными группами высокого риска инфицирования ВИЧ-инфекцией в Московском регионе необходимо рассматривать пациентов с экстренной хирургической патологией, острым экзогенными отравлениями химической этиологии, а также лиц, страдающих психическими расстройствами.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 3—10

Ключевые слова: ВИЧ, ВИЧ-инфекция, общесоматический стационар, распространенность, эпидемиологический надзор

S.A.Solonin¹, M.I.Korabelnikova², A.I.Bazhenov¹, E.N.Kudryavtseva², S.N.Kuzin², M.A.Godkov¹

THE PREVALENCE OF HIV INFECTION IN PATIENTS OF GENERAL HOSPITALS AS A PARAMETER FOR MONITORING THE SYSTEM OF EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE

¹Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, ²Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

Aim. The aim of this study is to compare the prevalence of HIV infection in patients of large multidisciplinary hospitals in providing emergency and planned medical care and to evaluate the value of the long-term dynamics of this indicator as a quantitative characteristic of the epidemic process of HIV infection. *Materials and methods.* We retrospectively analyzed the results of examination for HIV infection of patients in the Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine (RIEM) and Moscow Regional

Research Clinical Institute (MONIKI) from 2008 to 2017. Long-term dynamics of the prevalence HIV infection were analyzed by using linear regression analysis. The intensity of trends (growth/decline) was assessed by the criteria proposed by V. D. Belyakov et al. (1981). *Results.* We examined for HIV infection 251 213 and 165 194 people in the research RIEM and MONIKI, respectively. For decade, the number of hospitalizations of HIV-infected patients to RIEM increased by 1.7 times, to MONIKI by 3.1 times. Prevalence of HIV infection in the patients of RIEM exceeded MONIKI ones from 3,2 to 6,0 times. At the same time, MONIKI showed a statistically significant trend towards an increase in hospitalizations of HIV-infected citizens ($R^2=0,8049$, $p=0,0004$) with a pronounced average annual growth rate of 9,6% per year. *Conclusion.* We obtained results indicates a tendency to increase the number of recourses HIV-infected persons to general hospitals in Moscow and Moscow region. The most significant average annual increase in the prevalence over a decade period were recorded in the intensive care (+14.2%) and surgical (+9.8%) departments of MONIKI. Indicator groups of high risk of HIV infection in the Moscow region should be considered patients with urgent surgical pathology, acute exogenous poisoning of chemical etiology, as well as persons suffering from mental disorders.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 3—10

Key words: HIV, HIV-infection, general hospital, prevalence, surveillance

ВВЕДЕНИЕ

Современная эпидемиологическая ситуация по ВИЧ-инфекции в России остается весьма напряженной с отчетливой тенденцией к дальнейшему ухудшению [9,13]. На фоне роста заболеваемости ВИЧ-инфекцией зафиксировано возрастающее вовлечение в эпидемический процесс людей, не входящих в уязвимые группы населения. Принятая ВОЗ Глобальная стратегия по предотвращению распространения ВИЧ к 2020 году [15], по-видимому, реализована в России не будет, поскольку мероприятия по ее внедрению сопряжены с большим объемом организационной работы и значительными финансовыми затратами. В этой связи, повышается актуальность исследований по повышению эффективности действующей системы эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией и ее отдельных подсистем. Одним из направлений таких исследований, с нашей точки зрения, является определение значимости отдельных количественных характеристик эпидемического процесса ВИЧ-инфекции для постановки общего эпидемиологического диагноза. Одним из параметров, позволяющим количественно оценивать интенсивность эволюции эпидемии ВИЧ-инфекции, является, по нашему мнению, динамика частоты определения маркеров ВИЧ-инфекции у пациентов многопрофильных стационаров. Важно отметить, что этот показатель необходимо оценивать с учетом особенностей (возрастных, а также характером патологий) контингентов пациентов, поступающих на лечение. Очевидно, что между пациентами, нуждающимися в экстренной и плановой медицинской помощи, существуют различия в степени риска поведения относительно инфекционных заболеваний, подверженности травмам, приверженности лечению и др. [4,8,12]. В этой связи, представляется важным изучить динамику показателя частоты определения маркеров ВИЧ-инфекции у пациентов, госпитализированных для оказания экстренной и плановой медицинской помощи в сравнительном аспекте, а также оценить целесообразность применения его динамики (многолетней тенденции) для оценки развития эпидемического процесса.

Цель исследования: сравнить частоту определения ВИЧ-инфекции у пациентов крупных многопрофильных стационаров по оказанию экстренной и плановой медицинской помощи и оценить значение многолетней динамики этого показателя в качестве количественной характеристики эпидемического процесса ВИЧ-инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный анализ обращений пациентов с ВИЧ-инфекцией в специализированные отделения научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского (НИИ СП) и Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ) за 2008-2017 гг. Скрининговые исследования на антиген/антитела к ВИЧ выполняли в Отделе лабораторной диагностики НИИ СП и головной лаборатории диагностики СПИД МОНИКИ с использованием метода иммуноферментного анализа на тест-системах, разрешенных к применению на территории РФ в установленном порядке. Освидетельствование на ВИЧ-инфекцию осуществлялось с информированного согласия пациента или его законного представителя. При установлении факта недееспособности скрининг выполнялся в соответствии с действующим законодательством РФ, Москвы и Московской области (МО). Подтверждение первично-положительных результатов осуществляли в соответствии с требованиями Санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции». Частоту обнаружения ВИЧ-инфекции в стационарах оценивали по абсолютному количеству выявленных случаев инфекции и по показателю выявляемости в процентах. При этом рассматривали каждый случай выявления ВИЧ-инфекции в НИИ СП и МОНИКИ как обращение инфицированного пациента за медицинской помощью. Эпидемиологическую оценку проводили в зависимости от специализации подразделений. Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы Graph Pad Prism 7 (Graph Pad Software, США). Многолетнюю динамику выявляемости ВИЧ-инфекции анализировали с помощью линейного регрессионного анализа. С целью оценки информативности и значимости уравнения регрессии рассчитывали коэффициент детерминации — R^2 . Различия оценивали как статистически значимые при вероятности 95% ($p < 0,0500$) и выше. Динамику показателей среднегодовых темпов (Т) прироста рассчитывали с использованием программного обеспечения — EpiTrend. Выраженность тенденции (рост/снижение) оценивали по критериям, предложенным В.Д. Беляковым с соавт. (1981): от 0% до 1% — стабильная; от 1,1% до 5% — умеренная; свыше 5% — выраженная.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период с 2008 по 2017 гг. в НИИ СП на наличие ВИЧ-инфекции освидетельствованы 251 213 человек, в МОНИКИ — 165 194. За десять лет количество ежегодно госпитализируемых ВИЧ-инфицированных граждан в НИИ СП увеличилось в 1,7 раза, в МОНИКИ — в 3,1 раза. Частота обнаружения ВИЧ-инфекции в НИИ СП и МОНИКИ в разные годы наблюдений варьировала от 1,2 до 1,9% и 0,2 до 0,6%, соответственно. При этом следует обратить внимание, что выявляемость вируса у пациентов НИИ СП — учреждении, оказывающим преимущественно экстренное и неотложное пособие, была от 3,2 до 6,0 раз выше, чем в общесоматическом стационаре, оказывающим медицинскую помощь в плановом порядке — МОНИКИ.

Нами отмечено, что динамика выявляемости ВИЧ-инфекции в каждой из медицинских организаций в течение анализируемого периода имела свои особенности. Для НИИ СП она выглядит как S-образная кривая, которую условно можно разделить на несколько стадий: роста (2008-2012 гг.), пика выявляемости (2012-2013 гг.), спада (2013-2015 гг.) и стабилизации (2015-2017 гг.). В стадии роста отмечалась выраженная (со среднегодовым темпом прироста 10,4%), статистически незначимая ($R^2=0,7705$, $p=0,0503$) тенденция к увеличению показателя выявляемости ВИЧ-инфекции с 1,2 до 1,9%. В дальнейшем, после непродолжительного пика, зарегистрирована выраженная (среднегодовой темп снижения — 5,6%), статистически незначимая ($R^2=0,675$, $p=0,0880$) тенденция к снижению выявляемости ВИЧ-инфекции —

с 1,9 до 1,5% — и её стабилизация на протяжении трёх последних лет. Данная тенденция требует дальнейшего наблюдения.

По нашему мнению, основными причинами снижения частоты обнаружения лабораторных маркеров ВИЧ-инфекции в НИИ СП стало сокращение числа госпитализаций пациентов с острыми экзогенными отравлениями, в том числе, психоактивными веществами (ПАВ), а также общим увеличением количества ежегодно прелечиваемых больных [6,10].

В МОНИКИ за исследуемый период зарегистрирована выраженная статистически значимая тенденция к росту частоты обнаружения ВИЧ-инфекции ($R^2=0,8049$, $p=0,0004$) у пациентов планового стационара со среднегодовым темпом прироста 9,6% в год (табл.).

В целом динамика выявления ВИЧ-инфекции у пациентов НИИ СП была отлична от показателей МОНИКИ. Наиболее точно она может быть описана моделью полиномиального тренда шестой степени ($R^2=0,9097$). Такие различия могут быть объяснены разнородностью анализируемых выборок обследуемых контингентов, обращающихся за медицинской помощью в НИИ СП и МОНИКИ, а также различиями в эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции в г. Москве и МО.

Показатель выявляемости ВИЧ-инфекции является в значительной степени усреднённым результатом по стационару и не отражает различий в структуре поступлений инфицированных пациентов в разные специализированные отделения. При сравнении данных величин нами отмечено, что практически в течение всего периода наблюдения частота обнаружения ВИЧ-инфекции у пациентов отделений реанимационного и хирургического профиля в НИИ СП и МОНИКИ была выше, чем в отделениях терапевтического профиля. Исключение имело место лишь в 2010 году, когда зарегистрированные показатели оказались либо аналогичны, либо выше, чем в отделениях хирургического профиля (табл.). Подобные результаты могут быть свидетельством госпитализации схожих контингентов риска по распространению ВИЧ-инфекции в плановом и экстренном порядке.

Следует обратить внимание и на различия в выявляемости ВИЧ-инфекции в отделениях хирургического профиля двух стационаров. В 2016-2017 гг. она оказалась выше в МОНИКИ, чем в НИИ СП. Наиболее высокие значения регистрировались среди пациентов, поступающих в отделения хирургического профиля МОНИКИ: челюстно-лицевой хирургии — 0,30-1,5%, офтальмологии — 0,2-1,5% и оториноларингологии — 0,3-1,5%. Причём в первых двух за десятилетний период отмечен умеренный и выраженный среднегодовой темп прироста — в 4,9 и 8,3%, соответственно. Данные особенности могут свидетельствовать о существовании тесной взаимосвязи между частотой обнаружения ВИЧ-инфекции и видом поступающей неотложной патологии. Несмотря на высокие показатели выявляемости ВИЧ-инфекции у пациентов ЛОР-отделения, тенденция динамики за последние 10 лет, напротив, демонстрирует умеренное снижение — 1,8% в год.

Ретроспективный анализ медицинской документации позволил установить, что значительная часть госпитализаций в отделения ЧЛХ и офтальмологии МОНИКИ ВИЧ-инфицированных была обусловлена экстренным состоянием пострадавших в связи с получением травм лица и шеи, костей челюстно-лицевой области и ЛОР-органов, в том числе в результате действий криминального характера. Причины для обращений таких пациентов именно в плановый стационар МОНИКИ по каналу «самотёк», а не другие профильные общесоматические стационары скорой помощи Москвы, в том числе бригадами скорой медицинской помощи, требуют дальнейшего изучения.

В период с 2011 по 2016 гг., за исключением 2013 г., выявляемость ВИЧ инфекции в реанимационных отделениях МОНИКИ также превышала показатели в подразделениях НИИ СП аналогичного профиля (табл.). Как уже было отмечено ранее,

Выявляемость и среднегодовой темп прироста обнаружения анти-ВИЧ у пациентов специализированных отделений НИИ СП и МОНИКИ с 2008 по 2017 гг. (%)

МО/профиль	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Т, %
МОНИКИ	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	+9,6
Терапия	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,5	0,4	+8,1
Хирургия	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	+9,8
ЛОР	0,8	1,1	0,3	1,0	1,5	0,8	0,9	1,2	0,6	0,5	-1,8
Офтальмология	1,5	0,2	0,5	0,4	0,2	1,0	0,7	1,3	1,2	1,5	+8,3
ЧЛХ	0,8	0,4	1,4	0,3	1,5	1,5	1,3	1,3	1,3	0,9	+4,9
Реанимация	0,0	0,8	0,8	1,8	3,3	0,5	3,1	2,3	4,2	2,4	+14,2
НИИ СП	1,2	1,3	1,4	1,4	1,9	1,9	1,6	1,5	1,5	1,5	+1,8
Терапия	0,0	0,1	0,6	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	+4,2
Хирургия	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	+0,7
Реанимация	1,2	1,3	1,1	1,1	0,8	1,3	1,4	1,3	0,9	1,2	+0,08
ТХ	4,8	5,9	7,9	8,8	11,5	11,8	9,3	9,4	10,9	11,6	+5,9
ОЛОО	2,1	2,2	2,8	2,7	2,9	3,1	3,3	3,5	4,2	2,8	+4,6
ПСО	2,6	3,0	3,4	3,7	5,1	2,7	3,2	3,9	3,3	6,0	+4,0

Примечание. ЛОР — оториноларингология, ОЛОО — лечение острых отравлений, ПСО — кризисные состояния и психосоматические расстройства, ЧЛХ — челюстно-лицевая хирургия, ТХ — токсикологическая реанимация.

это обусловлено увеличением числа поступлений в экстренном порядке, а также общим незначительным количеством нуждающихся в оказании реанимационной помощи в МОНИКИ.

Особо обращает на себя внимание тот факт, что за десятилетний период наблюдения среднегодовые темпы прироста выявляемости ВИЧ-инфекции в отделениях терапевтического, хирургического и реанимационного профиля МОНИКИ оказались значительно (>1,4 раза) выше, чем среди группы повышенного риска инфицирования ВИЧ-пациентов с острыми экзогенными отравлениями в результате употребления ПАВ, поступающих в отделения токсикологической реанимации и лечения острых отравлений для психических больных (ОЛОО) НИИ СП (табл.). Несмотря на то, что за исследуемый интервал времени показатель выявляемости ВИЧ-инфекции в данной когорте возрос более чем в 2 раза — с 4,8 до 11,6%. По нашему мнению, такая тенденция может быть свидетельством резкого ухудшения эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции среди населения в МО.

Отдельного внимания заслуживает высокая частота обнаружения (2,6-6,0%) ВИЧ-инфекции у лиц с психической патологией в отделении кризисных состояний и психосоматических расстройств (ПСО). Это является свидетельством их чрезвычайно высокой уязвимости к инфицированию ВИЧ из-за утраты способности критически оценивать и контролировать своё социальное поведение (табл.) [5,14].

В рамках совместного исследования, выполненного на базах общесоматических стационаров, оказывающих преимущественно плановую и экстренную специализированную медицинскую помощь, с различающимся контингентом взрослых пациентов, нами получены схожие результаты: у лиц с экстренной патологией выявляемость ВИЧ-инфекции оказалась значительно выше, чем у тех, кто обращался за помощью в плановом порядке.

Начиная с 1987 г., в РФ функционирует система сбора данных о ВИЧ-инфекции на государственном уровне. Территориальные центры по профилактике и борьбе со СПИД ежемесячно накапливают данные о количестве выполненных исследований и результатах тестирования на ВИЧ-инфекцию обследуемого населения. На этапе

проведения дотестового консультирования при оформлении медицинской документации, в соответствии с действующим законодательством, персонал использует коды, учитывающие эпидемиологические показания и риск инфицирования, для характеристики обследуемых когорт (102-104, 108, 109, 118 и т.д.). Благодаря используемому кодированию специалисты санитарно-эпидемиологической службы получают объективную информацию о частоте обнаружения, заболеваемости и показателях распространенности (пораженности) ВИЧ-инфекции среди контингентов, подлежащих обязательному медицинскому освидетельствованию, рекомендуемых для добровольного обследования, а также в группах высокого риска инфицирования.

Вместе с тем, неуклонный рост числа новых случаев инфицирования ВИЧ среди населения РФ может свидетельствовать о распространении заболевания в группах, не охваченных массовым серологическим скринингом и не регистрируемых в формах государственной статистической отчетности. Например, существующей система кодирования контингентов, находящихся на лечении в медицинских организациях общесоматического профиля, относит всех обследуемых на ВИЧ-инфекцию граждан к группе «прочие» (код 118). С нашей точки зрения подобное кодирование недостаточно информативно. Существующий порядок кодирования при медицинском освидетельствовании на ВИЧ-инфекцию не учитывает особенности поведения, а также правовые и социальные обстоятельства, повышающие их уязвимость к инфицированию ВИЧ-инфекцией. Код 118 не позволяет разграничить социально-маргинализированных и социально-благополучных граждан, учитывать причины и обстоятельства получения травм, например: отравлений при приёме лекарственных средств с целью самолечения от передозировок наркотическими препаратами, принятыми с рекреационными целями, криминальные травмы (избиение) от аутоагрессивных действий и т.д.

Значительно усложнившаяся процедура постановки диагноза «наркомания» также не позволяет по формальным признакам отнести к ключевым уязвимым группам населения — наркопотребителям (код 102) — даже тех пациентов, у которых в стационарах скорой помощи неоднократно фиксируются факты приёма (передозировки) одного или нескольких ПАВ [8]. Существующие недостатки в системе идентификации и кодирования групп риска приводят к искажению информации о формах поведения, способствующих активному распространению вируса.

Федеральным законом от 30.03.1995 г. №38 ФЗ «О предупреждении распространения в Российской Федерации заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции)» предусмотрено обязательное до- и после тестовое консультирование при медицинском освидетельствовании. Порядок консультирования и тестирования на антитела к ВИЧ в Российской Федерации регламентирован рядом нормативно-правовых актов и документов, однако на практике предоставление консультирования нередко носит формальный характер и ограничивается лишь подписанием «информированного согласия». Зачастую эта работа возлагается на средний медицинский персонал. Как правило, врачи ссылаются на отсутствие времени и навыков консультирования, недостаточную информированность о необходимости её проведения и неготовность обсуждать вопросы с пациентами, связанные с поведенческими рисками [2,3]. Вместе с тем, именно от навыков консультационной работы медицинского персонала с ВИЧ-инфицированными в конечном итоге зависит, обратятся ли последние в специализированные учреждения здравоохранения — Центры по профилактике и борьбе со СПИД — за дальнейшим обследованием и лекарственной терапией.

Необходимо констатировать, что среди обследованных контингентов в НИИ СП и МОНИКИ ВИЧ-инфекция наиболее часто встречалась у социально-дезадаптированных граждан с маргинальным типом поведения, употребляющих ПАВ

или страдающих психическими заболеваниями. Нередко такие контингенты госпитализировались в стационары общесоматического профиля (СОП) с травмами, полученными вследствие асоциального поведения, умышленных действий, носящих криминальный характер, либо в результате суицидального поведения. С другой стороны, в СОП всё чаще обращаются социально-благополучные граждане с проявлениями разнообразной возрастной патологии и имеющие в анамнезе ВИЧ-инфекцию [7]. Результаты обследования пациентов МОНИКИ свидетельствуют об активном вовлечении населения МО в эпидемический процесс по ВИЧ, который по среднегодовым темпам прироста (за период с 2008 по 2017 гг.) превышал показатели НИИ СП в 5,3 раза. Как правило, у таких пациентов выявляется широкий спектр сопутствующей патологии — артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, нарушения липидного обмена, сахарный диабет, метаболический синдром, инсульты и т.д. [13]. Динамика заболеваемости и распространённости ВИЧ в РФ, а также «старение» контингента ВИЧ-инфицированных требует пересмотра подхода и тактики к оказанию им медицинской помощи. С одной стороны, рост поступлений ВИЧ-инфицированных пациентов в СОП и значительное число проводимых парентеральных диагностических манипуляций увеличивают риск искусственной передачи инфекции среди пациентов и медперсонала [1]. С другой стороны, необходим обязательный учёт особенностей течения различных видов экстренной патологии на фоне ВИЧ-инфекции и лекарственного взаимодействия у лиц, принимающих антиретровирусную терапию [11,13]. Следует отметить, что выявленные особенности распространения ВИЧ-инфекции в анализируемых стационарах следует рассматривать как региональные с учётом существующей специфики маятниковой миграции работающего населения, особенностей маршрутизации пациентов при оказании первичной медико-санитарной помощи и работе скорой помощи.

Многообразие проявлений эпидемического процесса по ВИЧ-инфекции в Московском регионе становится всё более очевидно. К сожалению, действующая система государственного эпидемиологического надзора не располагает ни достаточными средствами, ни возможностями для охвата и всестороннего анализа существующего разнообразия. Учитывая техническую сложность и высокую стоимость освидетельствования населения в целом, чрезвычайно важным и актуальным для эпиднадзора является идентификация «репрезентативных» групп с высоким уровнем поведенческого риска заражения ВИЧ, а также «групп-проводников», через которые происходит передача инфекции в основную популяцию. Полученные нами данные свидетельствуют о наличии тенденции к увеличению числа обращений за медицинской помощью ВИЧ-инфицированных граждан в многопрофильные СОП Москвы и МО.

По-нашему мнению, изучение структуры и динамики госпитализаций ВИЧ-инфицированных граждан в СОП имеет большую эпидемиологическую ценность, позволяя объективно оценивать распространённость инфекции среди разных социальных слоёв населения, идентифицировать группы, подвергающиеся наибольшему риску инфицирования и нуждающихся в активных профилактических программах. Необходимо обратить пристальное внимание на тот факт, что при обследовании пациентов на ВИЧ-инфекцию в общесоматических стационарах в современных реалиях многообразия проявления эпидемического процесса действующая система кодирования обладает низкой информативностью, поскольку не учитывает рискованное поведение. Высокая выявляемость ВИЧ-инфекции у пациентов с экстренной хирургической патологией, острыми экзогенными отравлениями химической этиологии, а также лиц, страдающих психическими расстройствами, даёт основания рассматривать данные когорты как индикаторные группы высокого риска инфицирования ВИЧ-инфекцией в Московском регионе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Годков М.А., Солонин С.А. Разработка и применение методики оценки степени эпидемической опасности распространения гемоконтактных вирусных инфекций в стационаре скорой медицинской помощи. Медицинский алфавит. Современная лаборатория. 2012, 1(2): 40-46.
2. Кольцова О.В., Сафонова П.В. Психосоциальное консультирование при тестировании на ВИЧ-инфекции. Под ред. Н.А. Белякова. ВИЧ/СПИД — информационно-аналитический бюллетень. СПб., Балтийский медицинский образовательный центр, 2014.
3. Методические рекомендации МР 3.1.5.0076/1-13 До- и послетестовое консультирование как профилактика передачи ВИЧ (утв. и введены в действие Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 20 августа 2013 г.). URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200112076>.
4. Овсянников Д.М., Чехонацкий А.А., Колесов В.Н., Бубашвили А.И. Социальные и эпидемиологические аспекты черепно-мозговой травмы. Саратовский научно-медицинский журнал. 2012, 8(3):777-785.
5. Полянский Д.А., Калинин В.В. Проблема психических расстройств у ВИЧ-инфицированных больных. Социальная и клиническая психиатрия. 2010, 20(4):135-141.
6. Поцхверия М.М., Белова М.В., Солонин С.А., Годков М.А. Структура острых химических отравлений у пациентов с ВИЧ-инфекцией в стационаре скорой медицинской помощи. Наркология. 2018;(1):3-13. doi:10.25557/1682-8313.2018.01.3-13
7. Рассохин В.В., Бузунова С.А., Врацких Т.В., Пантелеева О.В., Торопов С.Э., Тотрова З.М., Голубкин А.А., Орлов Г.М., Беляков Н.А. Проблема старения и инвалидизации ВИЧ-инфицированных пациентов. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2015, 7(1): 7-15.
8. Софронов А.Г., Зуева Л.П., Асланов Б.И., Добровольская А.Е., Чашин В.П., Чашин М.В. Многоуровневая оценка биосоциальных факторов риска ВИЧ-инфекции среди трудовых мигрантов. Журн. микробиол. 2016, (3):81-87.
9. Социально-экономическое положение России. Федеральная служба государственной статистики. Москва, 2018. URL: http://www.gks.ru/free_doc/doc_2018/social/osn-01-2018.pdf.
10. Хубутия М.Ш., Карасев Н.А., Кислухина Е.В., Васильев В.А., Курилин Б.Л. Анализ показателей клинической и организационной деятельности НИИ СП им. Н.В. Склифосовского в 2005-2015 гг. Журнал им Н.В. Склифосовского Неотложная Медицинская Помощь. 2016, (2):59-63.
11. Шахова О.Б., Солонин С.А. Особенности диагностики и лечения акушерско-гинекологической патологии, требующей экстренной медицинской помощи, у ВИЧ-инфицированных пациенток. Российский Вестник Акушера-Гинеколога. 2018;18(3):25-33. doi:10.17116/rosakush201818325-33.
12. Юрова И.Ю. Аттитюды сельских жителей с профессиональными заболеваниями к медицинской помощи: экспертное мнение. Современные исследования социальных проблем (электронный научный журнал). 2015;10(54):26-35. doi:10.12731/2218-7405-2015-10-3.
13. HIV/AIDS surveillance in Europe 2017-2016 data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe; 2017. URL: <http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/hivaids-surveillance-europe-2017-2016-data>.
14. Malow R.M., McMahon R.C., Dévieux J. et al. Cognitive behavioral HIV risk reduction in those receiving psychiatric treatment: a clinical trial. AIDS Behav. 2012;16(5):1192-1202. PMID:22210481 doi:10.1007/s10461-011-0104-y.
15. UNAIDS. 90-90-90: Treatment for all. URL: <http://www.unaids.org/en/resources/909090>.

Поступила 25.01.19

Контактная информация: Солонин С.А.,
129090, Москва, Б. Сухаревская пл., 3, р.т. (495)625-38-97

Д.В.Ульшина, Д.А.Ковалев, Д.Г.Пономаренко, Д.В.Русанова, Т.В.Бердникова, А.Ю.Евченко, О.В.Бобрышева, Ю.В.Сирица, С.В.Писаренко, А.М.Жиров, И.В.Кузнецова, Н.Г.Варфоломеева, А.Н.Куличенко

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ ЭКСТРАКТОВ КРОВИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БРУЦЕЛЛЕЗЕ

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Изучить возможность прямого выявления возбудителя бруцеллеза в биоматериале в условиях эксперимента методом MALDI-TOF MS с использованием ресурсов программы Mass-Up и комплекса пакетов для статистического программного обеспечения с открытым исходным кодом R. *Материалы и методы.* В качестве моделей использовали лабораторных мышей, зараженных возбудителями бруцеллеза (штаммы *B. melitensis* 548, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330). Белковое профилирование проводили на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex «Bruker Daltonics». *Результаты.* Используемый биоинформационно-статистический подход для анализа MALDI-TOF масс-спектров позволил проводить прямое выявление бруцелл в биоматериале с последующим определением их видовой принадлежности на основании выявления группы биомаркеров. *Заключение.* Экспериментально подтверждено, что белковые профили экстрактов крови зараженных животных содержат 11 маркеров, в том числе 6 родоспецифичных для микроорганизмов рода *Brucella* spp., которые могут быть ассоциированы с бруцеллезной инфекцией.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 11—18

Ключевые слова: *Brucella* spp., MALDI-TOF MS, белковое профилирование

Д.В.Ульшина, Д.А.Ковалев, Д.Г.Пономаренко, Д.В.Русанова, Т.В.Бердникова, А.Ю.Евченко, О.В.Бобрышева, Ю.В.Сирица, С.В.Писаренко, А.М.Жиров, И.В.Кузнецова, Н.Г.Варфоломеева, А.Н.Куличенко

MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF PROTEIN BLOOD EXTRACTS OF ANIMALS WITH EXPERIMENTAL BRUCELLOSIS

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. The aim of the present research was to study the possibility of direct detection of the causative agent of brucellosis in a biomaterial under experimental conditions via the MALDI-TOF MS method using Mass-Up program resources and a set of packages for open-source statistical software R. *Materials and methods.* We used laboratory mice infected with the causative agents of Brucellosis (strains *B. melitensis* 548, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330) as models. Protein profiling was performed on a MALDI-TOF Microflex «Bruker Daltonics» mass spectrometer. *Results.* The bioinformatic-statistical approach used for analyzing MALDI-TOF mass spectra allows to carry out a direct detection of *Brucella* in the biomaterial; besides, it is possible to determinate their species via the identification of a group of biomarkers. *Conclusion.* It was experimentally confirmed that the protein profiles of the blood extracts of infected animals contain 11 markers, including 6 genus specific for *Brucella* spp., which can be associated with *Brucella* infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 11—18

Key words: *Brucella* spp., MALDI-TOF MS, protein profiling

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в работу бактериологических лабораторий активно внедряется технология MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным разделением), характеризующаяся высокоточной экспресс-идентификацией микроорганизмов, возможностью анализировать материал, контаминированный посторонней микрофлорой и низкой стоимостью анализа.

Для подавляющего большинства микроорганизмов: грамположительные, грамотрицательные, аэробные и анаэробные бактерии, дрожжи и плесень, сформированы базы масс-спектрометрических данных (БД). С одной стороны, можно с уверенностью утверждать, что имеющиеся коммерческие БД позволяют обеспечить проведение рутинной идентификации патогенов, с другой, количество референсных масс-спектров различных видов микроорганизмов составляет лишь малую долю глобального микробного разнообразия, и поэтому имеющиеся базы данных нуждаются в пополнении.

Возможности применения метода MALDI-TOF MS для точной идентификации микроорганизмов на основании анализа их белковых профилей отражены в статье Seng P. с соавторами [7]. По данным авторов диагностическая информативность метода MALDI-TOF MS варьирует в пределах от 90 до 99,9%.

По результатам ранее проведенных нами исследований была доказана эффективность применения MALDI-TOF MS для индикации и межвидовой дифференциации культур бруцелл, выделенных бактериологическим методом из клинического материала [2]. Можно ожидать, что в ближайшие годы MALDI-TOF MS будет использоваться в комплексе с основными методами лабораторной диагностики бруцеллеза благодаря возможности ее применения для экспресс-идентификации и типирования биологических агентов [3; Sali M. et al., 2018].

Известно, что для успешной идентификации культур микроорганизмов необходимого качества масс-спектры могут быть получены при концентрации в исходном образце — не менее 10^4 м.к./мл [5]. Кроме того, присутствие различных веществ органической и неорганической природы в клиническом материале может также затруднить прямую индикацию бруцелл. В качестве решения указанной проблемы используют различные способы предварительной подготовки проб: фракционирование, удаление мажорных фракций белков, селективное удаление небелковых примесей и др.

Использование MALDI-TOF MS для выявления возбудителей ООИ, в том числе бруцеллеза, в клиническом материале на настоящий момент включает необходимый этап выделения культуры патогена бактериологическим методом, что затрудняет внедрение подобного подхода в практику ввиду увеличения материальных затрат и продолжительности анализа [6]. Дополнительные временные затраты для реализации данного этапа существенно затрудняют возможность раннего назначения адекватного антибиотика и могут приводить к использованию как недостаточно эффективных, так и избыточных режимов терапии. Применительно к рассматриваемой проблеме сокращение времени инкубации высева первичной гемокультуры с применением специальных способов пробоподготовки позволяет проводить прямую идентификацию первичной гемокультуры, минуя этап субкультивирования [8].

Принимая во внимание все достоинства и возможности метода, наиболее актуальной представляется задача по выявлению на белковых профилях исследуемых культур групп специфичных фрагментов — маркеров с целью их дальнейшего поиска в спектрах образцов клинического материала или биоматериала от животных [4].

В ходе проведенных исследований по изучению культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS нами были выявлены группы бруцелла-специфичных фрагментов в диапазоне масс 2000 — 20000 Da (m/z , ± 5 Da): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068 [1].

Для изучения возможности и эффективности применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для прямой детекции возбудителя бруцеллеза в биологических образцах необходимо экспериментальное моделирование инфекции на биомоделях.

Цель работы — изучить возможность прямого выявления возбудителя бруцеллеза в биоматериале с использованием MALDI-TOF MS в условиях эксперимента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве биологических моделей использовали лабораторных мышей ($n=20$), зараженных возбудителями бруцеллеза (штаммы *Brucella melitensis* 548, *Brucella abortus* 544, *Brucella suis* 1330).

В ходе эксперимента были сформированы четыре группы животных: группу № 1 заражали штаммом *B. melitensis* 548, № 2 — *B. abortus* 544, № 3 — *B. suis* 1330, № 4 — группа сравнения (животные, кровь которых была использована в анализе в качестве отрицательного контроля). Для моделирования инфекции мышам вводили подкожно в паховую область 0,5 мл суспензии соответствующего штамма бруцелл в концентрации 1×10^5 м.к./мл в растворе 0,9% хлорида натрия, pH 7,2. Наблюдение за животными проводили в течение 21 сут после заражения.

Через 21 сут после заражения биопробных животных умерщвляли путем хлороформирования. У хлороформированных биомоделей производили взятие крови из сердца в объеме 1,0–1,5 мл. От зараженных животных производили посев паренхиматозных органов и лимфоузлов на агар Альбими, скошенный в пробирках. Посевы культивировали в термостате при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 14 сут. От всех зараженных животных бактериологическим методом была выделена культура бруцелл. Биологическая безопасность работ с культурами возбудителя бруцеллеза была обеспечена в полном объеме в соответствии с требованиями СП 1.3.31.18-13 и МУК 3.1.7.3402—16.

Культуры возбудителя бруцеллеза были выращены на агаре Альбими (pH 7,2 — 7,4, прочность 300 — 380 г по Валенту, содержание аминного азота 100 — 120 мг).

Для проведения исследования использовали: вода ультрачистая, тип I по ASTM (система Millipore, США), спирт этиловый 96 % (ГОСТ Р 51723-2001), кислота муравьиная ~ 98% (Sigma-Aldrich, США), ацетонитрил, степень чистоты для ВЭЖХ-МС (Sigma-Aldrich, США), α -циано-4-гидроксикоричная кислота, степень чистоты для масс-спектрометрии (Sigma-Aldrich, США), трифторуксусная кислота > 99% (Sigma-Aldrich, США), бактериальный тест-стандарт МВТ для внутренней калибровки масс-спектрометра (Bruker Daltonics, Германия).

Принимая во внимание внутриклеточную локализацию возбудителя бруцеллеза, в качестве образца для белкового профилирования брали экстракт лейкоцитарной фракции крови, для чего осадок, содержащий форменные элементы крови, разбавляли многократно дистиллированной водой с последующей инкубацией (10 мин) и центрифугированием до полного удаления эритроцитов. Освобождение от эритроцитов проводили до полного обесцвечивания, получаемого в ходе промывки супернатанта. Суспензию отмытых лейкоцитов переносили в чистые микроцентрифужные пробирки и центрифугировали с удалением супернатанта при 15500 об/мин 10 мин.

Обеззараживание образцов лейкоцитарной фракции осуществляли путем добавления к пробе 70% этилового спирта с последующей инкубацией при температуре 30°C в течение 90 мин. После проведенной инактивации образцы суспензии центрифугировали и супернатант отбирали. Для полного удаления спирта процедуру центрифугирования повторяли.

После обеззараживания часть осадка высевали на скошенный Бруцеллагар, посевы инкубировали в течение 7 дней при 37°C . Во время проведения контроля на специфическую стерильность образцы белковых экстрактов хранились при температуре минус 18 — 20°C . При отсутствии специфического роста в пробирках с Бруцеллагаром исследуемый материал считали обеззараженным.

Белковую экстракцию лейкоцитарной фракции производили смесью 70 % муравьиной кислоты и ацетонитрила. Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) в диапазоне масс 2000—20000 Da.

Подготовленные вышеописанным способом пробы в объеме 1 мкл наносили на ячейки стального планшета для MALDI-TOF MS, в течение нескольких минут сушили на открытом воздухе, затем сверху наслаивали раствор матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота в растворе, содержащем 500 мкл ацетонитрила, 475 мкл воды I типа и 25 мкл трифторуксусной кислоты). Плашку высушивали на воздухе в течение 5 минут до образования кристаллов.

Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex при следующих параметрах: частота лазера 60 Гц, интенсивность лазера 10–50%, время задержки экстракции 110 нс PIE, напряжение первого источника ионов 19,4 kV, второго — 17,3 kV, напряжение фокусирующей линзы 8 kV, напряжение линейного детектора 2,500 kV, диапазон масс m/Z 2000–20000 Da. Внутреннюю калибровку диапазона m/Z проводили с использованием точных значений масс бактериального тест-стандарта MBT (Bruker Daltonics, Германия) в автоматическом режиме.

Для управления масс-спектрометром, включая установку режимов работы и регистрации масс-спектров, использовали программный пакет Daltonics flexControl v.3.3.64 (Bruker Daltonics, Германия), для предварительной оценки интенсивности и разрешения пиков в спектре — flexAnalysis v 3.3.65. Формирование промежуточных таблиц проводили с использованием программных ресурсов пакета Microsoft Office 2010. Статистический анализ и визуализацию полученных данных осуществляли с помощью интегрированных пакетов «MALDIquant», «MALDIquantForeign», «sda» (<https://cran.r-project.org/web/packages/rgl/index.html>), (<http://strimmerlab.org/software/maldiquant/>) языка программирования R (<https://cran.r-project.org/>) и Mass-Up (<http://sing.ei.uvigo.es>).

Полученные в ходе работы масс-спектры для каждого анализируемого образца использовали для построения дендрограммы средствами программного пакета «MALDIquant», реализованного в среде R, представляющего альтернативу для интерпретации данных MALDI-TOF MS. Представление полученных масс-спектров в виде иерархической структуры позволило определить положение каждого отдельного спектра на основании величины сходства характеристик его пиков от средних значений характеристик в группе спектров. Результативность кластерного анализа достигается использованием метрики дистанций $d(x, y)$, при этом расстояние между объектами одной группы в целом будет меньше « e », а между объектами из разных групп больше « e », где « e » > 0 — задаваемый уровень сходства.

Построение собственного дерева для каждой повторной выборки с вычислением частоты встречаемости всех фрагментов в сформированной последовательности производили с использованием бутстреп-вероятности BP. Гипотезу о существовании кластера считали достоверной, если с ветвями бутстрепного дерева связывалась вероятность, превышающая 70%. Построение дендрограммы проводили в евклидовом пространстве на основании данных матрицы признаков «featureMatrix».

В качестве метода для создания классификаций масс-спектров использовали анализ главных компонент (principal component analysis, PCA), основное преимущество которого заключается в том, что из совокупности характеристик объекта наблюдения (в данном случае — масс-спектр образца) выбирают наиболее переменные величины (с точки зрения исследователя), значения которых откладывают по осям трехмерной системы координат (главные компоненты) и на пересечении перпендикуляров из этих осей ставят точку. Используемое программное обеспечение позволило представить PCA-кластер в трехмерном пространстве.

В качестве маркеров использовали сигналы, p -значение которых было меньше 0,05 (<https://www.sing-group.org/mass-up/manual>). Частоту встречаемости каждого потенциального маркера рассчитывали с использованием пакета прикладных программ Statistica v 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценку особенностей белковых профилей экстрактов крови мышей, зараженных бруцеллами, проводили при сравнении с масс-спектрами отрицательного контроля (кровь мышей из контрольной группы). Каждый образец анализировали в четырех повторах.

По результатам качественного и количественного анализа данных наименьшее количество пиков (40 ± 2) содержали масс-спектры экстрактов крови животных, зараженных *B. suis* 1330. Наиболее представительные спектры (79 ± 3 и 69 ± 3) были получены для образцов крови мышей, которым вводили *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548, соответственно.

На масс-спектрах белковых экстрактов крови мышей из групп сравнения основное число сигналов было локализовано в двух областях значений масс рабочей области: 2,6—8,5 и 13,5—16,0 kDa. В результате сравнительного анализа белковых профилей образцов отрицательного контроля были установлены общие фрагменты, значения абсолютной интенсивности которых варьировало в диапазоне от 250 до $2,0 \times 10^4$ a.i. ($m/z \pm 5$ Da): 2683, 2739, 2925, 3140, 3327, 4195, 4286, 5005, 5660, 6908, 7228, 7506, 11682, 14992, 15001. Разрешение для перечисленных сигналов находилось в диапазоне от 205 до 436, отношение сигнал/шум — от 6/1 до 19/1, ширина пика на полувысоте — от 11 до 52, частота регистрации составляла $\geq 0,99$. Указанные значения параметров полученных масс-спектров являются приемлемыми для дифференциации аналитически значимых фрагментов из всего массива сигналов. При этом, области m/Z , содержащие сигналы с высоким значением абсолютной интенсивности, перекрывались с областями значений масс, в которых регистрировались специфичные для представителей рода *Brucella* пики, что затрудняло выявление бруцелла-специфичных сигналов на масс-спектрах экстрактов крови мышей, зараженных возбудителем бруцеллеза.

Основное количество зарегистрированных пиков на масс-спектрах белковых экстрактов лейкоцитарной фракции крови мышей, зараженных возбудителем бруцеллеза, было расположено в интервале значений масс 2,0 — 8,3 и 14,5–1,6 kDa рабочей области. Анализ MALDI-TOF масс-спектров белковых экстрактов лейкоцитов крови инфицированных животных всех групп позволил выявить общие пики ($m/z \pm 5$ Da): 2250, 2581, 3025, 3640, 3696, 3754, 4545, 6672, 7905, 8351, 14504 (курсивом отмечены родоспецифичные маркеры возбудителя бруцеллеза). Интенсивность указанных фрагментов находилась в диапазоне от 300 до 6000 a.i., разрешение — от 269 до 534, отношение сигнал/шум — от 8/1 до 24/1, ширина пика на полувысоте — от 6 до 59. Указанные параметры общих сигналов позволяют достоверно их дифференцировать от совокупности всех пиков. Частота регистрации шести родоспецифичных сигналов бруцелл, отличающихся по абсолютной интенсивности, составляла 0,98.

В ходе сравнительного анализа белковых профилей экстрактов лейкоцитов крови мышей, инфицированных культурой *B. abortus* 544, были установлены специфичные для этой группы сигналы ($m/z \pm 5$ Da): 2322, 2334, 4941, 6257, 10781, 10798, 11000, 12117, 13609. На масс-спектрах белковых экстрактов лейкоцитов крови животных, зараженных *B. melitensis* 548, было выявлено 2 общих сигнала ($m/z \pm 5$ Da): 2264, 8378. Наибольшее количество уникальных фрагментов отмечено на белковых профилях экстрактов крови мышей 3 группы (*B. suis* 1330) ($m/z \pm 5$ Da): 2133, 2422, 2455, 2545, 2754, 3050, 3107, 3268, 3842, 3885, 3902, 3927, 3970, 4067, 4796, 4856, 4871, 4896, 5114, 5219, 5235, 5250, 6621, 6640, 7106, 7155, 7172, 7336, 7360, 7386, 7550, 7777, 7854, 7992, 8917, 10289, 10332, 12699, 14256, 14346, 14362, 14468, 14698, 14864, 15858, 15904. Очевидно, что заражение модельных животных возбудителем бруцеллеза сопровождается появлением специфичных сигналов на соответствующих белковых профилях экстрактов крови.

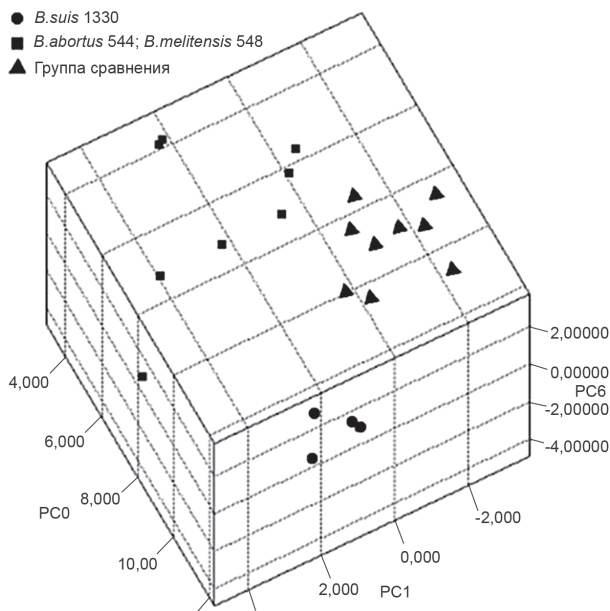


Рис. 1. Диаграмма распределения масс-спектров экстрактов лейкоцитов крови мышей, зараженных культурами *B. abortus* 544, *B. melitensis* 548 и *B. suis* 1330, а также из группы сравнения на основании результатов анализа MS профилей методом PCA

Формирование отдельного кластера образцами лейкоцитарной фракции крови животных, зараженных *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548, на дендрограмме (рис. 2) в полной мере согласуется с общеизвестными данными о генетической близости представителей указанных двух видов бруцелл и с результатами на основании анализа сходства белковых профилей их культур. Образцы отрицательного контроля

Визуализация данных, построенная методом PCA с использованием ресурсов статистического программного обеспечения Mass-Up (рис. 1) отражает распределение проб крови искусственно инфицированных животных компактно и дискретно от крови мышей из группы сравнения в виде совокупности точек в пространстве (PCA-кластер).

На диаграмме можно отметить четкое разделение белковых профилей экстрактов крови мышей при остром бруцеллезе на две группы: первую образуют животные, зараженные культурами *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548, во вторую вошли животные, инфицированные *B. suis* 1330. Распределение образцов на основании MS данных полностью совпадает с видовой принадлежностью используемых при заражении штаммов бруцелл.

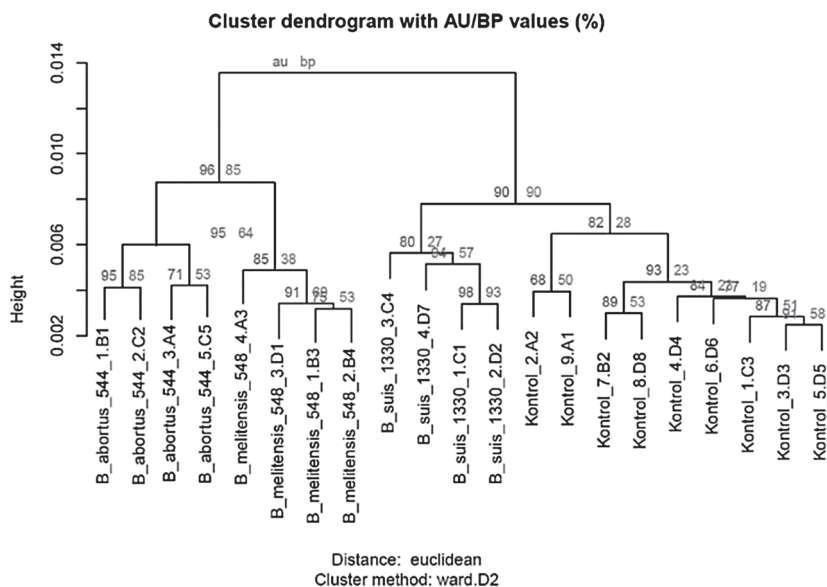


Рис. 2. Дендрограмма масс-спектров проб крови мышей из групп сравнения

формировали отдельную группу. Пробы крови животных, зараженных культурами *B. suis* 1330, также формировали компактную группу, по сравнению с образцами крови мышей, зараженных культурами *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 548. Возможно, подобное расположение является следствием того, что белковые профили проб лейкоцитов крови животных, зараженных культурами *B. suis* 1330, характеризовались наименьшей представительностью (количество и интенсивность сигналов) по сравнению с образцами от животных, зараженных *B. abortus* 544, *B. melitensis* 548.

Таким образом, в ходе работы была подтверждена возможность прямого выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в биоматериале методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце на стадии подроста гемокультур на питательных средах. В результате сравнительного анализа белковых профилей экстрактов лейкоцитов крови животных при остром бруцеллезе описано 6 общих родоспецифичных сигналов *Brucella* spp. ($m/z \pm 5$ Da): 2581, 3025, 3696, 3754, 4545, 6672, позволяющих достоверно определить образцы инфицированных бруцеллезом животных.

Результаты MALDI-TOF MS исследования культур возбудителя бруцеллеза подтверждают сложность проведения межвидовой дифференциации близкородственных видов бруцелл на основе данных белкового профилирования. Вместе с тем, на основании полученных данных, распределение спектров проб лейкоцитарной фракции крови животных, инфицированных разными видами бруцелл, на построенной дендрограмме полностью согласуется с видовой принадлежностью исследуемых штаммов. Присутствие различий на белковых профилях экстрактов лейкоцитов крови мышей, инфицированных культурами возбудителя бруцеллеза, очевидно, обусловлено не только индивидуальными особенностями используемых культур бруцелл разных видов, но и их адаптивными изменениями в организме животных в условиях персистенции возбудителя. Следовательно, при нахождении в организме хозяина возбудитель инфекции подвергается воздействию иммунной системы, что, вероятно, обуславливает синтез патогеном определенных белков, экспрессия которых вне организма хозяина отсутствует.

Описанные родо- и видоспецифичные для бруцелл особенности масс-спектров экстрактов лейкоцитов крови при остром бруцеллезе могут быть использованы при разработке эффективного методического подхода для индикации и идентификации возбудителя бруцеллеза в клиническом материале и биоматериале от сельскохозяйственных животных с использованием MALDI-TOF MS.

Таким образом, результаты экспериментального исследования позволяют говорить о высокой диагностической информативности метода MALDI-TOF MS для прямого выявления белковых маркеров бруцелл в биоматериале и последующего определения их видовой принадлежности, что требует дальнейших исследований. Впервые охарактеризованы ассоциированные с бруцеллезной инфекцией 11 белковых маркеров, в том числе 6 родоспецифичные для микроорганизмов рода *Brucella* spp., которые могут быть использованы при разработке эффективного методического подхода для диагностики бруцеллеза методом MALDI-TOF MS.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В., Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Сирица Ю.В., Куличенко А.Н. Разработка алгоритма идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 4: 96-99.
2. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В., Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Ковалева Н.И., Куличенко А.Н. Применение времяпролетной масс-спектрометрии для диагностики бруцеллеза и межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* spp. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018, 7 (4): 15-24.
3. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Чайка И.А., Чайка С.О., Водопьянов А.С. Масс-спектрометрический анализ природных и антиген-измененных штаммов туляремиального микроба. Проблемы особо опасных инфекций. 2017, 4: 92-96.

4. Cheng D., Qiao L., Horvatovich P. Toward Spectral Library-Free Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Bacterial Identification. *Journal of proteome research*. 2018, 17 (6): 2124-2130.
5. Hsieh S.Y., Tseng C.L., Lee Y.S. et al. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell Proteomics*. 2008, 7: 448-456.
6. Köck R., Wüllenweber J., Horn D. et al. Implementation of short incubation MALDI-TOF MS identification from positive blood cultures in routine diagnostics and effects on empiric antimicrobial therapy. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2017, 6 (1): 12-18.
7. Seng P., Abat C., Rolain J.M. et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2013, 51: 2182-2194.
8. van Belkum A., Welker M., Pincus D. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: what are the current issues? *Annals of laboratory medicine*. 2017, 37 (6): 475-483.

Поступила 26.02.19

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.А.Котенева, Е.С.Котенев, А.В.Калинин, Н.С.Царева, Л.А.Кот, Н.В.Жаринова, А.А.Зайцев, Г.А.Печковский

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА И ЗАКАВКАЗЬЯ

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Создание базы данных масс-спектров штаммов *Yersinia pestis*, позволяющей дифференцировать штаммы основного и кавказского подвидов возбудителя чумы методом MALDI-TOF MS. *Материалы и методы.* Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии было исследовано 50 штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на территории 7 природных очагов чумы Кавказа и Закавказья в период 1950-2012 г. Снятие масс-спектров экстрактов клеток *Y. pestis* проводили с использованием масс-спектрометра Microflex LT «Bruker Daltonics». Результаты обрабатывали и анализировали в программах «FlexAnalysis» и MALDI Biotyper v. 3.0. *Результаты.* Показано, что масс-спектры имеют характерные особенности, позволяющие дифференцировать штаммы основного (*pestis*) и неосновного подвидов. Выявлены пики, характерные для каждого подвида, наличие у *Y. pestis* подвида *saucasica* пиков, характерных для предковой формы — *Y. pseudotuberculosis* указывает на древнее происхождение этой группы, что согласуется в данными молекулярно-генетического и WGS анализа, приведенными в публикациях отечественных и зарубежных авторов. *Заключение.* Показана возможность применения метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для быстрой дифференциации штаммов чумы основного и неосновного подвида, имеющих разное значение в развитии и поддержании эпизоотического процесса в природных очагах чумы, а также разную вирулентность для человека. Идентификация штамма до уровня подвида требует проведения культуральных и биохимических тестов, которые могут занять несколько суток. Предлагаемый метод позволяет провести дифференциацию и получить результат уже через полчаса после получения чистой культуры.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 18—25

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, MALDI-TOF масс-спектрометрия, внутривидовое типирование штаммов, природные очаги чумы, идентификация штаммов, специфические пики

PROTEOMIC PROFILING OF *YERSINIA PESTIS* STRAINS CIRCULATING IN THE AREA OF NATURAL PLAGUE FOCI OF NORTH CAUCASUS AND TRANSCAUCASIA

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. To create a database of mass spectra of *Yersinia pestis* strains, which will differentiate the strains of the main and Caucasian subspecies of the plague agent by MALDI-TOF MS. *Materials and methods.* MALDI-TOF mass spectrometry was used to study 50 strains of *Y. pestis*, isolated on the territory of 7 natural plague foci of the Caucasus and Transcaucasia in the period 1950–2012. The removal of mass spectra of extracts of cells of *Y. pestis* was performed using the mass spectrometer Microflex LT «Bruker Daltonics». The results were processed and analyzed in FlexAnalysis programs, and MALDI Biotyper V. 3.0. *Results.* This study showed that mass spectra have characteristic features that allow differentiating strains of the main (*Y. pestis pestis*) and subspecies (*Y. pestis caucasica*). Peaks characteristic of each subspecies were detected. The presence in *Y. pestis caucasica* subspecies peaks characteristic of the ancestral form — *Y. pseudotuberculosis* indicates the ancient origin of this group, which is consistent with the data of molecular genetic and WGS analysis given in other publications. *Conclusion.* This work shows the possibility of applying the MALDI-TOF method of mass spectrometry for rapid differentiation of strains of the main subspecies *Y. pestis pestis* from the subspecies *Y. pestis caucasica*, which have different significance in the development and maintenance of the epizootic process in natural plague foci as well as different virulence for humans. Identification of the strain to the subspecies level requires carrying out culture and biochemical tests, which can take several days. The proposed method makes it possible to differentiate and obtain a result within half an hour after receiving a pure culture.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 18–25

Key words: *Yersinia pestis*, MALDI-TOF MS, intraspecific typing of strains, natural foci of plague, identification of strains, specific peaks

ВВЕДЕНИЕ

Чума — зоонозная природно-очаговая бактериальная инфекция. На территории Российской Федерации находятся 11 природных очагов чумы. Общая площадь энзоотичной по чуме территории составляет 222,4 тыс. км². Эпизоотии чумы в период с 2000 по 2015 годы зарегистрированы в 8 из 11 природных очагов, в которых выделено 1709 штаммов микроба чумы. С 2014 г. в России ежегодно отмечаются случаи заболевания человека чумой [2]. Устойчивая тенденция активизации ряда природных очагов чумы указывает на необходимость усиления роли эпизоотологического мониторинга для предотвращения случаев заболевания.

На территории Северного Кавказа и Закавказья циркулируют различные варианты *Yersinia pestis*. В Центрально-Кавказском высокогорном (01), Терско-Сунженском низкогорном (02), Дагестанском равнинно-предгорном (03), Прикаспийском Северо-Западном степном (14) и Прикаспийском песчаном (43) циркулируют штаммы *Yersinia pestis subsp. pestis*, а в Восточно-Кавказском высокогорном (39), Закавказском высокогорном (04-06), Терско-Сунженском низкогорном (02) — штаммы *Y. pestis subsp. caucasica*.

Дифференциация и типирование штаммов микроба чумы, выделенных на территории очагов, имеет большое значение для оценки степени напряженности эпизоотического процесса, выявления путей распространения возбудителя [13].

В последнее десятилетие в видовой идентификации микроорганизмов активно используется технология «мягкого» способа ионизации молекул исследуемого вещества, реализуемая в методе MALDI-TOF масс-спектрометрии. Данный метод позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробных клеток (т.е. прямое белковое профилирование) и получать уникальные

для каждого вида масс-спектры [5, 12, 14]. Для идентификации микроорганизмов необходимо наличие эталонных спектров данного вида, представляющих собой суперспектры (усредненные серии единичных спектров), сравнение с которыми позволяет добиться большой точности и воспроизводимости анализа. Коммерческие базы данных для идентификации микроорганизмов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии не содержат референс-спектров возбудителей особо опасных инфекций, в том числе референтных масс-спектров штаммов *Y. pestis*, что значительно ограничивает возможности использования данного метода. Поэтому очевидна необходимость создания базы масс-спектров штаммов *Y. pestis*, циркулирующих на территории природных очагов Северного Кавказа и Закавказья, где находится значительная часть (5 из 11) природных очагов чумы в Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 50 штаммов *Y. pestis*, изолированных в период с 1950 по 2012 годы на территории 7 природных очагов Северного Кавказа и Закавказья (табл.). Все штаммы предварительно идентифицированы до подвида [3]. Штаммы *Y. pestis* выращивали на LB агаре (по Ленноксу) при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Обеззараживание штаммов *Y. pestis* и экстракцию кислоторастворимых белков проводили по ранее предложенному методу [9]. Дополнительно лизат фильтровали через PVDF фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Далее в фильтрат добавляли равный объем 50% ацетонитрила, после чего использовали для MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа. Для контроля специфической стерильности белковых экстрактов штаммов *Y. pestis* их нейтрализовали [7] и делали контрольные высевы каждого образца на 5 чашек с LB агаром, которые инкубировали в течение 5 суток при 28°C с ежедневным просмотром посевов. Во время проверки на специфическую стерильность образцы белковых экстрактов хранили при (-80°C) .

В работе были использованы питательные среды: LB Broth (Amresco LLC), Tryptic soy broth (Liofilchem, Italy), Microbiology agar (Sigma, USA); реактивы: L-histidine (Amresco LLC), TWEEN-80, pure (AppliChem, Germany), TFA (trifluoroacetic acid spectroscopy grade, ultrapure) (AppliChem, Germany), Acetonitrile (HPLC-gradient grade), Bacterial Test Standart (Bruker Daltonics, Germany), α -цианогидроксикоричная кислота (CHCA) (Bruker Daltonics, Germany).

Снятие масс-спектров экстрактов клеток *Y. pestis* проводили с использованием масс-спектрометра Microflex LT «Bruker Daltonics». Образцы в объеме 1 мкл наносили на поверхность 96-луночного MSP планшета и после полного высыхания на каждый

Штаммы *Yersinia pestis*, использованные в работе

Природный очаг	Подвид <i>Y. pestis</i>	Штаммы	Период выделения
Центрально-Кавказский высокогорный (01)	<i>Y. pestis pestis</i>	C-284, C-303, C-318, C-340, C-341, C-506, C-719, C-771, C-778, C-822	1971-2007
Дагестанский равнинно-предгорный (03)	<i>Y. pestis pestis</i>	C-13, C-14, C-16, C-327, C-328, C-551, C-742, C-754, C-791, C-792	1951-2003
Прикаспийский песчаный (43)	<i>Y. pestis pestis</i>	C-144, C-484, C-528, C-653, C-692, C-702, C-705, C-718, C-752, C-789	1966-2003
Восточно-Кавказский высокогорный (39)	<i>Y. pestis caucasica</i>	C-371, C-373, C-496, C-498, C-542, C-672, C-673, C-740, C-826, C-830	1978-2012
Терско-Сунженский низкогорный (02)	<i>Y. pestis pestis</i> <i>Y. pestis caucasica</i>	C-11, C-12, C-281, C-376	1950-1978
Закавказский равнинно-предгорный (08-13)	<i>Y. pestis pestis</i>	C-224, C-231, C-527	1968-1984
Закавказский высокогорный (04-06)	<i>Y. pestis caucasica</i>	C-232, C-273, C-343	1968-1976

образец наслаивали равный объем матрицы — насыщенной α -гидроксикоричной кислоты (СНСА). Насыщенный раствор СНСА готовили в объеме 1 мл: смешивали 475 мкл ультрачистой деионизованной воды, 25 мкл 100% ТФА и 500 мкл ацетонитрила и в раствор вносили 0,05 г α -циано-4-гидроксикоричной кислоты. Измерение проводили в линейном режиме с ускоряющей мощностью 20 кV (источник ионов 1) и 18,7 кV (источник ионов 2). Способ ионизации — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с линейным режимом положительных ионов. Напряжение на фокусирующей линзе 9 кV. Время задержки анализатора 150 нсек., частота лазера — 60 Гц. Масс-спектры получали в диапазоне 2000-20000 Да, но основная масса пиков регистрировалась в диапазоне 2500-10000 Да. В качестве калибранта использовали Bacterial Test Standart (Bruker Daltonics). Каждый образец наносили в 8 повторах. Бактериальный стандарт наносили в 5 повторах на одну мишень.

Нами были подобраны параметры получения референсных масс-спектров штаммов *Y. pestis*: количество суммарных спектров — 40, количество спектров для создания библиотеки MSP — 20, мощность лазера — 30-40 %. Спектры каждого штамма обрабатывали и анализировали в программе «FlexAnalysis». Полученные масс-спектры накапливали и собирали в индивидуальный суперспектр данного штамма. Создание суперспектра проводили из 20 единичных масс-спектров в программе MALDI Biotyper v. 3.0. по стандартному алгоритму.

Штаммы *Y. pestis* выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) в течение 24 ч при 28° С. Пробы ДНК штаммов микроба чумы готовили следующим образом: к исследуемому образцу добавляли мертиолат натрия до конечной концентрации 0,01 % и прогревали в микротермостате 30 мин. при 56° С. Далее 100 мкл образца переносили в 1,5 мл пробирки содержащие 300 мкл 6М гуанидинизотиоционата и прогревали 15 мин. при 65° С. Выделение ДНК проводили набором «РИБО-преп» («Интерлабсервис»).

Для проверки кластеризации спектров штаммов *Y. pestis*, относящихся к разным подвидам на MSP-дендограмме, параллельно было проведено генотипирование исследованных штаммов по системе, включающей 25 переменных хромосомных локусов [10, 11]. В состав реакционной смеси входили следующие компоненты: 200 μ м каждого dNTP, 1 U Tag ДНК полимеразы (Интерлабсервис), по 7,5 пмоль каждого праймера, 2,5 mM MgCl₂, 5 мкл Ч5 ПЦР-буфера (Интерлабсервис). Общий объем реакционной смеси составлял 15 мкл, объем вносимой ДНК-матрицы — 10 мкл. Амплификацию проводили по программам, описанным в [10, 11] в термоциклере CFX Duo Fast 48/48 (Bio-Rad). Определение размера фрагментов продуктов амплификации проводили с использованием автоматического анализатора Experion (Bio-Rad) и набора реагентов DNA 1K analysis Kit (Bio-Rad). Определение плазмидного профиля штаммов *Y. pestis* проводили, как описано ранее [15].

Для представления эволюционных отношений между исследованными штаммами *Y. pestis* использовали программу START2 (www.pubmlst.org). При построении дендограммы в программе START2 использован алгоритм UPGMA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создана база масс-спектров 50 штаммов *Y. pestis* подвигов *pestis* и *caucasica*, выделенных на территории природных очагов чумы Северного Кавказа и Закавказья, предназначенная для проведения идентификации культур возбудителя чумы на базе программного обеспечения MALDI Biotyper v3.0, которая позволяет достоверно идентифицировать культуры чумного микроба с SV \geq 2,3-2,4 и дифференцировать их от культур близкородственных видов (*Y. pseudotuberculosis*).

С целью анализа качества полученных масс-спектров и возможности сопоставления собственных данных с результатами других исследователей проанализированы пик-листы всех изученных штаммов *Y. pestis*. Для каждого штамма выбраны сигналы с уровнем сигнал/шум \geq 10%. В результате идентифицированы пики, характерные, по описанию [8],

для разных уровней таксономической идентификации: семейство Enterobacteriaceae, род *Yersinia*, группа *Y. pestis/pseudotuberculosis*, вида *Y. pestis*, что свидетельствует о валидности используемых образцов и достоверности полученных результатов. Отсутствие одного из специфических пиков в единичных спектрах не оказывает, на наш взгляд существенного влияния на результаты. Ни для одного из образцов не было выявлено отсутствие сигнала более чем по одному биомаркеру (пику). Большинство этих маркеров относятся к фрагментам рибосомальных (50S и 30S) и структурных белков [8].

Показано, что использование MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа для идентификации культур возбудителя чумы позволяет не только проводить видовую идентификацию, но и дифференцировать штаммы основного подвида — *Y. pestis pestis* и подвида *Y. pestis caucasica*. При анализе пик-листов и масс-спектров у большинства штаммов идентифицирован пик 3065 Да, который ранее был описан как видоспецифичный для штаммов *Y. pestis* [8]. Данный пик — это пептид размером 30 аа, который идентифицируется в базе данных UniprotKB как фрагмент белка активатора плазминогена, локализованного на плазмиде пестициногенности pPla (pPst). Высокая интенсивность специфического пика 3065 Да, обусловлена тем, что ген *pla*, кодирующий синтез белка-активатора плазминогена, является мульткопийным. Как показали наши исследования, данный дифференцирующий маркер характерен только для штаммов *Y. pestis* основного подвида, вне зависимости от биовара, имеющих плазмиду pPla (pPst). Штаммы неосновного подвида, *Y. pestis caucasica*, не имеют пика 3065 Да, как и плазмиды pPla (pPst), что подтверждается результатами молекулярно-генетических исследований.

Исследованные штаммы неосновного подвида, *Y. pestis caucasica* не имеющие плазмиды пестициногенности, при идентификации в программе MALDI Biotyper с использованием базы данных Biotyper и собственной базы масс-спектров чумного микроба, циркулирующих на территории Северного Кавказа, тем не менее, идентифицируются как штаммы *Y. pestis* и дифференцируются от штаммов *Y. pseudotuberculosis* с получением высоких значений коэффициента достоверности (Score). Проведенный анализ с использованием программного обеспечения Biotyper и FlexAnalysis показал, что основой такой дифференциации служат минорные пики, а также соотношение интенсивности родо- и группоспецифических пиков, представленных на спектре.

Интересным является отсутствие видоспецифического пика 3065 Да у трех штаммов основного подвида чумного микроба (*Y. pestis* C-231, C-702, C-822), что коррелирует с данными молекулярно-генетического анализа об отсутствии у этих штаммов плазмиды pPST1. Тем не менее, по своим биохимическим, генетическим и биологическим свойствам эти штаммы относятся к типичным представителям основного подвида, что также отчетливо видно из MSP и MLVA 25 -дендрограммы. Пик 3065 Да, указывающий на выработку штаммом белка-активатора плазминогена, обнаружен у 33 из 36 штаммов чумного микроба основного подвида и не идентифицирован ни у одного штамма кавказского подвида, что совпадает с результатами генетического скрининга на наличие плазмид и биохимическими свойствами изученных штаммов. У всех штаммов кавказского подвида мы обнаружили пик 6474 Да, который в работе [8] описан как видоспецифический для *Y. pseudotuberculosis*. На наш взгляд, это служит косвенным подтверждением того, что штаммы кавказского подвида, наряду со штаммами линии 0.PE7 из Китая являются наиболее древними штаммами *Y. pestis* [1, 6], которые наиболее близко стоят к исходной предковой форме — *Y. pseudotuberculosis*.

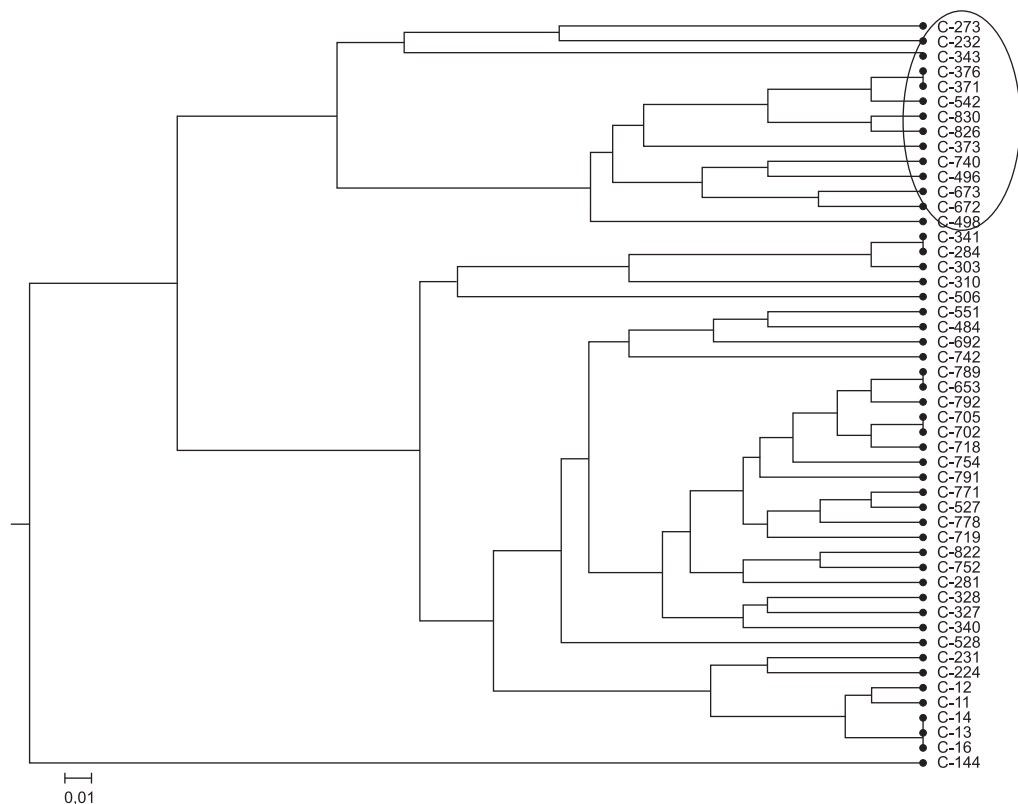
Как показывает анализ MSP-дендрограммы штаммов *Y. pestis*, в структуре дендрограммы четко выделяются 3 основные ветви. Первая ветвь (нижняя), более многочисленная и структурированная, представлена штаммами основного подвида *Y. pestis pestis* которая имеет прикорневое деление на 2 основные ветви и далее делится на ветви более мелкого порядка, что зависит, в основном, от интенсивности пиков (соотношения m/z). Кластеризация штаммов не зависит от принадлежности к определенному природному очагу, что объясняется отсутствием специфичес-

ких биохимических или фенотипических признаков, характерных для штаммов из конкретных очагов. Исключение составляют штаммы, выделяемые на территории Восточно-Кавказского высокогорного (39) и Закавказского высокогорного (04-06) природных очагов чумы. Эти штаммы относятся к неосновному подвиду *Y. pestis saucasica* и формируют на MSP-дендрограмме две верхние прикорневые ветви. Четкое деление штаммов на 4 основные группы на основе кластеризации их MSP дендрограмм дает основание предположить, что такое деление связано с наличием или отсутствием определенных биохимических признаков, однако на основании данных основных биохимических тестов (ферментация сахаров, денитрификация, уреазная, фибринолитическая и коагулазная активность, аутокотрофность по некоторым аминокислотам) такую связь выявить не удалось.

Деление на две основные ветви, соответствующее делению на основной и неосновной подвиды чумного микроба, происходит на основании наличия специфического белкового пика с молекулярной массой 3065 Да высокой степени интенсивности у штаммов *Y. pestis pestis*. Кроме того, масс-спектры основного и неосновного подвидов *Y. pestis* различаются по интенсивности ряда пиков в детектируемом диапазоне масс 2-20 кДа.

Достоверность дискриминации штаммов чумного микроба до уровня подвида подтверждена кластерным анализом с использованием метода главных компонент.

Для проверки качества полученных спектров и построенной на их основе MSP-дендограммы штаммов *Y. pestis* параллельно было проведено генотипирование исследованных штаммов по MLVA системе, включающей 25 переменных хромосомных локусов [1, 6]. Дендрограмма, представленная на рис., построена по результатам генетического типирования MLVA-25.



Филогенетические взаимоотношения штаммов *Y. pestis*, дендрограмма построена с использованием алгоритма UPGMA.

Как видно из представленной дендрограммы, в целом топология данного дерева повторяет топологию дерева, построенного на основе MS-спектров, сохраняя прикорневое деление на две основные ветви, соответствующие основному и неосновному подвидам чумного микроба.

Таким образом, используя UPGMA алгоритм определения филогенетического родства штаммов микроорганизмов, нам удалось подтвердить высокую дифференцирующую способность полученных MS-спектров и возможность их использования при создании базы данных масс-спектров штаммов *Y. pestis*, циркулирующих на территории Северного Кавказа и Закавказья.

База данных масс-спектров типичных и атипичных штаммов *Y. pestis*, выделенных из природных очагов чумы Северного Кавказа и Закавказья, зарегистрирована в Федеральной службе по интеллектуальной собственности (свидетельство о гос. регистрации базы данных № 2017620225)

На основании масс-спектрометрической характеристики исследуемой выборки проведена дифференциация штаммов *Y. pestis* подвида *pestis* от штаммов подвида *caucasica*. Согласно полученным данным, масс-спектры штаммов *Y. pestis* подвида *caucasica*, циркулирующие на территориях Восточно-Кавказского высокогорного и Закавказского высокогорного природных очагов, имеют высокую степень сходства между собой. Они отличаются от штаммов *Y. pestis* подвида *pestis*, циркулирующих на территориях Центрально-Кавказского высокогорного, Дагестанского равнинно-предгорного и Прикаспийского песчаного природных очагов чумы. Главным отличием, позволяющим даже визуальным образом на масс-спектре дифференцировать штаммы основного и кавказского подвидов, является наличие пика 3065 Да, который, являясь фрагментом белка-активатора плазминогена, указывает на наличие у штамма основных факторов вирулентности, характерных для подвида *Y. pestis pestis*. То, что у штаммов кавказского подвида имеется пик 6474 Да, ранее описанный как характерный для *Y. pseudotuberculosis*, на наш взгляд, косвенно подтверждает теорию о происхождении вида *Y. pestis* от возбудителя псевдотуберкулеза и более древнем происхождении штаммов кавказского подвида по сравнению с основным, что совпадает с результатами WGS-анализа, описанными ранее [1, 6].

Простота и скорость пробоподготовки и выполнения анализа, низкая стоимость расходных материалов позволяют рассматривать метод MALDI-TOF масс-спектрометрической идентификации как перспективный в лабораторной диагностике возбудителя чумы и его дифференциации на подвиды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Кутырев В.В. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования штаммов из России и сопредельных государств. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 4: 58-64.
2. Попов Н.В., Безмертный В.Е., Матросов А.Н., Князева Т.В., Кузнецов А.А., Федоров Ю.М., Попов В.П., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Косилко С.А., Чипанин Е.В., Дубянский В.М., Малецкая О.В., Григорьев М.П., Зенкевич Е.С., Топорков В.П., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 1: 13-19.
3. МУ 4.2.2940-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней». М., 2011.
4. СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». М., 2013.
5. Clark A., Kaleta E. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013, 3: 547-603.
6. Cui Y., Yu C., Yan Y. et al. Historical variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013, 110(2): 577-582.

7. Lasch P., Nattermann H., Elchard M. et al. MALDI-TOF mass-spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. *Analytical chemistry*. 2008, 80: 2026-2034.
8. Lasch P., Drevinek M., Nattermann H. et al. Characterization of Yersinia using MALDI-TOF mass-spectrometry and chemometrics. *Analytical chemistry*. 2010, 82: 206 -210.
9. Lasch P., Grunow R., Antonation K. et al. Inactivation techniques for MALDI-TOF MS analysis of highly pathogenic bacteria — A critical review. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016, 1: 13-15
10. Le Fléche P., Hauck Y., L. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of Yersinia pestis and Bacillus anthracis. *BMC Microbiology*. 2001, 1: 23-34.
11. Li I., Cui Y., Hauck Y. et al. Genotyping and Phylogenetic Analysis of Yersinia pestis by MLVA: Insights into the Worldwide Expansion of Central Asia Plague Foci. *PLoS ONE*. 2009, 4: 45-53.
12. Panda A. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *Journal of microbiological methods*. 2015, 109: 93-105.
13. Salman M.D., Steneroden K. Important Public Health Zoonoses through cattle. *Zoonoses-Infections affecting humans and animals*. Springer Netherlands. 2015, 1: 3-22.
14. Van Veen S.Q., Claas E.C.J., Kuijper E.J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 3: 900-907.
15. Woron A.M., Nazarian E.J., Egan C. et al. Development and evaluation of a 4-target multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and characterization of Yersinia pestis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2006, 56: 261—268.

Поступила 11.03.19

Контактная информация: Котенева Елена Анатольевна, к.б.н.,
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

С.В.Балахонов, В.И.Дубровина, В.В.Войткова, К.М.Корытов, Н.Л.Баранникова, В.Б.Николаев, Т.Т.Шкаруба

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛЕТОК КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ТЕРМОЭКСТРАКТАМИ BRUCELLA ABORTUS

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Изучить субпопуляционный состав клеток крови экспериментальных животных, привитых термоэкстрактами (ТЭ) *Brucella abortus* в L- или S-форме. *Материалы и методы.* 100 сертифицированных (НПО «Вектор», Новосибирск) беспородных мышей иммунизировали ТЭ *B. abortus* И-206 в L- или S-форме в дозе 20 мкг по белку. Животных выводили из эксперимента на 1, 3, 7, 14 и 21 сутки наблюдения и определяли фенотип (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD69) клеток крови. *Результаты.* Выявлены общие закономерности при введении исследуемых препаратов. Так, ТЭ *B. abortus* в L- и S-форме приводят к формированию иммунного ответа, который проявляется увеличением содержания гранулоцитов и экспрессии CD69 Т- и В-лимфоцитами крови на ранние сроки наблюдения (1-3 сутки), снижением общего содержания В-лимфоцитов на поздние сроки наблюдения (7-21 сутки). При этом, у мышей, получивших ТЭ *B. abortus* в L-форме, показатели экспрессии CD69 субпопуляций лимфоцитов крови были достоверно выше, чем у мышей, получивших ТЭ *B. abortus* в S-форме. Выявлены различия в формировании гуморального иммунного ответа, что, возможно, связано с изменением химического состава бруцелл в процессе L-трансформации. *Заключение.* В ходе исследования установлено, что термоэкстракты *B. abortus* в L- или S-форме приводят к иммунологической перестройке организма экспериментальных животных. На основании полученных данных существует необходимость дальнейшего детального исследования иммуногенных свойств ТЭ *B. abortus* в L- или S-форме.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 25—31

Ключевые слова: *Brucella abortus*, термоэкстракт, экспериментальные животные, кровь, проточная цитометрия

IMMUNOPHENOTYPING OF BLOOD CELLS OF EXPERIMENTAL ANIMALS IMMUNIZED WITH *BRUCELLA ABORTUS* THERMOEXTRACTS

Irkutsk Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. To study the subpopulational structure of blood cells of the experimental animals immunized with thermoextracts (TE) of *Brucella abortus* in L- and S-form. *Materials and methods.* Total 100 certified («Vector», Novosibirsk) outbred mice were immunized with *B. abortus* I-206 TE in L- and S-form in 20 µg protein dose. After 1, 3, 7, 14 and 21 days of observation the phenotypes (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD69) of blood cells were detected. *Results.* General regularities were revealed after injection of the experimental preparations. So, *B. abortus* TE in L- and S-form caused the immune response that increased granulocyte number and expression of early activation marker CD69 by T- and B-lymphocytes of blood in early period of observation (1-3 days), decrease in general B-lymphocyte content in late periods of observation (7-21 days). Thus, mice received *B. abortus* TE in L-form demonstrated authentically higher CD69 expression of blood lymphocyte subpopulations than mice received *B. abortus* TE in S-form. Distinctions in formation of humoral immune response were revealed that probably was connected with alteration of *Brucella* chemical composition in the course of L-transformation. *Conclusion.* The investigation established that *B. abortus* TE in L- or S-form caused immunological reorganization in the experimental animal organisms. On the basis of the findings it is necessary to further detailed testing of immunogenic properties of *B. abortus* TE in L- or S-form.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 25—31

Key words: *Brucella abortus*, thermoextract, experimental animal, blood, flow cytometry

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез — острое высокоинвазивное инфекционное заболевание с высокой потенциальной возможностью перехода в хроническую форму. Бруцеллез характеризуется длительностью протекания, трудно поддается лечению и поражает практически все органы и системы организма (опорно-двигательный аппарат, сердечно-сосудистая, нервная системы и др.), что нередко сопровождается инвалидизацией больного. Заболевают, как правило, люди трудоспособного возраста, профессиональная деятельность которых связана с уходом за животными, переработкой сырья и продуктов животного происхождения, а также в результате употребления инфицированного мяса, молока и молочных продуктов, не прошедших достаточную термическую обработку [2]. Кроме того, особой группой риска являются дети, среди которой ежегодно регистрируются случаи впервые диагностированного бруцеллеза [1]. Несмотря на то, что по данным Роспотребнадзора за 2018 год зарегистрировано снижение количества впервые выявленного бруцеллеза у людей на 12,7%, тем не менее, эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу рассматривается как неустойчивая в связи с ухудшением эпизоотологической ситуации по бруцеллезу крупного рогатого скота в регионах с развитым животноводством [9].

Важным мероприятием поддержания эпизоотологического благополучия населения РФ по бруцеллезу является вакцинопрофилактика сельскохозяйственных животных и людей. В настоящее время для вакцинации людей применяют живую лиофилизированную вакцину из штамма *Brucella abortus* 19-ВА. Известно, что данный препарат обеспечивает развитие иммунитета продолжительностью до года с максимальной напряженностью на 5-6 месяце [6]. Однако данная вакцина может вызывать тяжелые поствакцинальные осложнения [10]. В связи с этим, актуальным направлением исследований является оценка иммунологической эффективности различных антигенных препаратов.

Цель работы — изучение влияния термоэкстрактов *Brucella abortus* в L- и S-формах на клеточный состав крови мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 100 сертифицированных мышах массой 15-20 г (НПО «Вектор», Новосибирск), содержащихся в стандартных условиях.

В качестве объектов исследования использовали 2 препарата термоэкстрактов (ТЭ), полученных из штамма *B. abortus* И-206 в L- (группа 1) и S-формах (группа 2). Подопытным животным подкожно вводили препараты ТЭ в ранее установленной иммунизирующей дозе 20 мкг по белку в 0,2 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР) pH 7,2. Контролем служили мыши, получившие ЗФР в объеме 0,2 мл — группа 3. Животных выводили из эксперимента в соответствии с Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (GLP). Учет результатов проводили на 1, 3, 7, 14 и 21 сутки.

Фенотип клеток крови мышей определяли методом фенотипирования с использованием реагентов фирмы Becton Dickinson (США): CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD69 [3]. Окрашивание образцов проводили в пробирках для абсолютного подсчета клеток BD Trucount™ и анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto™ II (Becton Dickinson, США) в программе BD Diva версии 6.0. В каждой пробе анализировалось 10 000 событий CD45⁺-клеток, которые выделяли на графике SSC/CD45. Оценивали абсолютное содержание (10⁹ кл./л) лейкоцитов, в том числе гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов, а также их относительное содержание (%). В лимфоцитарном гейте определяли процентное содержание следующих субпопуляций: общее содержание Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺). Для оценки функционального состояния клеток крови оценивали уровень экспрессии CD69.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.1. Проверка нормальности количественных признаков была проведена с использованием Шапиро-Уилка. Поскольку все исследуемые показатели удовлетворяли гипотезе о нормальном распределении, анализ данных проводили с помощью ANOVA. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментов статистически значимых различий содержания лейкоцитов и их популяций в крови мышей опытных групп по сравнению с контролем выявлено не было. Абсолютное содержание лейкоцитов у экспериментальных животных, иммунизированных ТЭ *B. abortus*, находилось в пределах физиологической нормы (от 5,1 до 11,6·10⁹ кл./л). Средние показатели абсолютного содержания гранулоцитов в группе 1 и 2 колебались от 0,79 до 2,18х10⁹ кл./л, лимфоцитов — от 2,0 до 7,0х10⁹ кл./л, моноцитов — от 0,06 до 0,23х10⁹ кл./л. Относительный уровень основных популяций лейкоцитов у всех групп экспериментальных животных также находился в пределах физиологической нормы: моноциты 0,7 — 2,6%; гранулоциты 10 — 41%; лимфоциты 63 — 75% [5]. Тем не менее, у мышей опытных групп на 7 сутки наблюдения отмечено повышение относительного количества гранулоцитов ($P < 0,05$) в среднем в 1,3 раза по сравнению с контролем (24,9±7,4%). У животных 1 группы также имело место увеличение моноцитов (3,0±0,3%, $P = 0,003$) на 3 сутки по сравнению с интактными животными (2,2±0,6%). Следует отметить, что у мышей, получивших экспериментальные препараты, была зарегистрирована тенденция (0,05 > $P < 0,10$) к снижению содержания лимфоцитов на 7 сутки наблюдения.

В случае экспериментальных животных 1 группы (ТЭ В. abortus в L-форме) тенденция к снижению лимфоцитов отмечалась и на 3 сутки после введения препарата.

Наиболее чувствительным и информативным показателем протекающего воспалительного процесса является изменение процентного содержания Т-лимфоцитов, которым отводится ведущая роль при формировании иммунитета к бруцеллезу [13]. В ходе эксперимента у животных, иммунизированных ТЭ В. abortus в L- и S-форме, статистически значимых изменений относительно уровня CD3⁺-клеток, а также Т-хелперов не выявлено. Тем не менее, при детальном анализе динамики содержания Т-лимфоцитов наблюдалась тенденция к повышению этих клеток на 3 сутки после введения экспериментальных препаратов мышам в среднем в 1,1 раза (ТЭ В. abortus в L-форме — 62,9±4,7%; ТЭ В. abortus S-форме — 66,1±4,7%) по сравнению с контролем (56,8±7,7%). Аналогичное наблюдение отмечено в случае Т-хелперов. Статистически значимое повышение процентного количества цитотоксических Т-лимфоцитов (Т-киллеров) отмечалось только у мышей 2 группы на 14 сутки после введения (13,3±1,6%) по сравнению с контролем (10,7±2,3%). Кроме того, исследуемые препараты оказывали однонаправленный эффект на В-лимфоциты (CD3⁻CD19⁺), а именно, у мышей опытных групп на 7 и 14 сутки наблюдения регистрировалось снижение количества данной популяции клеток в среднем в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

При оценке функционального состояния клеток крови отмечалась тенденция к снижению моноцитов, экспрессирующих маркер пролиферации CD69, который проявляется на поверхности клеток уже через 2—3 часа после их стимуляции, у мышей опытных групп в зависимости от введенного препарата. Так, у мышей, получивших ТЭ В. abortus в L-форме, изменение процентного содержания этих клеток имело место на 1 (0,49±0,14%) и 3 (0,36±0,09%, P<0,01) сутки наблюдения, а у мышей, получивших ТЭ В. abortus в S-форме — на 7 (0,44±0,10%), в то время как в контрольной группе этот показатель составил 0,73±0,23 %. В случае CD69⁺-гранулоцитов регистрировалось уменьшение их относительного уровня у мышей 2 группы (0,31±0,10%, P<0,05) на 14 сутки наблюдения.

Результаты статистического анализа CD69-позитивных клеточных субпопуляций лимфоцитов представлены в табл. 2, из которой видно, что все исследуемые препараты оказывали влияние на экспрессию данного маркера Т- и В-клетками. Так, у экспериментальных животных всех групп наблюдалось увеличение содержа-

Таблица 1. Показатели содержания субпопуляций лимфоцитов крови у мышей, иммунизированных термозекстрактами В. abortus в L- и S-форме, Mean ± SE

Исследуемый показатель	Сроки наблюдения, сутки	Т-лимфоциты (CD3 ⁺), %	Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	В-лимфоцитов (CD3 ⁻ CD19 ⁺), %
ТЭ В. abortus в L-форме	1	58,7 ± 6,9	44,8 ± 3,6	11,8 ± 3,2	28,6 ± 6,8
	3	62,9 ± 4,7	50,8 ± 4,4	10,4 ± 2,1	27,4 ± 3,5
	7	60,7 ± 5,5	48,4 ± 4,2	9,3 ± 2,8	21,7 ± 5,3*
	14	61,4 ± 8,2	47,7 ± 8,4	12,4 ± 2,6	22,4 ± 5,3
	21	51,7 ± 8,5	39,7 ± 12,4	8,7 ± 3,0	32,5 ± 10,0
ТЭ В. abortus в S-форме	1	61,4 ± 6,8	47,4 ± 6,3	10,8 ± 3,4	27,6 ± 6,0
	3	66,1 ± 4,7	55,4 ± 5,0	11,0 ± 3,0	29,6 ± 4,2
	7	62,3 ± 4,1	47,7 ± 3,2	11,0 ± 2,2	22,9 ± 2,0*
	14	56,3 ± 11,7	41,7 ± 11,3	13,3 ± 1,6*	27,4 ± 9,2
	21	52,2 ± 6,5	39,8 ± 5,7	10,8 ± 2,0	30,6 ± 7,0
Контроль	—	56,8 ± 7,7	44,1 ± 6,2	10,7 ± 2,3	29,7 ± 7,8

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

Таблица 2. Экспрессия маркера пролиферации CD69 лимфоцитами крови у мышей, иммунизированных термоэкстрактами *V. abortus* в L- и S-форме, Mean \pm SE

Исследуемый показатель	Сроки наблюдения, сутки	T-лимфоциты (CD3 ⁺), %	T-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	Цитотоксические T-лимфоциты (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	B-лимфоцитов (CD3 ⁻ CD19 ⁺), %
ТЭ <i>V. abortus</i> в L-форме	1	2,01 \pm 0,29**	1,10 \pm 0,23**	0,37 \pm 0,03**	0,68 \pm 0,15**
	3	0,84 \pm 0,18**	0,81 \pm 0,18**	0,07 \pm 0,02	0,29 \pm 0,12
	7	0,25 \pm 0,05	0,32 \pm 0,16	0,07 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02
	14	0,41 \pm 0,11	0,31 \pm 0,07	0,13 \pm 0,05	0,26 \pm 0,06
	21	0,15 \pm 0,09	0,08 \pm 0,02	0,01 \pm 0,003	0,26 \pm 0,12
ТЭ <i>V. abortus</i> в S-форме	1	0,59 \pm 0,19*	0,46 \pm 0,14*	0,19 \pm 0,07**	0,31 \pm 0,10
	3	0,53 \pm 0,16	0,36 \pm 0,08	0,09 \pm 0,02	0,41 \pm 0,08*
	7	0,43 \pm 0,14	0,24 \pm 0,08	0,04 \pm 0,01	0,11 \pm 0,04*
	14	0,40 \pm 0,10	0,25 \pm 0,09	0,06 \pm 0,02	0,23 \pm 0,09
	21	0,19 \pm 0,04	0,14 \pm 0,03	0,02 \pm 0,01	0,16 \pm 0,07*
Контроль	—	0,34 \pm 0,06	0,24 \pm 0,13	0,04 \pm 0,01	0,21 \pm 0,09

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

ния CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD8⁺CD69⁺ и CD3⁺CD4⁺CD69⁺ клеток на 1 и 3 сутки после иммунизации. При этом у мышей 1 группы наблюдалось более выраженное повышение данных показателей (P<0,05). Также выявлены изменения экспрессии CD69 B-лимфоцитами. В случае введения мышам ТЭ *V. abortus* в L-форме увеличение CD3⁻CD19⁺ клеток отмечалось на 1 сутки, а ТЭ *V. abortus* в S-форме — 3 сутки наблюдения. Последующая динамика изменения B-лимфоцитов, экспрессирующих CD69⁺, у мышей 2 группы носила фазный характер — снижения этих клеток на 7 и 21 сутки наблюдения.

Бруцеллез является распространенным зоонозным заболеванием, вызываемым грамотрицательными бактериями *Brucella* spp. и представляющим серьезную проблему для здравоохранения. Основным фактором распространения инфекции является длительное выделение бруцелл при абортах и родах у больных животных, а также с молоком и мочой. В связи с неустойчивой эпизоотологической ситуацией по бруцеллезу крупного рогатого скота в регионах с развитым животноводством наиболее экономичным способом борьбы с бруцеллезом является вакцинация животных с целью минимизации потенциального риска инфицирования человека. В настоящее время для специфической профилактики бруцеллеза крупного рогатого скота на территории РФ могут применяться вакцины из штаммов *V. abortus* 19-ВА, *V. abortus* 17/100, *V. abortus* 82, *V. abortus* 75/79-А, а для вакцинопрофилактики населения РФ с целью поддержания эпидемиологического благополучия по бруцеллезу применяют живую лиофилизированную вакцину из штамма

V. abortus 19-ВА. Однако эти вакцины имеют множество недостатков, таких как поствакцинальные осложнения [10], потенциальная возможность вызывать аборт у беременных животных [4], остаточная контагиозность, влияние на диагностические тесты и другие. Кроме того, разработаны ДНК-вакцина, субъединичные, векторные и рекомбинантные вакцины [12], которые также имеют ряд недостатков, среди которых высокая стоимость, необходимость проведения многократной вакцинации, низкая иммуногенная активность. В связи с этим, разработка эффективной и безопасной вакцины для борьбы с бруцеллезом остается актуальной проблемой.

У людей данное заболевание приводит к развитию острого воспаления практически во все органах и часто сопровождается хронизацией инфекционного процесса. Известно, что для людей, больных бруцеллезом, характерно значительное изменение субпопуляционного состава клеток крови [8,11], что зависит от формы бру-

целлеза (хронический, резидуальный), от длительности заболевания и стажа работы [8]. Следует отметить, что одной из причин хронизации бруцеллезной инфекции является трансформация возбудителя бруцеллеза из S-формы в другие измененные варианты, наиболее значимым из которых является L-форма [4]. Бруцеллы в L-форме представляют собой бактерии полностью или частично утратившие клеточную оболочку, а также с существенными особенностями антигенной структуры. Нами было проведено иммунофенотипирование клеток крови мышей, иммунизированных термоэкстрактами *B. abortus* в L- и S-формах, с целью оценки их иммунологической эффективности.

В ходе исследования установлено, что введение экспериментальным животным ТЭ *B. abortus* в L- или S-форме приводило к увеличению процентного содержания гранулоцитов. В случае с ТЭ *B. abortus* в L-форме также отмечалось увеличением процентного содержания моноцитов в крови. Параллельно с этим отмечалось снижение числа моноцитов и гранулоцитов, экспрессирующих CD69, что, возможно, свидетельствует о миграции активированных клеток в очаг воспаления, мобилизации пристеночного пула клеток и формировании клеточного иммунного ответа. Повышение относительного содержания CD3⁺-, CD3⁺CD69⁺-, CD3⁺CD4⁺CD69⁺- и CD3⁺CD4⁺CD69⁺-клеток в крови экспериментальных животных также свидетельствует о формировании клеточного иммунитета. Увеличение цитотоксически Т-лимфоцитов на последние сроки после введения ТЭ *B. abortus* в S-форме может быть связано с увеличением регуляторных CD8⁺-клеток, обладающих иммуносупрессивными функциями, способных эффективно блокировать иммунный ответ и поддерживать иммунный гомеостаз организма [15].

При воспалительных процессах, вызываемых как внеклеточными, так и внутриклеточными патогенами, важную роль играют гуморальный и клеточный иммунитет. Адекватное соотношение между ними способствует эффективной элиминации патогена. Для оценки гуморального иммунитета диагностическое значение имеет относительное количество В-лимфоцитов. Интересным является факт, что на первые сутки после введения ТЭ *B. abortus* в L-форме экспериментальным животным имело место увеличение CD19⁺CD69⁺ популяции клеток, что указывает на наличие Т-независимых антигенов в составе термоэкстракта. Кроме того, оба препарата приводили к снижению содержания В-лимфоцитов на поздних сроках течения воспалительного процесса. В случае ТЭ *B. abortus* в S-форме также имело место увеличение CD19⁺CD69⁺-клеток на 3 сутки наблюдения с последующим их снижением что, возможно, связано с перераспределением В-лимфоцитов и формированием гуморального иммунного ответа. Ранее в результате гистологического исследования нами было продемонстрировано увеличение интенсивности процесса пролиферации антителообразующих клеток в лимфатических узлах и селезенке, которая была более выражена у мышей, иммунизированных ТЭ *B. abortus* в S-форме.

Таким образом, проведенные исследования показали, что термоэкстракты *B. abortus* в L- или S-форме приводят к иммунологической перестройке организма экспериментальных животных, что согласуется с ранее полученными нами данными [7, 14]. Выявлены общие закономерности при введении исследуемых препаратов. Так, ТЭ *B. abortus* в L- и S-форме приводят к формированию иммунного ответа, который проявляется увеличением содержания гранулоцитов и экспрессии раннего маркера активации CD69 Т- и В-лимфоцитами крови на ранних сроках наблюдения (1-3 сутки), снижением общего содержания В-лимфоцитов на поздних сроках наблюдения. При этом у мышей, получивших ТЭ *B. abortus* в L-форме, показатели экспрессии CD69 субпопуляций лимфоцитов крови были достоверно выше, чем у мышей, получивших ТЭ *B. abortus* в S-форме. Кроме того, выявлены различия

в формировании гуморального иммунного ответа, что, возможно, связано с изменением химического состава бруцелл в процессе L-трансформации. Полученные данные обосновывают необходимость дальнейшего изучения вопросов иммунного ответа на TЭ *B. abortus* в L- или S-форме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атаходжаева Д.Р. Клинико-иммунологическая характеристика острого бруцеллеза у детей. Запорожский медицинский журнал. 2013, 6 (81): 6-9.
2. Балахонова С.В., Дубровина В.И., Токарева Л.Е., Загоскина Т.Ю., Витязева С.А., Марков Е.Ю., Старовойтова Т.П., Баранникова Н.Л., Коновалова Ж.А., Войткова В.В., Ястремская К.Ю. Бруцеллез: вопросы патогенеза и иммуногенеза. Иркутск, ООО «Принт-2», 2017.
3. Войткова В.В., Дубровина В.И., Колесникова О.Б., Коновалова Ж.А., Лукьянова С.В., Бельков А.И. Методические рекомендации по выявлению фосфатидилсерина на лимфоцитах крои мышей с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto™ II. Иркутск, 2010.
4. Косилов И.А., Аракелян П.К., Димов С.К., Хлыстунов А.Г. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Под. ред. И.А. Косилова. Новосибирск, 1999. Линева А.П. Физиологические показатели нормы животных. Справочник. М., «Аквариум» ФГУИППВ, 2003.
5. Линева А.П. Физиологические показатели нормы животных. Справочник. М., «Аквариум» ФГУИППВ, 2003
6. Медуницын Н.В. Вакцинология. 3-е изд., переработанное и дополненное. М.: «Триада-Х», 2010.
7. Михайлов Л.М., Баранникова Н.Л., Токарева Л.Е., Витязева С.А., Старовойтова Т.П., Дубровина В.И., Балахонов С.В. Изучение иммуногенных свойств термоэкстрактов из бруцелл в S- и L-формах на морских свинках. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 4(89): 82-86.
8. Пономарева О.Г., Тархов А.Е., Ерениев С.И., Сафонов А.Д., Соколова Т.Ф., Иванова Е.А. Показатели клеточного иммунитета у больных профессионально обусловленным хроническим и резидуальным бруцеллезом. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010, 6: 25-30.
9. Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Об эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2016 г. и прогноз на 2017 г. Пробл. особо опасных инф. 2017, 2: 23-27. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-23-27.
10. Цирельсон Л.Е., Желудков М.М., Кулаков Ю.К. Обзор проблем вакцинопрофилактики бруцеллеза. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013, 3 (70): 77-81.
11. Ющук Н.Д., Ахмедова М.Д., Магомедова С.А. T- и B-клеточный иммунитет у больных бруцеллезом. Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. 2008, 3 (28): 90-92.
12. Dorneles E.M., Sriranganathan N., Lage A.P. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. Vet. Res. 2015, 46(1): 76. DOI: 10.1186/s13567-015-0199-7.
13. Dorneles E.M., Teixeira-Carvalho A., Aгаџо M.S. et al. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. Vaccine. 2015, 33 (31): 3659-66. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.05.057.
14. Dubrovina V.I., Balakhonov S.V., Yurieva O.V. et al. Effects of thermoextracts of *Brucella* S and L forms on lipid peroxidation and antioxidant defense in organs of laboratory animals. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2018, 165 (2): 239-242.
15. Yu Y., Ma X., Gong R. et al. Recent advances in CD8⁺ regulatory T cell research. Oncol Lett. 2018, 15 (6): 8187-8194. doi: 10.3892/ol.2018.8378.

Поступила 15.02.19

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

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ И ИХ ОЦЕНКА

¹Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, ²Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, Москва, ³Московский физико-технический институт (государственный университет)

Цель. Сравнительный анализ серологических методов выявления возбудителя туляремии и их оценка. *Материалы и методы.* Использованы экспериментальные диагностические наборы и тест-системы для постановки серологических методов: реакции непрямой гемагглютинации (РНГА); реакции иммунофлуоресценции (РИФ); иммуноферментного анализа (ИФА) традиционного с использованием микропланшет; ИФА после селективного концентрирования возбудителя туляремии на магноиммосорбенте (МИС); реакции микрогравиметрического анализа (МГА) на основе пьезобиосенсоров (ПБ) и поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Эксперименты проводили с гомологичными штаммами туляремийного микроба (тест-штаммами) и со штаммами гетерологичных микроорганизмов в модельных опытах на водопроводной воде, контаминированной различной концентрацией патогена. *Результаты.* Определены параметры каждого диагностического метода и дана оценка по показателям: чувствительности (при работе с чистыми культурами (тест-штаммами), загрязненными пробами больших объемов), специфичности, времени постановки и учета результатов, информативности, определения режимов постановки и учета. *Заключение.* Вышеперечисленные методы диагностики имеют свои достоинства и недостатки, поэтому при выборе того или иного метода исследователь должен руководствоваться своими целями. Так, для скрининговых исследований целесообразно проводить постановку ИФА, РИФ, РНГА; при выявлении возбудителя в больших объемах и загрязненных пробах эффективно применение селективного концентрирования на МИС с последующей постановкой ИФА; для выявления незначительных объемов проб и учета реакции в реальном времени возможно применение МГА и ППР.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 32—38

Ключевые слова: РНГА, РИФ, ИФА, МИС, ИГА, пьезобиосенсоры, ППР, *Francisella tularensis*, антитела

I.V.Zharnikova¹, V.I.Efremenko¹, T.V.Zharnikova¹, S.A.Kurcheva¹, S.M.Kalnoy¹, D.V.Efremenko¹,
A.A.Isakova², A.V.Indenbom^{2,3}

SEROLOGICAL METHODS FOR DETECTION OF THE CAUSATIVE AGENT OF TULAREMIA AND THEIR EVALUATION

¹Stavropol State Institute for Plague Control; ²Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Moscow; ³Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Russia

Aim. A comparative study of serological methods for the detection of the causative agent of tularemia and their evaluation. *Materials and methods.* We used experimental diagnostic kits and test systems for the production of serological methods: indirect hemagglutination reaction (RGA); the reaction immunofluorescence (RIF); enzyme immunoassay (ELISA) using traditional microplate; IFA after selective concentration of the pathogen of tularemia in magnoimmunisorbents (MIS); microgravimetric analysis (MGA) based on piezoresistors (SP) and surface plasmon resonance (SPR). The experiments were carried out with homologous strains of tularemia microbe (test strains) and with strains of heterologous microorganisms in model experiments on tap water contaminated with different concentrations of the pathogen. *Results.* The parameters of each diagnostic method are determined and evaluated according to the following indicators: sensitivity (when working with pure cultures (test strains), contaminated samples of large volumes), specificity, time of setting and taking into account the results, informativeness, determining the modes of setting and accounting. *Conclusion.* The above diagnostic methods have their advantages and disadvantages. Therefore, when choosing a method, the researcher should be guided by the goals pursued. So, for screening studies it is advisable to carry out the

formulation of ELISA, RIF, RGA, in identifying the pathogen in large volumes and contaminated samples, the effective use of selective concentration on MIS followed by the formulation of ELISA, to identify small amounts of samples and take into account the reaction in real time, it is possible to use MGA and SPR.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 32–38

Key words: RGA, RIF, ELISA, MIS, MGA, piezoresistor, SPR, *Francisella tularensis*, antibodies

ВВЕДЕНИЕ

Основные направления разработки диагностических препаратов предусматривают расширение возможностей индикации возбудителя за счёт появления высокочувствительных новых и усовершенствованных методов и препаратов, что способствует эффективному эпидемиологическому мониторингу инфекционных болезней. В настоящее время для индикации возбудителя туляремии применяют ряд диагностических серологических методов, в основе которых лежит высокоселективное взаимодействие «антиген-антитело»: реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция иммунофлуоресценции (РИФ), иммуноферментный анализ (ИФА) без/с применением магноиммуносорбентов (МИС), микрогравиметрический анализ (МГА), анализ поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Стремительное развитие биотехнологии в последние годы привело к появлению новых методов исследования, однако хорошо известная РНГА до сих пор остается актуальной в диагностике инфекций. Такой метод выявления взаимодействия антиген-антитело обладает высокой чувствительностью и простотой постановки [4, 7]. Широкое распространение получили методы, основанные на применении антител, меченных маркерами — флуорохромами, которые позволяют с помощью люминесцентного микроскопа проводить высокочувствительные определения исследуемой пробы в РИФ. Этот метод достаточно прост, экономичен, может использоваться в экспресс-диагностике инфекционных заболеваний, особенно в тех случаях, когда обычная бактериоскопия оказывается безрезультатной [8, 10]. Наиболее часто применяются методы с использованием антител, иммобилизованных с ферментами — ИФА, принципы и особенности которого подробно описаны в работе [2]. Увеличение чувствительности анализа и выявляемости возбудителя возможно при предварительном селективном концентрировании патогенов на МИС с последующей постановкой диагностических реакций [5, 6]. Перспективным методом детекции возбудителей является МГА с применением пьезобиосенсорных (ПБ) устройств, позволяющих быстро реализовать процесс достоверного распознавания анализируемых молекул в образовавшемся комплексе антиген-антитело. При создании ПБ используются пьезокварцевые резонаторы (ПКР), работающие не только в вакууме и на воздухе (статический режим), но и в жидкости (проточно-инжекционный режим) [1, 3]. Они характеризуются простотой в эксплуатации, а также наличием автоматической системы сбора информации [9]. Одним из эффективных способов выявления антигенов в режиме реального времени является метод ППР в проточных ячейках. Он позволяет с высокой чувствительностью количественно определять поверхностную концентрацию антител и наличие антигенов, вступающих в реакцию с находящимися на поверхности молекулами-мишенями [Isakova A. et al., 2018].

Цель работы — сравнительный анализ и оценка серологических методов выявления возбудителя туляремии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коммерческие и экспериментальные диагностические препараты производства Ставропольского противочумного института: «Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый

жидкий»; «Иммуноглобулины флуоресцирующие туляремийные сухие»; «Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе»; «Набор реагентов тест-система иммуноферментная магноиммосорбентная для выявления возбудителя туляремии»; «Тест-система микрогравиметрическая биосенсорная для выявления возбудителя туляремии». Для постановки ППР применяли экспериментальные серии биосенсоров (Институт физической химии и электрохимии).

Исследования проводили на культурах гомологичных *Francisella tularensis* Miura, *F. tularensis* 890 Аз, *F. tularensis* Schu, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенных на желточной среде Мак-Коя в течение 24 ч при 37°C, инактивированных хлороформом (для всех методов, кроме РИФ) и гетерологичных штаммов *Brucella abortus* 544, *B. melitensis* 16-М, *B. suis* 1330, выращенных на печёночном агаре в течение 48 ч при 37°C, *Yersinia enterocolitica* 178, 383 — на агаре Хоттингера в течение 48 ч при 37°C и инактивированных формалином (для всех методов, кроме РИФ). Штаммы получали из лаборатории коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института.

Эксперименты проводили с чистыми обеззараженными культурами *F. tularensis* (тест-штаммами), штаммами гетерологичных микроорганизмов и в модельных опытах на 3 л водопроводной воды с 200 г садовой земли, контаминированной различными концентрациями *F. tularensis*. Индикацию возбудителя осуществляли методами РНГА, РИФ, ИФА, ИФА с МИС, МГА, ППР.

РНГА проводили традиционным макро- и микрометодом в лунках планшета полистиролового круглодонного с визуальным учетом результатов. РИФ ставили на фиксированных мазках гомологичных *F. tularensis* и гетерологичных штаммов. Учет результатов осуществляли по 4-крестовой системе на люминесцентном микроскопе Primo Star iLED («Carl Zeiss», Германия). За положительный результат принимали специфическое свечение не менее трех микробных клеток возбудителя туляремии с яркостью 3-4 креста.

Постановка ИФА включала сенсбилизацию планшет туляремийными иммуноглобулинами, проведение анализа и учет результатов. Проведение ИФА с МИС осуществляли путем селективного концентрирования возбудителя туляремии на МИС (магнитная матрица с иммобилизованными туляремийными антителами) с последующим взаимодействием с иммунопероксидазным туляремийным конъюгатом, отмывкой от несвязавшихся компонентов, введением хромогенной смеси. Учет результатов в традиционном ИФА (на планшетах) и ИФА с МИС проводили на фотометре Multiscan FC (ЗАО «Термо Фишер Сайентифик», США) при длине волны 450 нм с соблюдением следующих условий: среднее значение ОП отрицательного контроля не более 0,2; значение ОП в лунке с положительным контролем в 2 и более раз превышала ОП отрицательного контроля.

Постановка МГА включала: иммобилизацию туляремийных антител на золотой подложке ПКР, взаимодействие с антигеном с использованием жидкостной ячейки и перистальтического насоса (P-1 FPLC LKB Pharmacia), учет результатов по сдвигу частот на устройстве для измерения параметров и настройки пьезоэлектрических резонаторов CPNA-330 (НПФ ЗАО «ЭТНА», Россия) с программным обеспечением.

ППР проводили путем иммобилизации туляремийных антител на позолоченном стеклянном чипе, дальнейшем взаимодействии с антигеном с использованием перистальтического насоса (BT100-1F, LONGER Precision Pump) и учетом результатов на ППР-спектрометре Biosuplar 6 («Mivitec», Германия) по сдвигу резонансной кривой ППР, который пропорционален количеству частиц антигена, взаимодействующих с антителами.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли, определяя критерий Стьюдента, с использованием программы Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Один из широко и давно применяемых методов иммуноанализа — РНГА. В состав набора входит основной компонент — диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый жидкий 5 % и все необходимые ингредиенты для постановки реакции. При проведении экспериментов с чистыми обеззараженными культурами *F. tularensis* были получены положительные результаты в РНГА при наличии в пробе 5×10^5 — 1×10^6 м.к./мл ($t=1$) и выше. При контроле специфичности с гетерологичными штаммами гемагглютинация отсутствовала. Для постановки 200 анализов (макрометодом) или 2000 анализов (микрометодом) в РНГА достаточно 5 мл 5 % взвеси эритроцитарного диагностикума. Достоинства метода: высокая специфичность и чувствительность; простота постановки; требуется минимальное количество компонентов; низкая стоимость набора; визуальный учет (нет необходимости в дорогостоящем оборудовании и ингредиентах); экспрессность при исследовании микрометодом (2-2,5 ч).

Широкое распространение получил и метод флуоресцирующих антител. РИФ ставили с применением иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремиальных. При проведении экспериментов с чистыми обеззараженными культурами *F. tularensis* были получены положительные результаты в РИФ при наличии в пробе 5×10^5 — 1×10^6 м.к./мл ($t=0,78$) и выше. При контроле специфичности отсутствовало свечение с гетерологичными штаммами. Одной ампулы с препаратом в объеме 0,5 мл с активностью в РИФ 1:32 достаточно для проведения 400 анализов в дубликate. Достоинства метода: высокая специфичность и чувствительность; простота постановки; возможность обнаруживать антиген в люминесцентном микроскопе по интенсивности свечения и морфологии; экспрессность. Основным недостатком РИФ является ее субъективность.

Одним из наиболее эффективных и часто используемых методов лабораторной диагностики является ИФА. Основной компонент тест-системы — иммуноферментный конъюгат туляремиальный иммуноглобулиновый сухой. Чувствительность метода с тест-штаммами составила 5×10^5 — 1×10^6 м.к./мл ($t=0,72$) при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами. Одной ампулы с иммунопероксидазным конъюгатом с активностью 1:400 достаточно для проведения 200 анализов в дубликate. Достоинствами метода является его экспрессность при условии использования заранее сенсibilизированных планшет; возможность одновременного исследования большого количества проб; высокая специфичность и чувствительность. К недостаткам можно отнести необходимость применения только химически чистой посуды для исключения ложноположительных результатов, а также длительность анализа при необходимости предварительной сенсibilизации планшет (16-18 ч при температуре 4-6 °С или 3 ч при температуре 36 °С).

Исследования водопроводной воды с контаминированными взвесями *F. tularensis* в РНГА, РИФ и ИФА дали отрицательные результаты, так как выявляемая концентрация возбудителя была ниже порога чувствительности анализов.

Известно, что выявить патогены в водных объектах сложно, так как их концентрация может быть существенно ниже пороговой чувствительности методов специфической индикации. Для обеспечения концентрирования *F. tularensis* из проб воды большого объема использованы туляремиальные МИС с последующим выявлением возбудителя в ИФА. МИС с иммобилизованными антителами селективно сорбируют возбудитель туляремии, а окончательная его идентификация возможна как в полевых, так и в стационарных лабораториях. При проведении экспериментов с чистыми обеззараженными культурами *F. tularensis* и в модельных опытах были положительные результаты при наличии в объеме пробы 1×10^2 — 1×10^3 м.к. ($t=1$) и выше. Достоинства ИФА с МИС: экспрессность (отсутствие этапа сенсibilизации планшет); высокая

чувствительность и возможность выявления возбудителя в загрязненных объектах окружающей среды за счет селективного концентрирования патогена.

Были сконструированы экспериментальные серии пьезоэлектрических биосенсоров для обнаружения возбудителя туляремии в МГА. В состав тест-системы входят ПБ (ПКР с золотыми электродами, активирован и иммобилизован туляремиными иммуноглобулинами) и все необходимые реагенты для постановки МГА. При проведении экспериментов, возбудитель специфически связывался с иммобилизованными на поверхности пластины ПБ иммуноглобулинами с образованием иммунокомплексов. Далее измеряли частоту колебаний и результат оценивали по сдвигу частот в Гц (разности частотных характеристик) ПБ до и после его взаимодействия с возбудителем туляремии. Положительным считали сдвиг частот в сторону уменьшения на 20 Гц и более. В качестве отрицательного контроля использовали ПБ в разводящей жидкости, не содержащей антиген. В результате установлено, что чувствительность метода составила $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ м.к./мл ($t=0,62$). При постановке МГА с гетерологичными штаммами получены отрицательные результаты (сдвиг частот уменьшился на 3-5 Гц), что свидетельствует о специфичности препарата. При проведении анализа с контаминированными пробами в модельных опытах получены также отрицательные результаты в связи с загрязнением проб (присутствием в исследуемой взвеси частиц садовой земли), что мешало корректному проведению анализа. Достоинства метода: высокая чувствительность при отсутствии реакции с гетерологичными штаммами; быстрота постановки и получения результатов анализа — 15 мин; информативность — графические и табличные данные. ПБ позволяют осуществлять прямую регистрацию биохимических взаимодействий рецепторных молекул без дополнительного введения меток (флуоресцентных, ферментных и др.), что выгодно отличает их от аналогичных устройств. Недостатками являются отсутствие возможности исследовать одновременно несколько проб, в результате необходимо затрачивать время на подготовку жидкостной ячейки для следующей пробы, а также дороговизна ПБ, так как он состоит из ПКР с золотыми электродами.

Метод ППР в проточных ячейках позволяет с высокой чувствительностью регистрировать реакцию антиген-антитело в режиме реального времени. В процессе осаждения антигена на поверхности ППР-сенсора происходит взаимодействие с антителами и меняются оптические свойства приповерхностного слоя. Таким образом, измеряя величину сдвига минимума кривой ППР, можно определять поверхностную концентрацию антител и наличие в растворах возбудителя, вступающего в реакцию с находящимися на поверхности молекулами-мишенями. Постановку и учет результатов проводили с помощью ППР-спектрометра, оснащенного плоской двухкамерной проточной ячейкой. Исследуемые растворы прокачивали через обе камеры измерительной ячейки с помощью перистальтического насоса со скоростью 960 мкл/мин. Адсорбция возбудителя на поверхности чипа сопровождалась изменением оптических параметров поверхностного слоя жидкости, что приводило к росту сигнала ППР-спектрометра, измеряемого в условных единицах. Установлено, что чувствительность метода составила $1 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$ м.к./мл ($t=0,78$), что в 1000 раз превышает чувствительность методов РНГА, РИФ и ИФА при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами. При постановке ППР в модельных опытах получены отрицательные результаты в связи с загрязнением проб, что мешало корректному проведению анализа. Достоинство метода: высокая чувствительность при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами; быстрота постановки и получения результатов анализов; информативность.

Основные сравнительные характеристики методов, применяемых для индикации возбудителя туляремии, представлены в табл.

Таким образом, после проведения сравнения серологических методов диагностики можно заключить, что каждый из них имеет как достоинства, так и недостатки.

Сравнение основных показателей серологических методов при выявлении *F. tularensis*

Метод	Время получения результата, час	Чувствительность		Специфичность	Режим постановки и учета результата измерений	Информативность
		Исследуемые объекты				
		Чистая культура	Загрязнённые объекты окружающей среды**			
РНГА	24 макро / 2 микро	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ м.к./мл (t=1)	Отсутствует гемагглютинация	Отсутствует гемагглютинация	Статический (последняя операция)	Визуально без инструментального учета
РИФ	1-1,5	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ м.к./мл (t= 0,78)	Отсутствует специфическое свечение	Отсутствует специфическое свечение		Визуально с учетом на люминесцентном микроскопе
ИФА с МИС	1	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$ м.к./мл (t=1)	$(1 \times 10^2 - 1 \times 10^3)$ м.к. в пробе (t=1)	Отрицательный результат		Инструментально на фотометре
ИФА	3 (21/6)*	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ м.к./мл (t=0,72)	Отрицательный результат	Отрицательный результат		Инструментально на фотометре
МГА	0,5	$1,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^4$ м.к./мл (t=0,62)	Отрицательный результат	Отрицательный результат	Режим реального времени с контролем каждой операции в исследовании	Инструментально на биосенсорной установке — частотомере
ППР	<0,1	$1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$ м.к./мл (t=0,78)	Отрицательный результат	Отрицательный результат		Инструментально на ППР-спектрометре

Примечание. * С учетом сенсибилизации планшет в холодильнике при температуре 4-6°C/ в термостате при температуре (37±2)°C; ** модельный опыт с загрязненными пробами.

Например, в полевых условиях или в районах, в которых отсутствует дорогостоящее оборудование, проведение диагностики туляремии возможно с использованием высокочувствительного метода РНГА без применения инструментального учета результатов реакции. Не менее чувствительными, но требующими соответствующего оборудования являются РИФ и ИФА. Более чувствительные инструментальные методы — МГА и ППР, но их не рентабельно использовать при скрининговых исследованиях из-за их дороговизны. Для выявления возбудителя туляремии в водоёмах с низкой концентрацией возбудителя, в т.ч. загрязненных, эффективным является метод ИФА с МИС, т.е. выявление возбудителя в ИФА после его селективного концентрирования на магнитной матрице.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Шашканова О.Ю. Пьезокварцевые биосенсоры для анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов и для клинической диагностики. Российский химический журнал, 2008, 3 (2): 17-29.
2. Долгов В.В. Иммунохимический анализ в лабораторной медицине. Учебное пособие: Изд-во «Триада», 2015: 34-38.
3. Кальной С.М., Жарникова И.В., Дикова С.П., Ляпустина Л.В., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Жарникова Т.В., Куличенко А.Н. Заявка № 2012114858/10, 13.04.2012. Способ получения микрогравиметрического иммуносенсора. Патент РФ № 2510830, 10.04.2014. Бюл. № 10.
4. Тюменцева И.С., Жарникова И.В., Афанасьев Е.Н. и др. Научно-методические разработки биотехнологий производства иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и детекции их возбудителей. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение, 2015, 4: 21-26.

5. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Старцева О.Л., Курчева С.А., Жарникова И.В., Гаркуша Ю.Ю., Жданова Е.В., Кальной С.М. Разработка стандартных условий биотехнологии производства иммуномагнитного сорбента для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний. *Технологии живых систем*. 2017, 2: 52-58.
6. Тюменцева И.С., Курчева С.А., Афанасьев Е.Н., Жарникова И.В., Жданова Е.В., Старцева О.Е., Гаркуша Ю.Ю., Семирчева А.А. Особенности пробоподготовки с использованием иммуномагнитного сорбента при исследовании полевого материала на наличие возбудителя чумы. *Военно-медицинский журнал*. 2018, 339 (5): 42-46.
7. Хаиров С.Г., Юсупов О.Ю., Яникова Э.А. Заявка № 2012101543/10, 17.01.2012. Способ получения эритроцитарного антигенового овисного диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с целью индикации овисного антигена в биоматериале. Патент РФ № 2509306, 10.03.2014. Бюл. № 7.
8. Gall D., Nielsen K., Forbes L. et al. Alidation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in bison. *J. Wildl. Dis.* 2000, 36 (3): 76-469.
9. Pohanka M., Skladal B. Piezoelectric Immunosensor for the Direct and Rapid Detection of *Francisella tularensis*. *Folia Microbiol.* 2007, 52 (4): 325-330.
10. Sting R., Ortmann G. Erfahrungen mit einfachen ELISA-Testsystemes für die Brucellose — Serologie bei Rind, Schaf und Ziege. Berlin. *Und munch. Wochenschr* 2000, 113 (1): 22-28.

Поступила 27.11.18

Контактная информация: Жарникова Ирина Викторовна,
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Г.М.Игнатьев^{1,2}, Е.В.Отрашевская¹, Л.Л.Суханова¹, Е.С.Сидоренко¹, Н.А.Нетесова³

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ШТАММА RA-27/3, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КРАСНУХИ

¹НПО «Микроген», Москва; ²Федеральный НЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова, Москва; ³ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская область

Цель. Целью данной работы было изучение генетической стабильности производственного штамма RA-27/3 вируса краснухи, используемого для производства вакцины НПО «Микроген». *Материалы и методы.* В исследовании были использованы серии производственного и посевного штаммов RA-27/3 вируса краснухи НПО «Микроген», готовые серии вакцин краснухи различных производителей и штамм «Орлов» вируса краснухи. Молекулярно-генетическое исследование штаммов проведено с использованием ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией и секвенированием. *Результаты.* Получены полногеномные последовательности производственного и посевного штаммов RA-27/3 вируса краснухи, используемого НПО «Микроген» для производства вакцины. Последовательность вакцинного штамма представлена в GenBank. Показано полное соответствие штамма RA-27/3, используемого НПО «Микроген», аналогичному штамму, используемому GSK и Merck&Co. Inc. Штамм RA-27/3 вируса краснухи, применяемый НПО «Микроген», генетически стабилен. Полученные данные позволили продемонстрировать возможность использования метода ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией для подтверждения подлинности вакцинного штамма RA-27/3 вируса краснухи в готовых формах вакцин, как монокомпонентных так и трехкомпонентных. *Заключение.* Результаты проведенного исследования позволяют предположить возможность применения молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности изученных штаммов не только на этапах производства, но и в готовых сериях вакцин.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 38—46

Ключевые слова: вирус краснухи штамм RA-27/3, генетическая стабильность, метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

MOLECULAR-GENETIC STUDY OF THE RA-27/3 STRAIN USED FOR PRODUCTION OF RUBELLA VACCINE

¹Scientific and Production Association for Immunobiological Preparations «Microgen», Moscow; ²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Products, Moscow; ³State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian

Aim. In order to study rubella virus strain RA-27/3 genetic stability, used for the vaccines production, a molecular genetic study was conducted. *Materials and methods.* In the study different series of master and work seed of RA-27/3 rubella virus strain by «Microgen», a few lots of rubella vaccines by the different manufacturers, as well as strain «Orlov» of rubella virus were used. RT-PCR followed by restriction, sequencing were performed. *Results.* Full-genomic sequences of the rubella virus strain RA-27/3 by «Microgen», were obtained and presented to GenBank. The full structure correspondence of RA-27/3 rubella virus strain by «Microgen» to the similar rubella strains used by GSK and Merck & Co Inc. has been shown. The RT-PCR method with the subsequent restriction was fulfilled using only domestic reagents. The developed method has been demonstrated as applicable for the identification of the RA-27/3 rubella virus strain as in mono-preparation as well as in the combined vaccine preparation. *Conclusion.* The data obtained make it possible to suggest application of the molecular genetic methods for the vaccine virus identification not only at the production stages, but also in the finished vaccine lots.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 38–46

Key words: rubella virus strain RA-27/3, genetic stability, restriction fragment length polymorphism

ВВЕДЕНИЕ

Краснуха является контагиозным заболеванием средней тяжести и характеризуется невысоким подъемом температуры, кореподобной сыпью и лимфоаденопатией. Вирус краснухи, вызывающий данное заболевание, относится к роду Rubivirus семейства Togaviridae [7,14]. По нуклеотидной последовательности вирус краснухи разделен на две клады, включающие в себя 13 генотипов. К первой кладе относятся 10 генотипов (1a-1J), ко второй кладе — три (2A-2C). Генотипирование вируса краснухи проводится по нуклеотидной последовательности фрагмента кДНК области кодирующей белок оболочки E1 (позиция референсной последовательности генома: 8731-9469) длиной не менее 739 п.н [7, 14].

Эффективным средством профилактики заболевания является вакцинация. Для ее проведения было разработано девять вакцин на основе аттенуированных штаммов вируса краснухи [12]. Пять вакцин разработаны и производятся в Японии с использованием штаммов Matsuba, Matsuura, TCRB19, TO-336, KRT [11-13]. В КНР используется штамм BRD-2 [16]. Штаммы HPV-77 и Cendehill использовались для производства вакцин в США [6, 12]. Штамм RA-27/3 используется многими производителями вакцины против краснухи, такими как, Merck & Co. Inc, GSK Biologicals, НПО «Микроген», Serum Institute of India (Индия), Institute of Immunology (Хорватия) [12,13,15]. Современные требования к производству вакцинных препаратов, содержащих живые вакцинные вирусы, предполагают контроль генетической стабильности производственных штаммов, в том числе, вируса краснухи, что рекомендовано ИЧН и ГФ РФ XIII [1, 8]. Все производители, кроме Serum Institute of India (Индия) и Institute of Immunology (Хорватия), сделали доступной информацию о нуклеотидной структуре производственных штаммов RA-27/3 вируса краснухи и об их генетической стабильности [12, 15]. Наличие информации о нуклеотидной структуре штаммов позволяет применить молекулярно-генетические методы для контроля подлинности вакцинных штаммов, причем, не

только на этапах производства, но и в готовых сериях вакцины. Регламентированный ГФ РФ XIII метод определения подлинности производственного штамма вакцины против краснухи, также, как производственных штаммов вакцин паротитной и коревой, на самом деле, не позволяет подтвердить подлинность именно производственного штамма. Метод нейтрализации вируса специфической иммунной сывороткой позволяет только подтвердить принадлежность исследуемого вакцинного штамма вируса к роду и семейству. Для вирусов кори, паротита и краснухи описан высокий серологический перекрест между штаммами — т.е. иммунная сыворотка, полученная к вакцинному штамму обладает вируснейтрализующей активностью по отношению к другим штаммам семейства [3-5,9,10]. Ранее была продемонстрирована возможность использования метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (Restriction fragment length polymorphism — RFLP) для дифференциальной диагностики и подтверждения подлинности вакцинного штамма вируса паротита «Ленинград-3» (НПО «Микроген») [2].

Целью настоящей работы было исследование структуры производственного и посевного штамма RA-27/3 вируса краснухи, используемого НПО «Микроген» для производства моновалентной и трехкомпонентной вакцин, а также изучение возможности применения молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности производственного штамма в готовой форме вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован вирус краснухи штамм «Орлов» (генотип 2с), предоставленный СПб НИИ вакцин и сывороток. Штамм использовался в качестве контроля при проведении рестрикционного анализа вакцинных штаммов вируса краснухи.

В работе использованы вакцины следующих производителей: Serum Institute of India (SII) — вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная (четыре серии), вакцина против краснухи живая аттенуированная (одна серия). GlaxoSmithKlein Biologicals (GSK) — «Приорикс» — вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная (три серии). Merck&Co., Inc (Merck) — «ProQuad», вакцина против кори, паротита, краснухи и ветряной оспы (одна серия). НПО «Микроген»: вакцина против краснухи живая аттенуированная (3 серии), вакцина паротитная (штамм «Ленинград-3») (1 серия), вакцина против кори живая аттенуированная (штамм «Ленинград-16») (1 серия). Производственный штамм вируса краснухи RA-27/3 (серия №2), посевной вирус штамм RA-27/3 вируса краснухи (серии №3, 4). Комбинированная вакцина против кори, краснухи и паротита «Вактивир» (серии M0015эк, M0020эк, M0021эк).

Для выделения РНК из образцов использовали набор «РИБО-сорб» («АмплиСенс», Россия). Все работы по выделению РНК проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору. Выделенная РНК находилась в объеме 50 мкл. Все эксперименты проводились с использованием ферментов и компонентов реакционных смесей производства НПО «СибЭнзим» (Россия).

Плазмида ДНК pUCRA27/1 (кат.№ D17). Плазмида содержит вставку фрагмента кДНК вируса краснухи, штамм RA-27/3, длиной 589 п.н., соответствующих позициям 3669-4538 п.н. в геноме вируса краснухи. Фрагмент имеет сайт рестрикции рестриктазой ZraI (или AatII), позволяющий получить фрагменты с длинами 251 п.н. и 338 п.н.

Получение кДНК из препаратов РНК. Реакционная смесь при проведении реакции обратной транскрипции в объеме 50 мкл содержала: ОТ-ПЦР-смесь — реакционный буфер, смесь дНТФ, 50мМ MgCl₂, специфические праймеры (кат.№ E317, № B309, №025) — 47,1 мкл; HS Taq полимераза (кат. №B309) — 0,4 мкл; M-MuLV ревертаза (кат.№E317) — 0,5мкл; РНК исследуемого образца — 2 мкл. Реакцию проводили в течение 30 мин при 45°С.

ПЦР-амплификация фрагментов ДНК длиной 589 п.н. и их гидролиз эндонуклеазой рестрикции ZraI. После прохождения реакции обратной транскрипции проводилась ПЦР в тех же пробирках, поскольку все необходимые компоненты ПЦР уже содержались в растворах, а матрицей могла служить кДНК, наработанная с вирусной РНК. Термоциклирование проводили в следующем режиме: предварительный прогрев при 95°C — 3 мин, далее 35 циклов амплификации (95°C — 15 сек, 63°C — 20 сек, 68°C — 5 сек, 72°C — 40 сек). После прохождения ПЦР к 25 мкл полученной смеси добавляли 5 мкл буфера для рестрикции «ROSE» (кат.№B021) и 20 мкл воды, затем делили на две аликвоты по 25 мкл и к одной из них добавляли 1 мкл рестриктазы ZraI. После инкубации в течение 1 часа при 37°C пробы наносили на 1,5% агарозный гель и проводили электрофорез в 1xTAE-буфере.

Для определения полных последовательностей производственного штамма и посевного вируса штамма RA-27/3 (НПО «Микроген») были синтезированы праймеры, полностью перекрывающие последовательность генома вируса краснухи с шагом 500 п.н.

Секвенирование проводили на приборе Prism 310 Genetic Analyzer с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Анализ данных секвенирования проводили с использованием программы Chromas 2.22 (Techne-lysium Pty Ltd, Австралия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение первичной структуры полноразмерных геномов производственного штамма и посевного вируса штамма вируса краснухи RA-27/3 НПО «Микроген». Производственный штамм вируса краснухи RA-27/3 (серия №2) прошел 26 пассажей на культуре клеток WI-38 и три пассажа на клетках MRC-5. Посевной вирус штамм RA-27/3 (серия №3) прошел 26 пассажей на культуре клеток WI-38 и четыре пассажа на клетках MRC-5. Указанные серии были приготовлены в 2008 году. В 2012 году из производственного штамма (серия №2) была приготовлена серия №4 посевного вируса краснухи с тем же количеством пассажей, что и серия №3. В процессе производства вакцины посевной вирус проходит один пассаж на культуре клеток MRC-5. Пассажные истории штаммов RA-27/3, используемых GSK, Merck и НПО «Микроген», сопоставимы друг с другом [12, 15].

Результаты секвенирования кДНК производственного штамма (серия №2) представлены в GenBank (номер JF727653). Сравнительные результаты секвенирования кДНК посевного вируса (серии № 3 и 4) и кДНК штамма, полученной из готовой серии вакцины (номер в GenBank JF727654), приготовленной из серии №3 указанного посевного вируса, свидетельствуют о том, что нуклеотидные последовательности идентичны последовательностям производственного штамма. Полученные результаты указывают на то, что штамм RA-27/3 НПО «Микроген» генетически стабилен на этапах производства вакцины. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей штамма RA-27/3 НПО «Микроген» с ранее опубликованным геномом штамма Wistar RA 27/3 Merck и GSK (GenBank FJ211587, FJ211588) продемонстрировало, что структурные последовательности штамма RA 27/3 НПО «Микроген» полностью идентичны штамму RA 27/3 указанных производителей [15].

Выбор фрагмента штамма краснухи RA-27/3, пригодного для подтверждения подлинности штамма методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Выбор фрагментов штамма RA-27/3 для дальнейшего использования RFLP осуществлялся по следующим критериям: А — анализ множественного выравнивания референсных последовательностей всех генотипов вируса, включая вакцинные штаммы; В — существование доступной отечественной эндонуклеазы рестрикции, узнающей сайт, содержащий нуклеотидную замену; С — отсутствие сайта узнавания подобран-

ной рестриктазы в окрестности выявленной замены, так как дополнительный сайт может затруднить выявление нужного фрагмента после гель-электрофореза; D — уникальность замены, что проверяется при помощи программы BLAST с учетом всех неполных последовательностей из геномов вируса краснухи, внесенных в базу данных GenBank.

Анализ структуры геномов штаммов вируса краснухи в области гена белка E1 (8731-9469 п.н.). Данный участок (739 п.н.) генома вируса краснухи используется для генотипирования, поэтому для него имеется наибольшее количество первичных структур, выложенных в GenBank. В настоящем исследовании было проведено множественное выравнивание референсных последовательностей всех 13 генотипов вируса краснухи с последовательностью штамма RA-27/3 НПО «Микроген». В результате анализа было обнаружено, что фрагмент гена белка E1 (8731-9469 п.н.) не содержит одиночных замен, присущих только штамму RA27/3, пригодных для использования в дифференциации методом RFLP. Надежная дифференциация штамма RA27/3 от других вакцинных и диких штаммов возможна только при использовании нескольких (не менее четырех) эндонуклеаз рестрикции для гидролиза ПЦП-продукта с участка 739 п.н. В связи с этим, был проведен анализ всех известных полных геномов вируса краснухи с целью выявить подходящие отличия последовательности штамма RA27/3 вне участка, используемого для определения генотипов.

Анализ первичной структуры полноразмерных геномов штаммов вируса краснухи, представленных в базе данных GenBank. Для проведения анализа были выбраны 44 полноразмерных последовательности геномов штаммов и изолятов вируса краснухи, которые включают представителей всех имеющихся генотипов, последовательности вакцинных штаммы японских и китайских производителей вакцины и последовательности штамма RA27/3 от Merck, GSK и НПО «Микроген». Множественное выравнивание позволило обнаружить несколько нуклеотидных замен, присущих только штамму RA27/3. В результате проведенного анализа были отобраны две специфические для штамма RA27/3 (НПО «Микроген», Merck и GSK) одонуклеотидные замены, наиболее пригодные для их дифференциации от остальных известных штаммов вируса краснухи. В позиции 2950 геном штамма RA-27/3 содержит замену C→T, что приводит к образованию сайта CATCC/GGATG узнавания эндонуклеаз рестрикции FokI и BstF5I, которые являются изошизомерами, узнающими одинаковую последовательность, но расщепляющие ДНК в разных позициях (гетерошизомеры). Таким образом, указанный сайт эндонуклеазы рестрикции могут быть использованы для проведения RFLP. В позиции 4220 геном штамма RA27/3 содержит замену A→G, что приводит к образованию сайта GACGTC узнавания эндонуклеаз рестрикции AatII и ZraI (гетерошизомеры по данному сайту). Из трех найденных вариантов дифференциации штамма RA27/3 преимуществом обладает последний вариант с использованием ПЦП-продукта участка, включающего в себя замену в позиции 4220 и одной из рестриктаз ZraI или AatII. Так как сайт GACGTC встречается реже сайта CATCC, это упрощает анализ продуктов гидролиза. Остальные два варианта как с использованием сайта CATCC в позиции 2950, так и с использованием нескольких эндонуклеаз рестрикции для расщепления ПЦП-продукта с участка 739 п.н. могут быть зарезервированы на будущее и применены в случае обнаружения диких изолятов вируса краснухи, не отличимых от штамма RA27/3 в тесте на присутствие сайта GACGTC в позиции 4220.

Выбор праймеров для амплификации выбранного участка генома с сайтом GACGTC в позиции 4220 и расчет длин фрагментов, образующихся при гидролизе ПЦП-продукта. Для амплификации фрагмента, содержащего сайт GACGTC, были подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать фрагмент 589 п.н. — microRUf 5' GGC

TGG CCC AGG CGT ACT ACG A 3' ; microRUr 5' CGG CCG TCC CAA AGG TTG CA 3' . В результате проведения ПЦР с использованием кДНК из штаммов вируса краснухи и данных праймеров должен образоваться ампликон длиной 589 п.н. Нуклеотидная последовательность этого фрагмента для штамма RA27/3 (варианты НПО «Микроген», Merck и GSK) приведена ниже.

GGCTGGCCCCAGGCGTACTACGACGACCTCGAGGTTGCGCCGCCTCGGG
GATGACGCCATGGCCCCGGGCGGCCCTCGCATCAGTCCAACGCCCTCGCAA
AGGCCCTTACAATATCAGGGTATGGAACATGGCCGCAGGCGCTGGCAAGAC
CACCCGCATCCTCGCTGCCTTCACGCGCGAAGACSTTTACGTCTGCCCCACC
AATGCGCTCCTGCACGAGATCCAGGCCAAACTCCGCGCGCGCGATATCGACG
TCAAGAACGCCGCCACCTACGAGCGCGCGCTGACGAAACCGCTCGCCGCCTA
CCGCCGCATCTACATCGATGAGGCGTTCACTCTCGGCGGCGAGTACTGCGCG
TTCGTTGCCAGCCAAACCACCGCGGAGGTGATCTGCGTCGGTGATCGGGACC
AGTGCGGCCACACTACGCCAATAACTGCCGCACCCCCGTCCCTGACCGCTG
GCCTACCGAGCGCTCACGCCACACTTGGCGCTTCCCCGACTGCTGGGCGGC
CCGCCTGCGCGCGGGGCTCGATTATGACATCGAGGGCGAGCGCACCGGCAC
CTTCGCCTGCAACCTTTGGGACGGCCC

Расщепление этого фрагмента эндонуклеазой рестрикции ZraI (или AatII) приводит к образованию фрагментов с длиной 251 п.н. и 338 п.н. в случае использования в качестве матрицы кДНК штамма RA27/3 (НПО «Микроген», Merck и GSK). При расщеплении ампликонов, полученных в ПЦР с использованием кДНК от других штаммов вируса краснухи, фрагмент 589 п.н. будет иметь несколько отличающуюся структуру и не будет расщепляться ферментами ZraI и AatII. В качестве положительного контроля при проведении реакции возможно использование плазмиды ДНК pUCRA27/1 (НПО «СибЭнзим», Россия). Плазида содержит вставку фрагмента кДНК вируса краснухи, штамм RA-27/3, длиной 589 п.н., соответствующих позициям 3669-4538 п.н. в геноме вируса краснухи. Фрагмент имеет сайт рестрикции рестриктазой ZraI (или AatII), позволяющий получить фрагменты с длиной 251 п.н. и 338 п.н.

Результаты ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией рестриктазой ZraI в образцах, содержащих штаммы краснухи. Для выделения РНК и последующего проведения ОТ-ПЦР с рестрикцией использовали штаммы вируса краснухи и образцы готовых форм вакцины различных производителей, как описано в разделе Материалы и методы. Результат ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией производственного штамма RA-27/3 НПО «Микроген» представлен на рис. 1. При амплификации получен ампликон с предполагаемой расчетной длиной 589 п.н. При рестрикции полученного ампликона рестриктазой ZraI получены два фрагмента с расчетной длиной 251 п.н. и 338 п.н.

При проведении ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией штамма «Орлов» (генотип 2С) вируса краснухи ампликон расчетной длины получен, однако результат рестрикции — отрицательный. При рестрикции полученного ампликона рестриктазой ZraI фрагменты с расчетной длиной 251 п.н. и 338 п.н. не получены. Это связано с тем, что штамм краснухи «Орлов» не содержит сайт рестрикции ZraI в фрагменте генома с 3969 по 4538 н.о.

При проведении ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией производственного штамма, посевных серий вакцинного штамма и готовых серий вакцины против краснухи и комбинированной вакцины НПО «Микроген» была получена картина, аналогичная представленной на рис. 1. При проведении ОТ-ПЦР и последующей рестрикции всех серий вакцин против краснухи производства Serum Institute of India, GSK, Merck визуально результат совпадал с полученным для штамма RA-27/3 НПО «Микроген» (рис. 2).

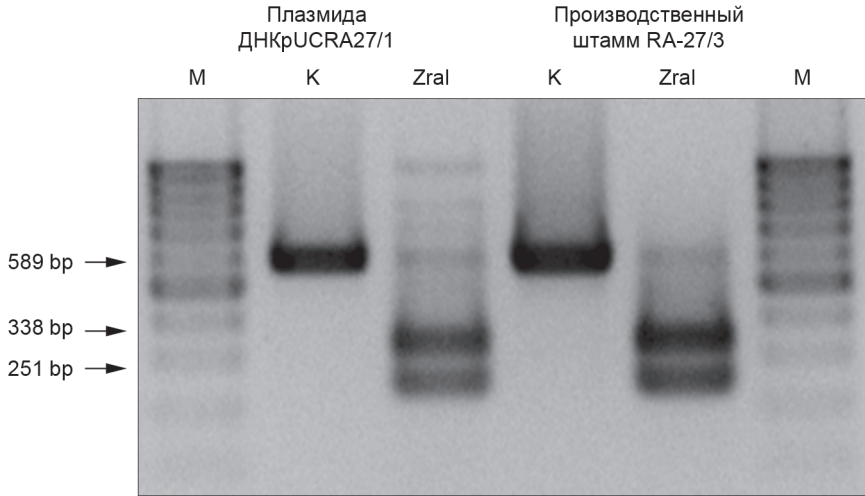


Рис. 1. Расщепление ПЦР-продуктов 589 п.н., амплифицированных из кДНК плазмиды и производственного штамма RA-27/3 НПО «Микроген».

M — маркер длины фрагментов 100 bp (НПО «СибЭнзим»); K — контрольные нерасщепленные продукты ПЦР; ZraI — продукты гидролиза ампликонов рестриктазой ZraI.

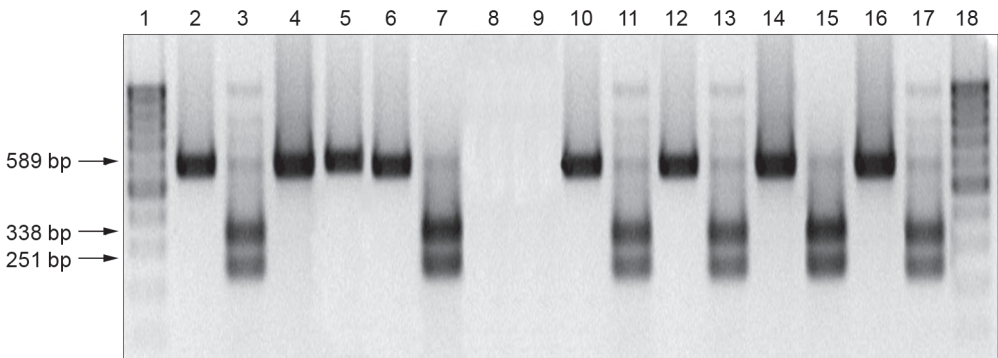


Рис. 2. Результаты ОТ-ПЦР и RFLP образцов вакцин различных производителей, содержащих и не содержащих штамм RA-27/3 вируса краснухи.

Дорожки 1, 18: M — маркер длин фрагментов 100 bp (НПО «СибЭнзим»); 2 — плазмида pUCRA27/1 (результат ОТ-ПЦР), 3 — RFLP ампликона плазмиды; 4 — ОТ-ПЦР штамма «Орлов», 5 — RFLP ампликона штамма «Орлов»; 6 — ОТ-ПЦР посевного штамма RA-27/3 НПО «Микроген»; 7 — RFLP ампликона посевного штамма RA-27/3 НПО «Микроген»; 8 — вакцина паротита; 9 — вакцина кори; 10 — ОТ-ПЦР готовой серии вакцины краснухи RA-27/3 НПО «Микроген»; 11 — RFLP ампликона готовой серии вакцины краснухи НПО «Микроген»; 12 — ОТ-ПЦР готовой серии вакцины краснухи Serum Institute of India; 13 — RFLP ампликона готовой серии вакцины краснухи Serum Institute of India; 14 — ОТ-ПЦР готовой серии вакцины краснухи GSK; 15 — RFLP ампликона готовой серии вакцины краснухи GSK; 16 — ОТ-ПЦР готовой серии вакцины краснухи Merck; 17 — RFLP ампликона готовой серии вакцины краснухи Merck.

При проведении ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией вакцин паротитной и против кори производства НПО «Микроген» фрагмент длиной 589 п.н. амплифицирован не был, т.е. результат был отрицательным.

Таким образом, выбранные праймеры позволяют провести ОТ-ПЦР всех РНК выделенных из образцов, содержащих вирус краснухи, и получить ампликон размером 589 п.н. (рис. 2). Только те фрагменты, которые содержат сайт рестрикции для

рестриктазы ZraI, характерный для штамма RA-27/3, при проведении рестрикции позволяют получить два фрагмента длиной 251 п.н. и 338 п.н.

Таким образом, предложенный для амплификации с последующей рестрикцией фрагмент штамма RA-27/3 позволяет подтвердить подлинность штамма не только на этапах производства, но и в готовой форме вакцины, независимо от производителя.

Исследование структуры гена белка протеиназы p150 штамма вируса краснухи RA-27/3 готовых серий вакцины различных производителей. Для штаммов вируса краснухи, используемых в Японии, показано, что изменение их биологических свойств в ходе аттенуации может быть связано с изменениями аминокислот в гене p150 [11]. Сравнение последовательностей гена p150 готовых серий краснушной вакцины НПО «Микроген», полученных при проведении данного исследования, продемонстрировало совпадение структур между собой и их гомологичность последовательностям штамма RA-27/3 GSK и Merck (по данным GenBank). Поскольку данные о последовательности штамма RA-27/3 SII в GenBank отсутствуют, было проведено изучение структуры гена p150 в готовых формах вакцин разных производителей — НПО «Микроген», GSK, Merck и SII. Результаты секвенирования гена p150 готовых серий НПО «Микроген», GSK и Merck продемонстрировали полное совпадение последовательностей между исследованными образцами и их гомологичность структурам, представленным указанными производителями для штамма RA-27/3 в GenBank. Для готовых серий SII выявлена замена в позиции 1691 — G→A. Данная замена приводит к изменению кодона GCG в кодон ACG и, соответственно, к изменению аминокислоты аланин (неполярная) в аминокислоту треонин (полярная). При расщеплении этого предшественника, аминокислотная замена аланин→треонин унаследует белком p150, содержащим протеазный домен и домен кэпирования. Эта замена не располагается в каком-либо из функциональных доменов белка p150 и, таким образом, ее роль в изменении структурных и биохимических характеристик белка p150 на данном этапе не ясна. Тем не менее, полученные результаты позволяют говорить о неполной гомологии штамма RA-27/3, используемого индийским производителем, со штаммом RA-27/3, используемым GSK, Merck и НПО «Микроген».

Таким образом, в результате проведенного исследования продемонстрированы: генетическая стабильность штамма вируса краснухи RA-27/3, используемого НПО «Микроген» для производства вакцин как моно-, так и комбинированной вакцины; гомологичность этого штамма со штаммами RA-27/3, используемыми GSK и Merck; возможность использования метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для подтверждения подлинности вакцинного штамма в готовой форме вакцины против краснухи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея РФ XIV. ФС.3.3.1.0024.15 Вакцина против краснухи культуральная живая.
2. Кулак М.В., Белавин П.А., Нетесова Н.А., Юнасова Т.Н., Голикова Л.Н., Бектемиров Т.А., Игнатьев Г.М. Дифференциация вакцинного штамма Л-3 от других штаммов вируса паротита методом ОТ-ПЦР. Биопрепараты. 2008, 4: 7-11.
3. Отрашевская Е.В., Букин Е.К., Красильников И.В., Игнатьев Г.М. Специфический гуморальный иммунитет после однократной иммунизации паротитной вакциной: результаты трехлетнего наблюдения. Вопросы вирусологии. 2011, 56(3): 45-48.
4. Atrasheuskaya A.V., Kulak M.V., Neverov A.A. et al. Measles cases in highly vaccinated population of Novosibirsk, Russia, 2000-2005. Vaccine. 2008, 26(17): 2111-2118.
5. Charlton C.I., Lai F.Y., Dover D.C. How to determine protective immunity in the post-vaccine era. Human vaccines & immunotherapeutics. 2016, 12(4): 903-906.

6. Fogel A., Plotkin S.A. Markers of rubella virus strain in RK13 cell culture. *Journal of Virology*. 1969, 3(2): 157-163.
7. Hobman T., Chantler J. Rubella virus. *In: Knippe D.M., Howley P.M., Griffin D.E. et al. (editors). Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins: 2007, p. 1069-1100.
8. ICH Guidance, Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (63 FR 50244; September 21, 1998).
9. Kanbayashi D., Kurata T., Takahashi K. et al. A novel cell-based high throughput assay to determine neutralizing antibody titers against circulating strains of rubella virus. *J. of Virological Methods*. 2018, 28: 86-93.
10. McLean H.Q., Fiebelkorn A.P., Ogee-Nwankwo A. et al. Rubella virus neutralizing antibody response after a third dose of measles-mumps-rubella vaccine in young adults. *Vaccine*. 2018, 36(38): 5732-5737.
11. Otsuki N., Abo H., Kubota T. et al. Elucidation of the full genetic information of Japanese rubella vaccines and the genetic changes associated with in vitro and in vivo vaccine virus phenotypes. *Vaccine*. 2011, 29: 1863-1873.
12. Reef S.E., Plotkin S.A. Rubella vaccine. *In: Plotkin S., Orenstein W., Offit P. (editors). Vaccines*. Philadelphia, PA: Elsevier, 2013, p. 688-717.
13. Rubella vaccines. WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2011, 86(29): 301-316.
14. Rubella virus nomenclature update. *Wkly Epidemiol. Rec*. 2013, 88(32): 337-343.
15. Tillieux S.L., Halsey W.S., Sathe G.M. et al. Comparative analysis of the complete nucleotide sequences of measles, mumps, and rubella strain genomes contained in Priorix-Tetra and ProQuad live attenuated combined vaccines. *Vaccine*. 2009, 27(16): 2265-2273.
16. Xu H., Gao X., Bo F. et al. A rubella outbreak investigation and BRD-II strain rubella vaccine effectiveness study, Harbin city, Heilongjiang province, China, 2010 -2011. *Vaccine*. 2014, 32(1): 85-90.

Поступила 10.02.19

Контактная информация: Отрашевская Елена Викторовна,
115088, Москва, 1-я Дубровская ул., 15, р.т. (495)790-77-73

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Н.Ф.Василенко, Е.А.Манин, О.В.Малецкая, А.С.Вольнкина, Д.А.Прислегина, О.В.Семенко, А.Н.Куличенко

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРИРОДНОГО ОЧАГА КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Ставропольский Научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Определить границы природного очага Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ) в Российской Федерации на современном этапе, уточнить спектр основных резервуаров и переносчиков возбудителя КГЛ, оценить лоймопотенциал природного очага. *Материалы и методы.* Используются материалы эпидемиологического и эпизоотологического мониторинга природного очага КГЛ, методы эпидемиологического и эпизоотологического анализа, молекулярно-генетический и картографический метод. Обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2010. *Результаты.* Научно обоснована единая целостность полупустынно-степного природного очага КГЛ, занимающего на современном этапе обширную территорию юга европейской части России площадью 831 тыс. км². Четко прослеживается расширение ареала возбудителя КГЛ с вовлечением в эпидемический процесс новых административных районов, выраженная тенденция смещения границ очага в северном направлении. Отмечается рост лоймопотенциала природного очага. Основной резервуар и переносчик вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки — клещ *Hyalomma marginatum*. В природном очаге преобладающим генотипом является «Европа-1». *Заключение.* Необходимо совершенствовать тактику эпидемиологического надзора за КГЛ с применением современных научно-обоснованных подходов, одним

из которых является автоматизированная прогнозно-моделирующая система, позволяющая на основании многофакторного анализа предикторов, влияющих на интенсивность эпидемических проявлений данной инфекции, количественно прогнозировать эпидемиологическую ситуацию по КГЛ в целом и по отдельным субъектам юга России.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 46—52

Ключевые слова: Крымская геморрагическая лихорадка, вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, природный очаг, иксодовые клещи, генотип вируса

N.F.Vasilenko, E.A.Manin, O.V.Maletskaaya, A.S.Volynkina, D.A.Prislegina, O.V.Semenko, A.N.Kulichenko

THE MODERN CONDITION OF CRIMEAN-CONGO HAEMORRHAGIC FEVER NATURAL FOCUS IN THE RUSSIAN FEDERATION

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. To determine the boundaries of the Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) natural focus in the Russian Federation at the current stage, to clarify the range of the main reservoirs and vectors of CCHF pathogen, to assess the epidemiological capacity of the natural focus. *Materials and methods.* The materials of epidemiological and epizootological monitoring of the CCHF natural focus, methods of epidemiological and epizootological analysis, molecular-genetic and cartographic methods were used in the work. The findings have been treated using by software package Microsoft Office Excel 2010. *Results.* The unified integrity of the CCHF semi-desert-steppe natural focus, which occupies vast territory of the southern part of the Russian Federation of 831 thousand square kilometres, is science-based. Expanding the geographic area of the CCHF agent with the involvement new administrative district can be seen. The trend of shifting of the CCHF natural focus borders in a northerly direction has been established. An increasing of epidemiological capacity of the CCHF natural focus has been noted. *Hyalomma marginatum* ticks are the main reservoirs and vectors of CCHF virus. The genotype «Europe-1» is predominant genotype in the natural focus. *Conclusion.* It is necessary to improve the tactics of CCHF epidemiological surveillance using modern science-based approaches. For example, automated forecasting-modeling system, using results of multifactorial risk analysis, which have an impact on the intensity of CCHF epidemic appearances, allows to quantitative forecast epidemiological situation on this infection in the aggregate and for certain subjects of the south of the Russian Federation.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 46—52

Key words: Crimean-Congo haemorrhagic fever, Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, natural focus, Ixodidae, genotype of virus

ВВЕДЕНИЕ

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) — особо опасная природно-очаговая трансмиссивная вирусная инфекция, для которой характерна спорадическая заболеваемость с возникновением через непредвиденные временные периоды внезапных вспышек, сопровождающихся, как правило, высокой летальностью [11].

Возникшие эпидемические осложнения по КГЛ в Российской Федерации в 1999 г. [8, 10] обусловили необходимость углубленного изучения ряда вопросов природной очаговости этой болезни, выяснения причин активизации и расширения границ природного очага КГЛ, совершенствования профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Цель работы — определить границы природного очага Крымской геморрагической лихорадки в Российской Федерации на современном этапе, уточнить спектр основных резервуаров и переносчиков возбудителя КГЛ, оценить лоймопотенциал природного очага.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на основании результатов эпидемиологического и эпизоотологического мониторинга природного очага КГЛ, проведенного с 1999 по 2017 гг. специалистами Управлений Роспотребнадзора, ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в 8 субъектах Южного федерального округа (ЮФО) и 7 субъектах Северо-Кавказского федерального округа (СКФО), Референс-центра по мониторингу за возбудителем КГЛ, научно-исследовательских противочумных институтов и противочумных станций Роспотребнадзора. Использованы методы эпидемиологического и эпизоотологического анализа, молекулярно-генетический и картографический метод. Статистическую обработку полученных данных проводили стандартными методами непараметрической статистики с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Научное обоснование КГЛ как самостоятельной вирусной природно-очаговой болезни человека впервые получено в 1945 г., когда в степных районах Крымского полуострова было зарегистрировано 200 случаев острого лихорадочного заболевания неизвестной этиологии. В результате работы трех комплексных экспедиций в Крым (1944-1946 гг.) под руководством М. П. Чумакова впервые были установлены вирусная этиология и природная очаговость нового заболевания человека, получившего название «Крымская геморрагическая лихорадка» [12].

Природный очаг КГЛ существует благодаря функционированию паразитарной системы возбудителя КГЛ в определенных ландшафтно-географических зонах. Она относится к паразитарным системам сложного трехчленного типа: возбудитель (вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки) — переносчик вируса (ряд видов иксодовых клещей) — организм теплокровного животного (дикие и домашние животные). В функциональном отношении паразитарная система природного очага КГЛ — система замкнутого типа. Передача вируса от одного теплокровного животного к другому осуществляется трансмиссивным путем без этапа пребывания вируса в окружающей среде. Заражение людей не влияет на функционирование паразитарной системы вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) в природном очаге. Это биологический тупик в естественной циркуляции вируса [9].

В Российской Федерации природный очаг КГЛ расположен на территории юга европейской части, основным переносчиком и резервуаром вируса являются клещи *Hyalomma marginatum*. В подтверждение ключевой роли клещей *H. marginatum* В.А. Аристова и др. [1] приводят следующие доказательства: 1) все известные природные очаги КГЛ территориально расположены внутри ареалов клещей рода *Hyalomma*; 2) наибольшее число штаммов вируса ККГЛ выделено от этих клещей; 3) все вспышки КГЛ на юге России связаны с резко возросшей численностью клещей *H. marginatum* (несмотря на традиционно высокую численность клещей *Dermacentor marginatus*, ранее заболеваний не наблюдалось).

В период с 1944 по 1998 гг. в России в отдельные годы регистрировались единичные случаи и эпидемические вспышки КГЛ в Крыму, Ставропольском и Краснодарском краях, Ростовской и Астраханской областях [5] (табл.).

До 1999 года природный очаг КГЛ охватывал степные районы Крымского полуострова [12], степные и полупустынные районы Ставропольского края [9], пойменно-дельтовые районы Астраханской области [Ковтунов А.И. и др., 2007], степные и пойменно-речные ландшафтные районы Ростовской области [7].

С 1999 г. в Российской Федерации произошла активизация природного очага КГЛ, первые проявления которой были отмечены в Обливском районе Ростовской области. По данным Г.Г. Онищенко и др. [8], за период с 03 по 19 июля 1999 г. в

Обливском районе было зарегистрировано 27 больных КГЛ с лабораторно подтвержденным диагнозом, летальность составила 22,2%. Диагноз «КГЛ» был подтвержден при исследовании парных сывороток крови в реакции непрямой иммунофлюоресценции. Дополнительно в 3 случаях была выявлена РНК вируса ККГЛ в ОТ-ПЦР, в 2 случаях из исследуемого материала (от трупа и от больного) выделен и идентифицирован вирус. Таким образом, была установлена этиология вспышки особо опасной геморрагической лихорадки — КГЛ.

Вспышка КГЛ в Ростовской области возникла на территории, где ранее эту инфекцию не регистрировали.

Отличительными особенностями ее эпидемического проявления были нетипичное время для начала заболевания; острый характер; вовлечение в эпидемический процесс населения, в том числе не относящегося к группам риска по КГЛ; формирование семейных очагов; трансмиссивный механизм заражения за счет основных и подтвержденных переносчиков вируса — клещей *H. marginatum*, *D. marginatus* и *Rhipicephalus rossicus* (согласно критериям ВОЗ по оценке роли членистоногих как биологических переносчиков, от которых выделен вирус ККГЛ) [3]; а также высокий удельный вес (76 %) больных без геморрагического синдрома.

Обливский район удален от эндемичных по КГЛ районов территориями, сходными по ландшафту, пространственной и биоценотической структуре с природным очагом КГЛ. Поэтому не исключалась возможность возникновения микроочага в годы, предшествовавшие вспышке. Это могло произойти в результате расширения ареала основного переносчика и долговременного хранителя вируса ККГЛ — клеща *H. marginatum*. Механизмом распространения данного вида мог быть перенос имаго клещей их основными прокормителями — крупным рогатым скотом. Существование очага в станице Обливской и других населенных пунктах района могло поддерживаться также за счет широкого спектра мелких млекопитающих (резервуара вируса в природных биотопах).

По мнению Г.Г. Онищенко и соавт. [8], другой версией возникновения вспышки КГЛ в Обливском районе Ростовской области явилось расширение границ природного очага за счет заноса зараженных клещей птицами. Возникновение данной версии связано с тем, что Обливский район находится в зоне трансконтинентального перелета птиц и сравнительно недалеко от эндемичных по КГЛ территорий. Кроме того, нельзя исключить занос возбудителя-арбовируса перелетными и кочующими птицами с паразитирующими на них клещами — переносчиками вируса ККГЛ.

В 1999 г. обострилась эпидемиологическая обстановка по КГЛ и в Ставропольском крае, где было зарегистрировано 10 больных, летальность составила 30%. Также выявлен 1 больной в Астраханской области [Ковтунов А.И. и др., 2007].

С 2000 г. отмечено вовлечение в эпидемический процесс территорий, где раньше не выявлялись больные КГЛ. С 2000 г. больные КГЛ ежегодно регистрируются в Республиках Калмыкия и Дагестан, в Волгоградской области. В 2004, 2007 и 2008 гг. заболеваемость КГЛ отмечена в Республике Ингушетия (летальность составила 83,3%), в 2007, 2008 и 2015 гг. — в Карачаево-Черкесской Республике, в 2016 г. — в Кабардино-Балкарской Республике (1 случай с летальным исходом). В 2013 и 2015 гг. отмечены заносные случаи КГЛ из Республики Крым в Москву и в Воронежскую

Число зарегистрированных случаев заболевания КГЛ в период с 1944 по 1998 гг.

Территория	Годы	Число случаев КГЛ
Республика Крым	1944-1945	200
	1962-1964	7
	1970-1983	1
Краснодарский край	1948	18
Ставропольский край	1953-1968	25
	1970-1972	2
Астраханская область	1953-1967	230
	1970-1983	9
	1984-1998	1
Ростовская область	1963-1970	338
Итого		831

область. В 2017 г. вновь зарегистрирован большой КГЛ в Республике Крым. В период с 1999 по 2018 гг. в 10 субъектах Российской Федерации выявлено 2197 больных, у 87 (4,0%) из них заболевание закончилось летальным исходом [5, 6].

В настоящее время, кроме расширения ареала возбудителя КГЛ с вовлечением в эпидемический процесс новых административных районов, четко прослеживается выраженная тенденция смещения его границ в северном направлении. Так, установлено смещение границы ареала распространения клещей *H. marginatum* в Ростовской области на 45 км (с 49°26' с. ш. в 2003 г. до 49°52' с. ш. в 2015 г.) с выявлением больных КГЛ в административных районах, где ранее случаи заболевания не регистрировались (Морозовский, Белокалитвинский, Аксайский и Каменский).

Циркуляция вируса ККГЛ подтверждена выявлением маркеров возбудителя в пробах полевого материала на указанных территориях. Кроме того, в течение последних лет вирусофорные иксодовые клещи обнаружены в северных районах Волгоградской области, граничащих с Приволжским федеральным округом (Саратовской областью) — в Жирновском и Камышинском районах.

На современном этапе полупустынно-степной природный очаг КГЛ занимает обширную территорию юга европейской части России и охватывает территорию шести субъектов ЮФО (Ростовская, Волгоградская, Астраханская области, Краснодарский край, Республики Калмыкия и Крым) и пяти субъектов СКФО (Ставропольский край, Кабардино-Балкарская и Карачаево-Черкесская Республики, Республики Дагестан и Ингушетия).

Общая площадь очага составляет 831 тыс. км². Граница очага проходит в пределах северных районов Ростовской области, южных районов Волгоградской области, северо-восточных районов Астраханской области. На востоке очаг КГЛ ограничивается Каспийским морем, на юге граница очага не выходит за пределы Республик Дагестан и Ингушетия, Ставропольского края, а также — предгорных районов Кабардино-Балкарской и Карачаево-Черкесской Республик. На юго-западе граница очага проходит в пределах центральных районов Краснодарского края, а на западе — охватывает Республику Крым.

В юго-западном направлении очага есть районы Краснодарского края и Республики Крым, в которых не выявляются маркеры и не регистрируются больные КГЛ, что, по нашему мнению, может быть связано с недостаточным или несвоевременным проведением эпизоотологического обследования территории, а также со слабой настороженностью медицинского персонала первичного звена в отношении данной инфекции. Не исключена возможность того, что больные КГЛ могут регистрироваться под другими диагнозами, особенно, когда в клинических проявлениях отсутствует выраженный геморрагический синдром. По ландшафтно-географическим и природно-климатическим характеристикам представленные районы полностью соответствуют условиям обитания основного переносчика возбудителя КГЛ — клеща *H. marginatum*. В современных условиях необходимы коррективы в подходах к организации эпидемиологического и эпизоотологического мониторинга природного очага КГЛ в полном объеме и на постоянной основе.

Районы эпидемического проявления КГЛ и конкретные места заражения людей совпадают с оптимальными ландшафтно-географическими зонами, где отмечаются высокая численность и зараженность вирусом ККГЛ клещей рода *Nyalomma* — основного резервуара и переносчика инфекции. В природных биотопах теплокровными хозяевами возбудителя КГЛ являются зайцы, ежи и мелкие мышевидные грызуны. Имаго *H. marginatum* питаются на сельскохозяйственных животных — крупном рогатом скоте, овцах, лошадях, реже на свиньях, верблюдах. Преимагинальные фазы кормятся в основном на птицах семейств врановых (грачи, вороны) и куриных (фазаны, перепелки и др.). Прокормителем личинок и нимф является также домашняя птица (в основном, индейка), выпасаемая в окрестностях населенных

пунктов. В качестве сочленов паразитарной системы КГЛ в нее вовлекаются и другие виды иксодовых клещей: *Hyalomma scupense*, *D. marginatus*, *Dermacentor niveus*, *Haemaphysalis punctata*, *R. rossicus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus* и др. Эти виды являются второстепенными переносчиками, на их долю в сборах вирусиферных клещей приходится не более 3% [9].

В последние годы на территории полупустынно-степного природного очага КГЛ при проведении эпизоотологического мониторинга положительные находки у животных и птиц регистрировались в Астраханской, Волгоградской и Ростовской областях, Ставропольском и Краснодарском краях, Кабардино-Балкарской и Карачаево-Черкесской Республиках, Республиках Калмыкия, Дагестан, Ингушетия и Крым. Маркеры вируса ККГЛ обнаружены в пробах органов млекопитающих (полуденная песчанка, малый суслик, домовая мышь, гребенщикова и общественная полевка, лесная мышь, землеройка, заяц-русак, еж южный, полевка рыжая), а также в пробах органов птиц (скворец обыкновенный, грач, воробей полевой, галка) [2].

В результате молекулярно-генетических исследований изолятов вируса ККГЛ, выявленных в образцах сывороток крови больных КГЛ и суспензиях клещей, собранных на территории субъектов юга России, установлено, что в природном очаге циркулирует вирус ККГЛ, относящийся к трем генотипам: «Европа-1» (включает 4 субтипа: Va — «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1», Vb — «Волгоград-Ростов-Ставрополь», Vc — «Астрахань-2», Vd — «Крым»), «Африка-3» и впервые описанному генотипу «Калмыкия». В пределах генотипа «Европа-1» выявлены реассортантные варианты вируса ККГЛ. Преобладающим генотипом является «Европа-1», характерный для юга России, изолят вируса ККГЛ генотипа «Африка-3» впервые выявлен на территории Российской Федерации в 2013 г. из сыворотки крови больной в Ставропольском крае, что свидетельствует о возможности заноса новых генетических вариантов вируса из других регионов мира [4].

Территориальный анализ структуры популяции вируса ККГЛ на юге России показал, что в северной части природного очага КГЛ преобладают изоляты субтипа Vb, в южной — изоляты субтипа Va, реассортантные варианты наиболее распространены в районе перекрытия ареалов распространения субтипов Va и Vb. Анализ географического распространения генетических вариантов вируса ККГЛ на юге России показал наличие локальных популяций вируса, границы которых частично перекрываются.

В результате многолетнего мониторинга генетической структуры популяции вируса ККГЛ в России, проводившегося в период с 2007 по 2017 г., не выявлено существенных изменений в соотношении циркулирующих геновариантов вируса в субъектах юга России, что свидетельствует об относительной стабильности популяции вируса ККГЛ на территории Российской Федерации [5].

В последние годы отмечается рост лоймопотенциала природного очага КГЛ в Российской Федерации, что обусловлено рядом причин природного и антропогенного характера, способствовавших активизации горизонтальной схемы циркуляции возбудителя КГЛ в природных биотопах с вовлечением в эпизоотический процесс сельскохозяйственных животных [6].

Таким образом, в результате многолетней работы по изучению Крымской геморрагической лихорадки удалось научно обосновать единую целостность природного очага КГЛ, определить его границы, приуроченность и определенные ландшафтно-климатические условия, а также уточнить спектр основных резервуаров и переносчиков возбудителя инфекции. Показана высокая активность очага, о чем свидетельствует большое количество заболевших КГЛ и множественные положительные находки при эпизоотологическом обследовании.

Для снижения лоймопотенциала природного очага КГЛ и уровня заболеваемости людей необходимо совершенствовать тактику эпидемиологического надзора за

данной инфекцией с применением современных научно-обоснованных подходов, одним из которых является разработанная специалистами Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора автоматизированная прогнозно-моделирующая система [5], позволяющая на основании многофакторного анализа предикторов, влияющих на интенсивность эпидемических проявлений данной инфекции, количественно прогнозировать эпидемиологическую ситуацию по КГЛ в целом и по отдельным субъектам юга России, в том числе по каждому административному району, что будет способствовать более адекватному планированию и эффективно-му проведению противоэпидемических мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аристова В.А., Колобухина Л.В., Щелканов М.Ю., Львов Д.К. Экология вируса Крым-Конго геморрагической лихорадки и особенности ее клиники на территории России и сопредельных стран. *Вопр. вирусол.* 2001, 4: 7-15.
2. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Шапошникова Л.И., Волюнкина А.С., Лисицкая Я.В., Котенев Е.С., Куличенко А.Н. Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых инфекций на юге России в 2015 г. *Журн. микробиол.* 2017, 1: 29-35.
3. Вирусные инфекции, передаваемые членистоногими и грызунами. Доклад научной группы ВОЗ. Женева, 1986.
4. Волюнкина А.С., Куличенко А.Н. Современные методы молекулярно-генетического анализа Крымской геморрагической лихорадки в системе эпидемиологического надзора. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2016, 1: 53-60.
5. Крымская геморрагическая лихорадка. Под ред. Г.Г. Онищенко, А.Н. Куличенко. Воронеж., ООО «Фаворит», 2018.
6. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Прислегина Д.А., Василенко Н.Ф., Таран Т.В., Манин Е.А., Дубянский В.М. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2017 г. (Аналитический обзор). Ставрополь, 2018.
7. Миронов Н.П., Благовещенская Н.М., Кондратенко В.Ф., Шевченко С.Ф. Арбовирусные инфекции на юго-востоке европейской части РСФСР (Крымская геморрагическая лихорадка). Л., 1973.
8. Онищенко Г.Г., Айдинов Т.Г., Москвитина Э.А., Ломов Ю.М., Тихонов Н.Г., Прометной В.И. и др. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка в Ростовской области: эпидемиологические особенности вспышки. *Журн. микробиол.* 2000, 2: 36-42.
9. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П. Крымская геморрагическая лихорадка. М., 2005.
10. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П., Брюханова Г.Д., Грижебовский Г.М., Евченко Ю.М., Чумакова И.В., Григорьев М.П., Марчукова Л.Н., Мезенцев В.М. Обстановка по Крымской геморрагической лихорадке в Южном федеральном округе. *Журн. микробиол.* 2005, 1(Приложение): 5-12.
11. Смирнова С.Е. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка (этиология, эпидемиология, лабораторная диагностика). М., 2007.
12. Чумаков М.П. Новая вирусная клещевая болезнь — геморрагическая лихорадка в Крыму. Крымская геморрагическая лихорадка. Ставрополь, 1945.

Поступила 13.11.18

Контактная информация: Василенко Надежда Филипповна, д.б.н., проф., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-83

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ КАРБАПЕНЕМАЗОПРОДУЦИРУЮЩИХ KLEBSIELLA PNEUMONIAE В ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ

¹Гомельский государственный медицинский университет, ²Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Беларусь

Цель. В рамках программы микробиологического мониторинга изучить распространенность карбапенемазопродуцирующих *K. pneumoniae* в организациях здравоохранения Гомельской области и оценить уровень их устойчивости к антибактериальным препаратам. **Материалы и методы.** Для 91 клинического изолята *Klebsiella pneumoniae* с множественной антибиотикорезистентностью, выделенных в Гомеле и Гомельской области, выполнена детекция генов карбапенемаз методом ПЦР в реальном времени и определена чувствительность к антибактериальным препаратам. **Результаты.** Выявлено 68 продуцентов карбапенемаз: KPC — 1 изолят, OXA-48 — 47 изолятов, NDM — 20 изолятов. Продуценты карбапенемаз обнаружены в 11 организациях здравоохранения Гомеля и 8 центральных районных больницах районных центров Гомельской области. Все они имели ассоциированную устойчивость к большинству антибиотиков и сохраняли чувствительность к колистину (91,2% чувствительных изолятов) и тигециклину (98,5%). **Заключение.** Распространение карбапенемазопродуцирующих изолятов *K. pneumoniae* в организациях здравоохранения значительно затрудняет проведение эффективной антибиотикотерапии пациентам и требует внедрения адекватных мер инфекционного контроля, направленных на ограничение их циркуляции в госпитальной среде.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 53—58

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, карбапенемазы, антибиотикорезистентность, меропенем, колистин

Д.В.Танальский¹, Т.А.Петровская^{1,2}, Н.А.Бонда², А.И.Козлова¹, О.В.Осипкина¹

PREVALENCE OF CARBAPENEMASE-PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IN THE GOMEL REGION

¹Gomel State Medical University, ²Gomel Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Belarus

Aim. Within the microbiological monitoring program, to study the prevalence of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in the healthcare organizations of the Gomel region and assess their level of resistance to antibacterial drugs. **Materials and methods.** For 91 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with multiple antibiotic resistance, isolated in Gomel and Gomel region, carbapenemase genes were detected by real-time PCR and sensitivity to antibacterial drugs was determined. **Results.** 68 carbapenemase producers were revealed: KPC — 1 isolate, OXA-48 — 47 isolates, NDM — 20 isolates. Carbapenemase producers were found in 11 Gomel health organizations and 8 central district hospitals of the regional centers of the Gomel region. All of them had an associated resistance to most antibiotics and retained sensitivity to colistin (91.2% sensitive isolates) and tigecycline (98.5%). **Conclusion.** The spread of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates in healthcare organizations makes it very difficult to conduct effective antibiotic therapy for patients and requires the introduction of appropriate infection control measures aimed at limiting their circulation in the hospital environment.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 53—58

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, carbapenemase, antibiotic resistance, meropenem, colistin

ВВЕДЕНИЕ

Для систем здравоохранения многих стран характерен рост частоты грамотрицательных инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). В опубликованном в 2017 г. Всемирной организацией здравоохранения «Глобальном

приоритетном списке антибиотикорезистентных бактерий для научных исследований и разработки новых антибиотиков» три верхние строки (критический уровень приоритета) занимают карбапенеморезистентные *Acinetobacter baumannii*, карбапенеморезистентные *Pseudomonas aeruginosa* и устойчивые к цефалоспорином III поколения карбапенеморезистентные представители семейства *Enterobacteriaceae* (главным образом *Klebsiella pneumoniae*). В качестве критериев приоритетности для включения в данный список послужили летальность, нагрузка на систему здравоохранения, распространенность антибиотикорезистентности и ее 10-летняя динамика, а также имеющиеся возможности для антибиотикотерапии [9].

Формирование устойчивости к карбапенемам у грамотрицательных бактерий связано с различными механизмами, включающими изменение проницаемости клеточной стенки из-за возникновения дефектов пориновых каналов и активацию систем эффлюкса, однако наибольшее клиническое и эпидемиологическое значение имеет продукция карбапенемаз. Наиболее распространенными среди типами карбапенемаз являются КРС, ОХА-48, а также металло- β -лактамазы (МБЛ) NDM и VIM. Опасность данных ферментов связана с их высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающим практически все классы β -лактамовых антибиотиков, в том числе ингибиторзащищенные [5]. Гены карбапенемаз часто сцеплены с другими детерминантами антибиотикорезистентности и включены в состав интегронов, локализованных в плазидах или транспозонах, которыми грамотрицательные бактерии могут достаточно легко обмениваться в процессе горизонтального переноса. В результате приобретения генов карбапенемаз нередко формируются отдельные клоны высокого риска с экстремальной антибиотикорезистентностью (XDR), способные стремительно распространяться на обширных территориях и вызывать серьезные инфекции, трудно поддающиеся терапии [12]. Детекция карбапенемаз у грамотрицательных бактерий важна как для назначения оптимальной этиотропной терапии пациенту, так и для эпидемиологического контроля распространения резистентных штаммов и разработки мероприятий инфекционного контроля [7,8].

Выявление продукции карбапенемаз, а также кодирующих их генов у возбудителей ИСМП являлось важной задачей нескольких многоцентровых эпидемиологических исследований. В рамках Европейской сети наблюдения за карбапенемазопродуцирующими энтеробактериями EuSCAPE в 2013—2014 гг. в 36 странах-участниках выявлен 2301 изолят *K.pneumoniae*, продуцирующий карбапенемазы КРС, NDM, ОХА-48, VIM [4]. По данным исследования МАРАФОН, выполненного в 2013—2014 гг. в 35 стационарах 22 городов России, продукция карбапенемаз (ОХА-48, NDM, КРС, ко-продукция ОХА-48 + NDM) выявлена у 14,5% изолятов *K.pneumoniae* [2]. Ресурс AMRmap (онлайн-платформа анализа данных резистентности к антимикробным препаратам) содержит 901 запись о карбапенемазопродуцирующих изолятах *K.pneumoniae*, выделенных в 2011—2018 гг. в 26 городах Российской Федерации [1]. В многоцентровом исследовании, выполненном в Беларуси в 2013—2014 гг., среди карбапенемонечувствительных изолятов *K.pneumoniae* выявлено 13 продуцентов МБЛ NDM и 17 продуцентов ОХА-48, при этом большая часть продуцентов карбапенемаз (76,7%) была выделена от пациентов, госпитализированных в отделения реанимации и интенсивной терапии [3].

Особенностью большинства ранее проведенных скрининговых исследований являлось преимущественное изучение карбапенеморезистентных штаммов энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих бактерий, выделенных от госпитализированных пациентов крупных многопрофильных клиник либо специализированных медицинских центров с обширным коечным фондом. Отдельного внимания заслуживает потенциальная возможность заноса карбапенемазопродуци-

рующих энтеробактерий в многочисленные стационары районного уровня — центральные районные больницы (ЦРБ), а также вероятность выявления этих штаммов у амбулаторных пациентов.

Цель исследования — в рамках программы микробиологического мониторинга изучить распространенность карбапенемазопродуцирующих изолятов *K.pneumoniae* в организациях здравоохранения Гомельской области и оценить уровень их устойчивости к антибактериальным препаратам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе микробиологической лаборатории Гомельского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (ГОЦГЭиОЗ) организована система микробиологического мониторинга, направленная на выявление и типирование множественно-антибиотикорезистентных (MDR) и экстремально-антибиотикорезистентных (XDR) грамотрицательных бактерий, выделяемых от пациентов в Гомеле и 20 районных центрах Гомельской области. На протяжении 2-летнего периода (с июня 2016 г. по май 2018 г.) локальными микробиологическими лабораториями 17 районных и зональных центров гигиены и эпидемиологии Гомельской области было отобрано и направлено в микробиологическую лабораторию ГОЦГЭиОЗ 36 неповторяющихся клинических изолятов *K.pneumoniae*, не чувствительных (устойчивых или умеренно устойчивых) к меропенему или имипенему. Дополнительно в исследование включено 55 карбапенемонечувствительных изолятов *K.pneumoniae*, выделенных за аналогичный период от госпитализированных и амбулаторных пациентов в 12 организациях здравоохранения Гомеля. Все изоляты были выделены в диагностически значимых количествах из различных видов клинического материала — мокроты, раневого отделяемого, экссудатов, крови, интраоперационного материала, мочи. Реидентификация микроорганизмов и определение их чувствительности к антибиотикам выполнены автоматизированным методом на микробиологических анализаторах VITEK 2 Compact (bioMérieux). Детекция генов карбапенемаз bla_{KPC} , bla_{OXA-48} , bla_{VIM} , bla_{IMP} , bla_{NDM} выполнена методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием диагностических наборов АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL и АмплиСенс MDR MBL-FL (Центральный НИИ эпидемиологии, Москва) на амплификаторе RotorGene 3000 (Corbett Research, Австралия). Штаммы *K.pneumoniae* и *P.aeruginosa* из коллекции НИИ антимикробной химиотерапии (Смоленск, Россия), продуцирующие известные карбапенемазы перечисленных типов, были использованы в качестве положительного контроля. Для изолятов с выявленной продукцией карбапенемаз дополнительно определены минимальные подавляющие концентрации (МПК) колистина методом последовательных микро-разведений в бульоне Мюллера-Хинтона (BD, США) в соответствии с ISO 20776-1:2006 [6]. При учете и интерпретации результатов руководствовались стандартами EUCAST [10]. Качество исследований контролировали штаммами *Escherichia coli* ATCC 25922 и *P.aeruginosa* ATCC 27853.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие генов карбапенемаз выявлено у 68 изолятов *K.pneumoniae*, выделенных в 11 организациях здравоохранения Гомеля и 8 ЦРБ (табл.). Ввиду недоступности более адекватных знаменателей (суммарного количества госпитализаций либо суммарного количества койко-дней в организациях здравоохранения) инцидентность была рассчитана как количество случаев выявления карбапенемазопродуцирующих штаммов *K.pneumoniae* на 100 тысяч населения в год. Всего выявлено 47 продуцентов OXA-40-подобных карбапенемаз, 20 продуцентов МБЛ NDM и 1 продуцент KPC.

Распространенность карбапенемазопродуцирующих *K.pneumoniae* в Гомельской области

Район	KPC	OXA-48	NDM	Всего	Население, тыс. чел.	Инцидентность, на 100 тыс. в год
Брагинский					11,9	0,0
Буда-Кошелёвский					29,6	0,0
Ветковский					17,8	0,0
Гомель		27	15	42	602,8	3,5
Добрушский		2		2	36,8	2,7
Ельский					15,2	0,0
Житковичский					35,7	0,0
Жлобинский	1	11	1	13	102,3	6,4
Калинковичский					59,6	0,0
Кормянский					13,4	0,0
Лельчицкий					23,9	0,0
Лоевский					11,9	0,0
Мозырский					133,6	0,0
Наровлянский					10,5	0,0
Октябрьский					13,5	0,0
Петриковский		1	1	2	27,2	3,7
Речицкий		1		1	98,3	0,5
Рогачевский			1	1	57,1	0,9
Светлогорский		2	2	4	84,2	2,4
Хойникский		2		2	19,2	5,2
Чечерский		1		1	14,4	3,5
Всего	1	47	20	68	1419,1	2,4

В 4 организациях здравоохранения Гомеля и 3 ЦРБ отмечена одновременная циркуляция продуцентов карбапенемаз 2 различных групп (OXA-40-подобных и NDM). В Жлобинской ЦРБ на протяжении 2-летнего периода были выделены *K.pneumoniae* — продуценты карбапенемаз OXA-48 (11 изолятов), KPC и NDM (по одному изоляту). У госпитализированных пациентов продуценты карбапенемаз были выделены из раневого отделяемого и интраоперационного материала — 45,5% изолятов, материалов из дыхательной системы (мокроты, браш-биоптатов) — 39,4%, мочи — 9,1%. Из крови было выделено 4 изолята (6,1%), среди них 2 продуцента карбапенемазы OXA-48 и 2 продуцента МБЛ NDM. От пациентов реанимации и интенсивной терапии выделено 56,1% продуцентов карбапенемаз, от пациентов отделений хирургического профиля — 33,3%, ожогового отделения — 6,1%, отделений терапевтического профиля — 4,5%.

Карбапенемазопродуцирующие *K.pneumoniae* были устойчивы к цефалоспорином III-IV поколений, меропенему, имипенему, амикацину, левофлоксацину, моксифлоксацину. Сохраняли чувствительность к тетрациклину 45 изолятов (66,2%), к тигециклину — 67 изолятов (98,5%), к фосфомицину — 18 изолятов (26,5%). Поскольку определение чувствительности к колистину с помощью автоматизированных систем не позволяет получать надежные результаты [11], для получения истинных значений МПК дополнительно использован метод последовательных микроразведений.

Чувствительными к колистину (МПК 0,125—2,0 мкг/мл) были 62 изолята (91,2%). Вместе с тем, выявлен 1 изолят *K.pneumoniae*, продуцирующий МБЛ NDM и имеющий МПК колистина 32 мкг/мл (значение МПК в 8 раз превышает рекомендованную EUCAST пороговую концентрацию), а также устойчивый ко всем другим включенным в исследование антибактериальным препаратам.

Наиболее распространенными карбапенемазами *K.pneumoniae* в настоящем исследовании явились ОХА-48 (69,1% от всех карбапенемазопродуцирующих штаммов) и NDM (29,4%), что сопоставимо с результатами российского многоцентрового исследования МАРАФОН [2]. Вместе с тем, выявлен только 1 продуцент карбапенемазы КРС (1,5%), широко распространенной в странах Европейского союза (присутствовала у 44,6% карбапенемазопродуцирующих штаммов в исследовании EuSCAPE) [4]. Впервые показана продукция карбапенемаз нозокомиальными штаммами *K.pneumoniae*, выделенными у пациентов, госпитализированных в ЦРБ районных центров с численностью населения 15—30 тыс. человек (Петриковский, Хойникский, Чечерский). В указанных ЦРБ всего было выделено 5 карбапенемазопродуцирующих изолятов *K.pneumoniae*, все — из мокроты пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии.

Заслуживают внимания факты выделения карбапенемазопродуцирующих штаммов *K.pneumoniae* от пациентов амбулаторно-поликлинических учреждений Гомеля. Так, изолят *K.pneumoniae* с продукцией МБЛ NDM был выделен из мочи 60-летнего амбулаторного пациента с острым циститом, еще 1 NDM-продуцирующий изолят выделен из раневого отделяемого 58-летней пациентки со свищем передней брюшной стенки. В обоих случаях отсутствовали указания о предшествующих госпитализациях пациентов.

Ранее было показано, что отдельные продуценты карбапенемаз могут иметь значения МПК ниже рекомендованных EUCAST пороговых значений и формально сохранять чувствительность. Так, в многоцентровом исследовании МАРАФОН из 130 карбапенемазопродуцирующих госпитальных изолятов энтеробактерий сохраняли чувствительность к имипенему и меропенему соответственно 34,6% и 35,6% изолятов (МПК 0,125—2,0 мкг/мл) [2]. Отсутствие карбапенемочувствительных изолятов среди продуцентов карбапенемаз в настоящем исследовании объясняется преселекцией на этапе включения (критерием отбора для выполнения ПЦР-детекции генов карбапенемаз являлась устойчивость или умеренная устойчивость к карбапенемам).

Полученные данные свидетельствуют о том, что изоляты *K.pneumoniae*, несущие гены карбапенемаз ОХА-48 и NDM, широко распространены в организациях здравоохранения Гомельской области. Настораживает факт обнаружения инфекций, вызванных карбапенемазопродуцирующими штаммами, в небольших организациях здравоохранения, расположенных в районных центрах с численностью населения менее 30 тыс. человек, а также выделение карбапенемазопродуцирующих штаммов у амбулаторных пациентов. Показана приемлемая микробиологическая активность тигециклина и колистина в отношении *K.pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз, отмечено появление отдельных штаммов, устойчивых ко всем антибиотикам. Требуется внедрение адекватных мер инфекционного контроля, направленных на сдерживание распространения карбапенемазопродуцирующих микроорганизмов в госпитальной среде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017, 19 (2): 84-90.
2. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013—2014. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017, 19 (2): 49-56.
3. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Евсеенко Е.О., Савельева А.К., Козловская И.В., Козик А.П., Левшина Н.Н., Осипкина О.В., Соловей Н.В., Карпов И.А. Металло-бета-лактамазы и кар-

- бапенмазы экстремально-антибиотикорезистентных энтеробактерий: распространение в Беларуси. *Здравоохранение*. 2017, 3: 40-47.
- Grundmann H., Glasner C., Albiger B. et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect. Dis.* 2017, 17 (2): 153-163.
 - Gupta N., Limbago B.M., Patel J.B., Kallen A.J. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin. Infect. Dis.* 2011, 53 (1): 60-67.
 - ISO 20776-1:2006 «Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices» — Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.
 - Magiorakos A.P., Burns K., Rodriguez Bano J. et al. Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae into healthcare settings: guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2017; 6: 113.
 - Nordmann P., Naas T., Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, 17 (10): 1791-1798.
 - Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 2018, 18 (3): 318-327.
 - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>.
 - Vasoo S. Susceptibility testing for the polymyxins: two steps back, three steps forward? *J. Clin. Microbiol.* 2017, 55 (9): 2573-2582.
 - Woodford N., Turtton J.F., Livermore D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011, 35 (5): 736-755.

Поступила 04.03.19

Контактная информация: Тапальский Дмитрий Викторович, к.м.н.,
Беларусь, 246050, Гомель, ул. Ланге, 5, р.т. 375 29 7354293

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

С.В.Святченко, А.Г.Дурьманов, Н.П.Колосова, А.С.Гудымо, Н.И.Гончарова, П.Ю.Торжкова, Ю.А.Буланович, А.В.Епанчинцева, А.В.Даниленко, В.Ю.Марченко, А.В.Сысоева, И.М.Суслопаров, Т.В.Трегубчак, А.Б.Рыжиков, Р.А.Максютов, Т.Н.Ильичева

ТЯЖЕЛЫЕ СЛУЧАИ ЗАБОЛЕВАНИЯ ГРИППОМ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2017-2018

ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область

Цель. Оценка популяционного иммунитета к гриппу накануне эпидемического сезона 2017-2018 и характеристика вирусов гриппа, выделенных в данном сезоне от людей с тяжелым течением заболевания и от лиц, привитых осенью 2017. *Материалы и методы.* Исследование сывороток крови в реакции торможения гемагглютинации. Выделение изолятов вирусов гриппа. Их антигенный и генетический анализ. *Результаты.* Накануне эпидемического сезона от 33 до 47% сывороток крови, собранных в разных регионах РФ, имели защитные титры антител к вакцинным сезонным штаммам вируса гриппа А. К вирусу В/Victoria защитные титры имели 24-30% обследуемых. В эпидемическом сезоне 2017-2018 нами выделено 87 изолятов вирусов гриппа А и В. Штаммы А(H1N1)pdm09 вошли в кладу 6В.1, штаммы В/Yamagata — в кладу 3, а штаммы В/Victoria — в кладу 1А; по антигенным свойствам они не отличались от вакцинных штаммов соответствующих подтипов. Изоляты А(H3N2) отнесены к кладе 3С.2а, антигенная характеристика которой затруднена. Выявлен один штамм А(H1N1)pdm09 с аминокислотной заменой N275Y в нейраминидазе, резистентный к осельтамивиру. Все остальные штаммы были чувствительны

к ингибиторам нейраминидазы. *Заключение.* Иммунизация от гриппа вакциной эффективной против циркулирующих штаммов и лечение антинейраминидазными препаратами при первых клинических проявлениях заболевания являются эффективными средствами защиты населения.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 58—64

Ключевые слова: популяционный иммунитет, сезонные вирусы гриппа, антигенная и генетическая характеристика, чувствительность к ингибиторам нейраминидазы

S.V.Svyatchenko, A.G.Durymanov, N.P.Kolosova, A.S.Gudymo, N.I.Goncharova, P.Yu.Torzhkova, Yu.A. Bulanovich, A.V.Epanchintseva, A.V.Danilenko, V.Yu.Marchenko, A.V.Syssoeva, I.M.Susloparov, T.V.Tregubchak, A.B.Ryzhikov, R.A.Maksyutov, T.N.Ilicheva

SEVERE CASES OF SEASONAL INFLUENZA IN RUSSIA IN 2017-2018

State Research Center of Virology and Biotechnology «VECTOR», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Aim. Evaluation of herd immunity prior to the 2017-2018 influenza season, and characterization of influenza viruses isolated from severe or fatal influenza cases and from influenza cases in people vaccinated in the fall of 2017. *Materials and methods.* Evaluation of herd immunity in hemagglutination inhibition assay. Isolation of influenza viruses. Antigenic and genetic analysis. *Results.* Prior to epidemic season 33-47% of blood sera samples collected on the territory of Russia showed presence of protective antibody titers against vaccine strains of influenza A, 24-30% of samples — against B/Victoria. During 2017-2018 epidemic season 87 influenza A and B viruses were isolated. A(H1N1)pdm09 strains belonged to clade 6B.1, B/Yamagata strains to clade 3, and B/Victoria strains to clade 1A; they were antigenically similar to corresponding vaccine strains. A(H3N2) viruses belonged to clade 3C.2a and were difficult to characterize antigenically. One strain of influenza virus A(H1N1)pdm09) was resistant to oseltamivir and had H275Y amino acid substitution in neuraminidase. All other isolates were susceptible to neuraminidase inhibitors. *Conclusion.* Influenza vaccination with vaccine effective against current circulating strains and treatment with neuraminidase inhibitor drugs at first manifestation of clinical signs of influenza disease are effective means of population protection against influenza.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 58—64

Key words: herd immunity, seasonal influenza viruses, antigenic and genetic characteristics, neuraminidase inhibitors susceptibility

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемический подъем заболеваемости гриппом в России начался на 6-7 неделях 2018 года, что существенно позже, чем обычно, и примерно на два месяца позже, чем в Западной Европе и США. В отличие от стран Запада эпидемический подъем заболеваемости был плавным, на протяжении всей эпидемии приблизительно в равных пропорциях у больных выявляли вирусы гриппа A(H1N1)pdm09, A(H3N2) и B. В целом эпидемический сезон 2017-2018 гг. в России характеризовался низкой заболеваемостью лиц, вакцинированных осенью 2017 г., и общей низкой летальностью [URL: <http://www.influenza.spb.ru/news/id394/>].

В ГНЦ ВБ «Вектор» более 10 лет проводится мониторинг гриппа с целью выявления новых вирусных вариантов, которые представляют опасность как возможные предшественники будущих пандемических штаммов. Для этого мы проводим анализ первичного материала и выделенных из него штаммов при всех подтвержденных тяжелых случаях гриппа, а также случаях заболевания вакцинированных лиц [4,5].

В связи с этим, целью настоящей работы была оценка популяционного иммунитета к вирусам гриппа накануне эпидемического сезона 2017-2018 гг., а также характеристика штаммов вирусов гриппа, выделенных из аутопсийного и клинического материала от людей с тяжелым течением заболевания и от лиц, вакцинированных осенью 2017 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В реакции торможения гемагглютинации (РТГА) использовались антигены, представляющие собой инактивированные β -пропиолактоном штаммы вирусов гриппа А и В, полученные из сотрудничающего центра Всемирной организации здравоохранения (СЦ ВОЗ) в Атланте (США): А/Michigan/45/2015 (H1N1pdm09), А/HongKong/4801/2014 (H3N2), В/Brisbane/60/2008 (линия Victoria), а также штамм А/Anhui/01/2013 (H7N9), полученный из СЦ ВОЗ, Гонконг, Китай, и выделенный нами штамм А/great crested grebe/Tuva/34/2016 (H5N8) [6].

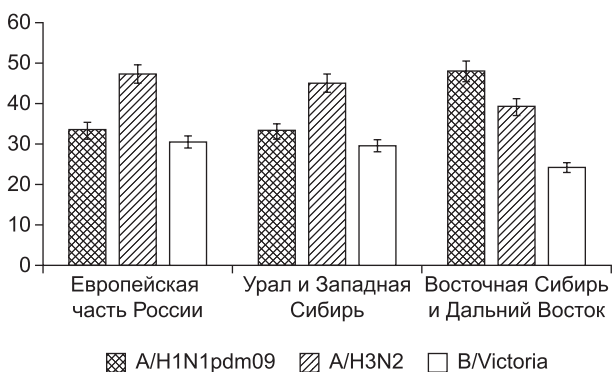
Сбор образцов крови от здоровых доноров, получение сывороток, транспортировку образцов в ГНЦ ВБ «Вектор», проведение РТГА осуществляли, как описано ранее [1].

Выделение штаммов вирусов гриппа А и В проводили из аутопсийного материала (фрагменты бронхов, трахеи, легких) от людей, умерших предположительно от гриппа, и клинического материала (мазки из носа и зева в транспортной среде) от лиц с тяжелым течением ОРВИ, а также от вакцинированных против гриппа накануне эпидемии. Первичный материал собирали и тестировали в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) сотрудники региональных Центров гигиены и эпидемиологии. Все положительные образцы поступали в ГНЦ ВБ «Вектор», полученный материал использовали для выделения изолятов в клеточной культуре МДСК путем заражения монослоя клеток [8]. Типирование выделенных изолятов вирусов гриппа А и В и изучение их антигенных свойств проводили в РТГА [8], используя постинфекционные хорьковые референс-сыворотки, предоставленные СЦ ВОЗ по гриппу (Атланта, США). Результаты типирования подтверждали методом ОТ-ПЦР с использованием наборов реагентов «РИБО-преп», «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» и «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL» (ЦНИИЭ, Москва). Секвенирование генов HA, NA и NS проводили по методу Сэнгера. Для нескольких штаммов были получены полногеномные нуклеотидные последовательности на платформе MiSeq, Illumina.

Тестирование чувствительности к ингибиторам нейраминидазы осельтамивиру и занамивиру проводили флуоресцентным методом [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки популяционного иммунитета к вирусам гриппа А и В было исследовано 1757 образцов сыворотки крови, собранных на территории РФ от здоровых доноров осенью 2017 г. Ни один из образцов даже в разведении 1:10 не реагировал в РТГА с антигенами А(H5N8) и А(H7N9). Более трети образцов, собранных в разных регионах России, имели значимые титры (1:40 и выше) в РТГА с вакцинными штаммами вируса



Доля (%) сывороток крови, собранных осенью 2017 г., имеющих значимые титры в РТГА с вакцинными штаммами вирусов гриппа типа А и В.

гриппа А подтипов H1N1pdm09 и H3N2 (рис.). Несколько ниже оказалась доля серопозитивных лиц в отношении вируса гриппа В генетической линии Виктория. Сравнение полученных результатов с данными серомониторинга накануне предыдущего эпидемиологического сезона [5] показало некоторое снижение уровня популяционного иммунитета у населения Европейской части РФ, Урала и Западной Сибири к вирусу гриппа А(H1N1)pdm09, в то время как доля серопозитивных лиц к вирусу

A(H3N2), напротив, увеличилась, что может быть связано с преобладанием в циркуляции в сезоне 2016-2017 штаммов подтипа H3N2.

В эпидемическом сезоне 2017-2018 г. в ГНЦ ВБ «Вектор» поступил аутопсийный и клинический материал из Центров гигиены и эпидемиологии 61 субъекта РФ. Всего было получено 983 первичных образца, положительных на наличие РНК вирусов гриппа А и В, в том числе 90 аутопсийных образцов, 757 образцов от пациентов с тяжелым течением заболевания и 136 образцов от пациентов, вакцинированных от гриппа осенью 2017 года (табл.).

Из первичного материала было выделено 60 штаммов вируса гриппа А (среди них 47 изолятов А(H1N1)pdm09 и 13 изолятов А(H3N2) и 27 штаммов вируса гриппа В, из которых 25 изолятов относились к генетической линии Yamagata и 2 к генетической линии Victoria. По антигенным свойствам все штаммы вируса гриппа А(H1N1)pdm09 были подобны вакцинному штамму А/Michigan/45/2015, штаммы вируса гриппа В/Yamagata подобны вакцинному штамму В/Phuket/3073/2013, а штаммы вируса гриппа В/Victoria — вакцинному штамму В/Brisbane/60/2008. Изоляты вируса гриппа А(H3N2) по культуральным свойствам были подобны штаммам, выделенным в предыдущем сезоне: агглютинация эритроцитов морской свинки появлялась только при повторном пассировании в культуре клеток MDCK, при этом лишь 7 из 13 изолятов были способны к гемагглютинации в присутствии 20 нМ осельтамивира [5]. Именно они были отобраны для анализа в РТГА. Для антигенной характеристики изолятов H3N2 была использована референсная сыворотка, полученная в СЦ ВОЗ (США) при иммунизации хорьков вакцинным штаммом А/Hong Kong/4801/2014, наработанным на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Обратные титры сыворотки в РТГА с изолятами H3N2 были ниже гомологичного титра в 8 раз. Подобное снижение сродства штаммов H3N2 к сывороткам, полученным на антиген эмбрионального происхождения, отмечается учеными во всем мире, при этом анализ вирусов с сывороткой, полученной на культуральный антиген, не выявляет у них значительных антигенных отличий от вакцинного штамма [3].

Нами была определена нуклеотидная последовательность генов гемагглютини-на 36 штаммов, проведен филогенетический анализ, по результатам которого вирусы гриппа А(H1N1)pdm09 от 13 случаев заболевания оказались в кладе 6В.1; 13 вирусов гриппа А(H3N2) в кладе 3С.2а (из них 7 — в подкладе 3С.2а1, 4 в подкладе 3С.2а2 и 2 в подкладе 3С.2а3); 2 штамма В/Victoria в кладе 1А и 8 вирусов В/Yamagata в кладе 3.

По результатам фенотипического исследования все выделенные изоляты вирусов гриппа А(H3N2) и В были чувствительны к действию антинейраминидазных препаратов осельтамивира и занамивира. Среди 47 проанализированных изолятов А(H1N1)pdm09 был выявлен лишь 1 штамм А/Samara/117868/2018, характеризовавшийся значительной резистентностью к действию осельтамивира, при этом его восприимчивость к занамивиру оставалась нормальной. Генетический анализ выявил наличие в нейраминидазе аминокислотной замены Н275У, ассоциируемой с резистентностью к осельтамивиру среди вирусов А(H1N1)pdm09.

Данные о пациентах с тяжелым течением гриппа в эпидемическом сезоне 2017-2018 гг.

Группа, пол	Летальные случаи	Тяжелые случаи с благоприятным исходом	Вакцинированные осенью 2017 г.
Пол			
М	60	266	49
Ж	30	438	72
Не известен	-	53	15
Возраст			
0-18	14	232	81
19-59	52	385	41
60 и старше	22	70	11
Не известно	2	70	3
Беременные	1	146	12
Вакцинированные	4	132	136
Всего	90	757	136

В отличие от 2015–2016 и 2016–2017 гг., когда в начале эпидемического периода в Северном полушарии в циркуляции преобладал один из подтипов вируса гриппа А (H1N1pdm09 и H3N2, соответственно), а вирусы гриппа В получали распространение в конце сезона, в 2017–2018 гг. с самого начала наблюдалась совместная циркуляция штаммов типа А и В. Для США было характерно значительное преобладание вирусов гриппа А (70%) над вирусами гриппа В (30%), при этом среди вирусов гриппа А 85% относились к подтипу H3N2 [3]. Для большинства же других стран Северного полушария было характерно сопоставимое распространение вирусов двух типов с небольшим перевесом в сторону гриппа А (Канада, 57%) или в сторону гриппа В (Европа, 56%). Разные страны в Европе характеризовались преобладанием одного из двух подтипов вируса гриппа А (в Великобритании — H3N2; во Франции, Германии, Италии -H1N1pdm09), но в целом по региону распространенность обоих подтипов была примерно равной. В Китае вирусы гриппа А и В приблизительно в равных пропорциях циркулировали с 46 недели 2017 г. по 11 неделю 2018 г. На пике эпидемии (2–4 недели 2018 г.) среди вирусов гриппа А существенно преобладали штаммы A(H1N1)pdm09 [7].

Подавляющее большинство вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, исследованных в Северной Америке и Европе, были антигенно сходны с вакцинным штаммом A/Michigan/45/2015 и входили в кладу 6В.1 [3].

Большинство штаммов А(H3N2), охарактеризованных в США, входили в кладу 3С.2а и были сходны антигенно с вакцинным штаммом A/Hong Kong/4801/2014, наработанном в культуре клеток. Однако лишь половина из этих штаммов оказалась сходной антигенно с вариантом вакцинного штамма, адаптированного к РКЭ и используемого в производстве вакцины, что может быть связано с возникновением аминокислотных замен в процессе адаптации. В результате иммунитет, формируемый у населения на адаптированный антиген, может обладать недостаточной протективностью по отношению к распространенным в природе штаммам. Подобные особенности антигенной характеристики были свойственны и вирусам H3N2 в Европе, где также преобладали представители клады 3С.2а. В эпидемическом сезоне 2018–2019 ВОЗ рекомендовала заменить H3N2-компонент вакцины на новый штамм A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016, который, будучи наработан на РКЭ, позволяет получать сыворотки, способные лучше, хотя и не вполне оптимально, реагировать со штаммами, преобладающими в циркуляции на сегодняшний день [3].

Во всех странах Северного полушария среди вирусов гриппа В преобладали штаммы генетической линии Yamagata (89–98%), которые относились к кладе 3 и были антигенно сходны с вакцинным штаммом В/Phuket/3073/2013.

Среди встречавшихся реже в США и Европе вирусов В/Victoria значительная доля (80% в США) имела делецию шести нуклеотидов в гене гемагглютинина. Впервые подобные штаммы были выявлены в эпидемическом сезоне 2016–2017. Они отличаются антигенно от вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008, в связи с чем их типичный представитель В/Colorado/06/2017 по рекомендации ВОЗ был включен в состав вакцины на сезон 2018–2019 [3].

В России в эпидемическом сезоне 2017–2018 не было доминирующего субтипа вируса: в течение всего периода практически в равной пропорции циркулировали штаммы А(H1N1)pdm09, А(H3N2) и В/Yamagata. Встречались единичные случаи заболевания вирусом В/Victoria, однако вариантов с делецией выявлено не было. Все выделенные нами изоляты А(H1N1)pdm09, В/Yamagata и В/Victoria были антигенно сходны с соответствующими вакцинными штаммами. Проанализированные в РТГА изоляты А(H3N2) отличались от вакцинного штамма А/Hong Kong/4801/2014, культивированного на РКЭ, что можно объяснить возникновением изменений в его антигенных свойствах в процессе адаптации.

Из проанализированных нами 87 изолятов вирусов гриппа А и В лишь один штамм, типированный как А(H1N1)pdm09, выделенный от летального случая забо-

левания гриппом, был резистентен к осельтамивиру, оставаясь при этом восприимчивым к занамивиру, и имел аминокислотную замену N275Y в нейраминидазе. Не известно, принимал ли заболевший осельтамивир. Резистентность может возникать как в результате селекции вирусной популяции у пациентов, принимающих антинейраминидазную терапию, так и в результате спонтанной мутации. Тем не менее, в эпидемическом сезоне 2017-2018 не более 1% проанализированных в Северном полушарии вирусов гриппа характеризовалось снижением чувствительности к ингибиторам нейраминидазы [3]. Данный класс препаратов по-прежнему является высокоэффективным и специфичным средством в лечении гриппа и рекомендуется к применению на раннем этапе развития заболевания.

В РФ накануне эпидемического сезона 2017-2018 были провакцинированы 67,4 млн человек, что составило 46,6% от численности населения страны. В группах риска доля привитых оказалась еще выше (89% работников медицинских учреждений, 85% работников образовательных учреждений, 70% студентов, 63% людей старше 60 лет) [URL: <http://www.influenza.spb.ru/news/id394/>]. В эпидемическом сезоне 2017-2018 к нам поступили пробы от 136 случаев заболевания гриппом среди вакцинированных осенью 2017 года, из них в 60% случаев заболевшие являлись детьми в возрасте до 18 лет. Эти данные можно отчасти объяснить предположением, в соответствии с которым защитные титры антител для детей должны быть существенно выше, чем для взрослых (1:110 по сравнению с 1:40) [2]. Принятие во внимание этой информации, вероятно, могло бы оптимизировать разработку гриппозной вакцины для данной возрастной группы.

Несомненно, массовая вакцинация населения снизила остроту эпидемии гриппа в России в сезоне 2017-2018 гг. Эпидемический подъем заболеваемости начался на 6-7 неделях 2018 года, в целом по стране эпидемия длилась 12 недель, но во многих субъектах она закончилась через 5-6 недель. Всего переболело 10,4 % населения. Удельный вес больных тяжелой острой респираторной инфекцией гриппозной этиологии, помещенных в отделение интенсивной терапии (2,3%), был меньше, чем в предыдущем сезоне (5,4%), и минимальным за последние 6 сезонов [URL: <http://www.influenza.spb.ru/news/id394/>].

В трехвалентной вакцине, рекомендованной ВОЗ к использованию в эпидемическом сезоне по гриппу 2018-2019, были заменены сразу 2 компонента: H3N2 (штамм A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 вместо штамма A/Hong Kong/4801/2014) и B/Victoria (штамм B/Colorado/06/2017 из новой подклады 1A.1 вместо штамма B/Brisbane/60/2008) [3]. Новый вариант вируса гриппа B/Victoria, имеющий делецию в гене гемагглютинаина, антигенно отличается от циркулировавших ранее штаммов. Данный вариант еще не получил распространения в России, в связи с чем иммунизация накануне следующего эпидемического сезона является в особенности актуальной.

Авторы выражают глубокую благодарность коллегам из Центров гигиены и эпидемиологии субъектов РФ за сбор и своевременную доставку первичных образцов в ГНЦ ВБ «Вектор». Работа выполнена в рамках тем государственного задания ГЗ-1/16 и ГЗ-2/18 (ГНЦ ВБ «Вектор»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шиповалов А.В., Дурьманов А.Г., Петрова О.В., Иванова Е.В., Епанчинцева А.В., Святченко С.В. Мальцев С.В., Марченко В.Ю., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б., Ильичева Т.Н. Анализ популяционного иммунитета к гриппу накануне эпидемических сезонов в 2014 г. и 2015 г. Журн. микробиол. 2017, 2: 53-60.
2. Black S., Nicolay U., Vesikari T. et al. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated trivalent influenza vaccines in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011, 30(12): 1081-1085.

3. Garten R., Blanton L., Elal A.I. et al. Update: influenza activity in the United States during the 2017-18 season and composition of the 2018-19 influenza vaccine. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2018, 67(22): 634-642.
4. Ilyicheva T., Durymanov A., Susloparov I. et al. Fatal cases of seasonal influenza in Russia in 2015-2016. *PLoS One.* 2016, 11(10): e0165332.
5. Ilyicheva T.N., Durymanov A.G., Svyatchenko S.V. et al. Humoral immunity to influenza in an at-risk population and severe influenza cases in Russia in 2016-2017. *Arch.Virol.* 2018. doi: 10.1007/s00705-018-3904-9.
6. Marchenko V.Y., Susloparov I.M., Komissarov A.B. et al. Reintroduction of highly pathogenic avian influenza A/H5N8 virus of clade 2.3.4.4. in Russia. *Arch. Virol.* 2017, 162(5): 1381-1385.
7. World Health Organization FluNet database. URL: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/en/.
8. World Health Organization surveillance network: Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: WHO Press, 2011.

Поступила 03.12.18

Контактная информация: Святченко Светлана Викторовна,
630559, Кольцово, Новосибирская область, р. т. (383)363-47-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Н.А.Контаров^{1,2}, И.В.Погарская², Н.В.Юминова²

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОВИРУСНЫМ ДЕЙСТВИЕМ, НА АКТИВНОСТЬ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА И ПРОЦЕСС ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА-ХОЗЯИНА

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

Цель. Изучение ингибирующего действия полиэлектролитов (ПЭ), обладающих противовирусным действием, в отношении нейраминидазы вируса гриппа. Определение типа и константы ингибирования. Изучение влияние полиэлектролитов на процесс окислительного фосфорилирования в митохондриях клеток организма-хозяина. *Материалы и методы.* В работе использовались очищенные штаммы вируса гриппа: А/ВЧП/Вейбридж (H₇N₇), А/Маллард Пенсильвания/10218/84 (H₃N₂), А/NI/BRG-14 (H₃N₁) с исходным инфекционным титром 4,5 lg ТЦД₅₀/мл. Растворы ПЭ полистиролсульфонат со степенью полимеризации 8 (ПСС-8) в концентрациях 0,5 — 4,0 мМ и полиаллиламин (6 кДа) ПАА (6 кДа) в концентрациях 0,5-4,0 мкМ. Для определения активности нейраминидазы вируса гриппа использовали штаммы вируса гриппа после удаления низкомолекулярных ингибиторов нейраминидазы диализом против бидистиллированной воды. Субстратом нейраминидазы являлся фетуин в конечных концентрациях от 0,052 до 1,2 мкМ для ПАА (6 кДа) и от 0,052 до 1,2 мМ для ПСС-8. В качестве количественных характеристик дыхания и фосфорилирования митохондрий использовали дыхательные коэффициенты по Ларди-Вельману (ДКл) и Чансу-Вильямсу (ДКч), а также отношение АДФ/О. Митохондрии выделяли из скелетных мышц. Определение дыхательных коэффициентов и отношения АДФ/О проводили полярографическим методом. *Результаты.* Выявлен неконкурентный тип ингибирования указанных ПЭ в отношении нейраминидазной активности вирусов гриппа с константами ингибирования $K_1 = 1,6 \pm 0,08$ мкМ для ПАА (6 кДа) и $K_1 = 1,7 \pm 0,085$ мМ для ПСС-8. Определены дыхательные коэффициенты и отношение АДФ/О в отсутствии и после добавления к митохондриям ПСС-8 и ПАА (6 кДа) в концентрациях 20 мМ и 10 мкМ, соответственно. Наблюдалось снижение дыхательных коэффициентов и отношения АДФ/О, что указывало на ингибирование ферментов электрон-транспортной цепи митохондрий. При концентрациях менее 20 мМ и 10 мкМ для ПСС-8 и ПАА (6 кДа) все показатели достоверно не менялись. *Заключение.* Неконкурентный механизм ингибирования нейраминидазной активности вирусов гриппа ПЭ объясняется кон-

формационными изменениями в молекулах фермента и/или фермент-субстратного комплекса и соответственно структурно-функциональными изменениями его вторичной структуры. При выходе за пределы диапазона нетоксических концентраций 20 мкМ для PSS-8 и 10 мМ для PAA (6 кДа) наблюдалось ингибирование ферментов дыхательной цепи митохондрий при сохранении противовирусного эффекта.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 64—68

Ключевые слова: неконкурентное ингибирование, нейраминидаза, вирус гриппа, константы ингибирования, митохондрии, дыхательные коэффициенты

N.A.Kontarov^{1,2}, I.V.Pogarskaya², N.V.Yuminova²

STUDY OF THE EFFECT OF POLYELECTROLYTES WITH ANTIVIRAL EFFECT ON THE ACTIVITY OF INFLUENZA VIRUS NEURAMINIDASE AND THE PROCESS OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN MITOCHONDRIAS OF CELLS HOST ORGANISM

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

Aim. Study of the inhibitory effect of polyelectrolytes with antiviral effect against influenza neuraminidase. Determination of the type and inhibition constant. The study of the effect of polyelectrolytes (PE) on the process of oxidative phosphorylation in the mitochondria of cells host organism. *Materials and methods.* Purified influenza virus strains were used: A/VPCH/Weybridge (H₇N₇), A/Mallard Pennsylvania/10218/84 (H₅N₂), A/NIBRG-14 (H₅N₁) with an initial infectious titer of 4,5 lgTCD₅₀/ml. PE solutions of polystyrene-sulfonate with a degree of polymerization of 8 (PSS-8) in concentrations of 0,5—4,0 mM and polyallylamine (6 kDa) PAA (6 kDa) in concentrations of 0,5—4,0 μM. To determine the activity of influenza neuraminidase, influenza virus strains were used after the removal of low molecular weight inhibitors of neuraminidase by dialysis against water. The neuraminidase substrate was fetuin at final concentrations of 0,052 to 1,2 μM for PAA (6 kDa) and from 0,052 to 1,2 mM for PSS-8. As quantitative characteristics of respiration and phosphorylation of mitochondria, respiratory coefficients according to Lardi-Velman and Chans-Williams, as well as the ratio of ADP/O were used. Mitochondria were isolated from skeletal muscle. The determination of respiratory coefficients and the ratio of ADP/O was determined by the polarographic method. *Results.* A noncompetitive type of inhibition of these PEs was detected in relation to the neuraminidase activity of influenza viruses with inhibition constants $K_i = 1,6 \pm 0,08 \mu\text{M}$ for PAA (6 kDa) and $K_i = 1,7 \pm 0,085 \text{ mM}$ for PSS-8. Respiratory coefficients and the ratio of ADP / O were determined in the absence and after addition of PSS-8 and PAA (6 kDa) to mitochondria at concentrations of 20 mM and 10 μM, respectively. A decrease in respiratory coefficients and an ADP/O ratio was observed, indicating an inhibition of the enzymes of the electron-transport chain of mitochondria. At concentrations of less than 20 mM and 10 μM for PSS-8 and PAA (6 kDa), all indicators did not significantly change. *Conclusion.* The non-competitive mechanism of inhibition of the neuraminidase activity of the influenza PE viruses is explained by the conformational changes in the molecules of the enzyme and/or enzyme-substrate complex and, accordingly, the structural and functional changes in its secondary structure. When going beyond the range of non-toxic concentrations of 20 mM for PSS-8 and 10 μM for PAA (6 kDa), inhibition of the mitochondrial respiratory chain enzymes was observed while maintaining the antiviral effect.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 64—68

Key words: noncompetitive inhibition, neuraminidase, influenza virus, inhibition constants, mitochondria, respiratory coefficients

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность современных вакцин ограничивается постоянно меняющимся антигенным разнообразием вируса гриппа. Поэтому при появлении нового штамма необходимо создание новой вакцины, что экономически невыгодно. В связи с этим, появление нового класса препаратов на основе ПЭ может решить данную проблему

за счет выраженного штамм неспецифического ингибирующего действия в отношении нейраминидазы вируса гриппа. К таким препаратам, обладающих вирусингибирующим действием, можно отнести полиэлектролиты (ПЭ): полистиролсульфонат со степенью полимеризации 8 (ПСС-8) и полиаллиламин с молекулярной массой 6 кДа (ПАА (6 кДа)). Для данных соединений было впервые выявлено повреждающее действие в отношении белков вируса гриппа гемагглютинина и нейраминидазы [1,4]. При этом механизм и кинетические характеристики ингибирования ПЭ нейраминидазы установлены не были. Однако использование данных препаратов может оказывать негативное влияние на клетку, в частности, на процессы окислительного фосфорилирования митохондрий с помощью ингибирования ферментов дыхательной цепи. В данной работе впервые определен неконкурентный тип ингибирования данными соединениями нейраминидазной активности вируса гриппа и рассчитаны константы ингибирования. Определены значения дыхательных коэффициентов и отношения АДФ/О для митохондрий клеток скелетных мышц, в которых может размножаться вирус гриппа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались очищенные штаммы вируса гриппа: А/ВЧП/Вейбридж (H₇N₇), А/Маллард Пенсильвания/10218/84 (H₃N₂), А/NIH/14 (H₃N₁) с исходным инфекционным титром 4,5 lg ТЦД₅₀/мл. Растворы ПЭ полистиролсульфонат со степенью полимеризации 8 в концентрациях 0,5 — 4,0 мМ и полиаллиламин (6 кДа) в концентрациях 0,5-4,0 мкМ.

Для определения активности нейраминидазы вируса гриппа использовали штаммы вируса гриппа после удаления низкомолекулярных ингибиторов нейраминидазы диализом против бидистиллированной воды. Субстратом нейраминидазы являлся фетуин («Sigma», США) в конечных концентрациях от 0,052 до 1,2 мкМ для ПАА (6 кДа) и от 0,052 до 1,2 мМ для ПСС-8. Для построения калибровочной кривой готовили ряд пробирок, содержащих от 5 до 40 мкг N-ацетилнейраминовой кислоты в 0,2 мл 0,2 М ФБР, рН = 6,0. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли 0,1 мл перйодатного реагента, тщательно перемешивали и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. К смеси добавляли 1,0 мл арсенитного реагента и перемешивали до тех пор, пока выпавший в осадок йод не растворится вновь. К смеси добавляли 2,5 мл тиобарбитуратного реагента, перемешивали и помещали на 15 мин в кипящую водяную баню. При этом смесь становилась темно-розовой, но при охлаждении бледнела. К смеси добавляли 4 мл бутанолового реагента (N-бутанол, содержащий 5% по объему концентрированной HCl) и интенсивно встряхивали, чтобы экстрагировать окрашенное вещество. Пробирки центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин в настольной центрифуге при комнатной температуре, отбирали водную (нижнюю) фазу и определяли на спектрофотометре Zenhit 200st (РФ) величину поглощения при длине волны 549 нм с соответствующим контролем [5].

Определение типа ингибирования нейраминидазной активности вируса гриппа ПЭ и расчет констант ингибирования проводили методом Диксона [3]. Митохондрии выделяли из скелетных мышц [2]. Значение дыхательного контроля по Ларди-Вильману выражали через отношение (ДКл)=V₃/V₂ [7]. Данный параметр часто называют коэффициентом усиления, поскольку он характеризует способность митохондрий отвечать на добавку АДФ ускорением своего дыхания и, следовательно, является как бы мерой сродства дыхательной цепи к этому нуклеотиду. Значение дыхательного (акцепторного) контроля по Чансу-Вильямсу выражали через отношение (ДКч)=V₃ /V₄ [6]. Эта величина является показателем интактности структур митохондрий и характеризует ингибирующий эффект наработанного АТФ на перенос электронов по дыхательной цепи: АДФ/О=количество АДФ(нмоль)/ΔО

(потребленному за время фосфорилирования кислорода). Этот показатель, как известно, характеризует энергоэффективность окисления субстратов митохондриями [2]. Все параметры определяли полярографическим методом с помощью электрода Кларка. В качестве субстратов дыхания митохондрий использовали сукцинат калия с конечной концентрацией в ячейке электрода Кларка 3 мМ, АДФ добавляли в конечной концентрации 200 мМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью определения типа ингибирования нейраминидазной активности ПСС-8 и ПАА (6 кДа) был использован метод Диксона. Исходя из анализа полученных результатов, был сделан вывод о неконкурентном типе ингибирования указанных ПЭ в отношении нейраминидазной активности вирусов гриппа (штамм H_5N_2) с константами ингибирования $K_i = 1,6 \pm 0,08$ мкМ для ПАА (6 кДа) и $K_i = 1,7 \pm 0,085$ мМ для ПСС-8. В данном случае неконкурентный механизм ингибирования нейраминидазной активности вирусов гриппа ПЭ объясняется конформационными изменениями в молекулах фермента и/или фермент-субстратного комплекса и соответственно структурно-функциональными изменениями его вторичной структуры. Следует отметить, что данный тип ингибирования нейраминидазной активности был характерен для двух использованных в работе штаммов вируса гриппа. Процесс ингибирования в данном случае связан с повреждающим действием ПСС-8 и ПАА (6 кДа) в отношении вторичных структур белковых молекул фермента. Важно отметить, что в случае неконкурентного ингибирования константы ингибирования являются также ингибирующими концентрациями, при которых активность фермента снижается в два раза, т.е. IC_{50} .

Следующим этапом работы было выяснение возможности ингибирования полиэлектролитами ферментов дыхательной цепи митохондрий клеток, в которых может размножаться вирус гриппа, так как наряду с ингибированием нейраминидазы может наблюдаться концентрационный эффект ингибирования и в отношении ферментов клеток организма хозяина, необходимых для нормального функционирования организма, в частности, осуществления процессов тканевого дыхания. С этой целью были определены основные количественные характеристики процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях, выделенных из скелетной мышцы, такие как дыхательные коэффициенты по Ларди-Вельману (ДКл) и Чансу-Вильямсу (ДКч), и показатель сопряжения дыхания и фосфорилирования АДФ/О после взаимодействия с ПСС-8 и ПАА (6 кДа) в концентрациях 20 мМ и 10 мкМ, находящихся на верхнем пределе диапазона нетоксических концентраций, определенным нами ранее [4]. Были получены следующие значения дыхательных коэффициентов и отношения для двух полиэлектролитов АДФ/О (табл. 1,2).

Следует отметить, что при концентрациях ПЭ от 0,5 до 20 мМ для ПСС-8 и от 0,5 до 10 мМ для ПАА (нетоксический диапазон концентраций для обоих ПЭ) снижения показателей окислительного фосфорилирования не происходило.

Регистрируемое снижение показателей, характеризующих сопряже-

Таблица 1. Дыхательные коэффициенты по Ларди-Вельману (ДКл) и Чансу-Вильямсу (ДКч) и показатель сопряжения дыхания и фосфорилирования АДФ/О митохондрий в отсутствии и после взаимодействия с ПСС-8 в концентрации 20 мМ (n=19, p<0,05)

Концентрация, мМ	ДКл	ДКч	АДФ/О
0	3,02±0,17	3,00±0,16	1,40±0,10
20	2,52±0,12	2,46±0,14	1,09±0,11

Таблица 2. Дыхательные коэффициенты по Ларди-Вельману (ДКл) и Чансу-Вильямсу (ДКч) и показатель сопряжения дыхания и фосфорилирования АДФ/О митохондрий в отсутствии и после взаимодействия с ПАА (6 кДа) в концентрации 10 мкМ (n=19, p<0,05)

Концентрация, мкМ	ДКл	ДКч	АДФ/О
0	3,04±0,18	3,01 ±0,16	1,52±0,12
10	2,55±0,12	2,44±0,17	1,10±0,12

ние процессов дыхания и фосфорилирования, позволяет говорить о наличии серьезных органических нарушений в дыхательной цепи митохондрий. Более выраженное снижение дыхательного коэффициента по Чансу-Вильямсу указывает, что ухудшение тканевого дыхания вызвано нарушением интактности мембран митохондрий, вызванное их взаимодействием с полиэлектrolитами. Таким образом, в отношении невирусных ферментов ингибирующие концентрации оказались достоверно выше. Вследствие чего, можно заключить, что диапазон концентраций от 0 до 19 мМ для ПСС-8 и от 0 до 9 мкМ для ПАА (6 кДа) является нетоксическим для организма, как было показано ранее, но с сохранением выраженного противовирусного эффекта, обусловленного ингибированием нейраминидазной активности вируса гриппа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артюшенко С.В., Контаров Н.А., Юминова Н.В., Зверев В.В., Контарова Е.О., Балаев Н.В. Влияние полиэлектrolитов на инфекционность вируса кори. Журн. микробиол. 2011, 4: 36-40.
2. Барковский Е.В., Бокуть С.Б., Бородинский А.Н. Современные проблемы биохимии. Минск, Вышэйша школа, 2013.
3. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., МГУ, 1976.
4. Контаров Н.А., Ермакова А.А., Гребенкина Н.С., Юминова Н.В., Зверев В.В. Изучение противовирусной активности полиэлектrolитов в отношении вируса гриппа. Вопросы вирусологии. 2015, 60 (4): 5-9.
5. Мейхи Б.В. Дж. Вирусология: Методы. М., Мир, 1988.
6. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. Kinetics of oxygen utilization. J. Biol. Chem. 1955, 1 (217): 383-393.
7. Lardy H.A., Wellman H. Oxidative phosphorylations; role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. J. Biol. Chem. 1952, 1(195): 215-224.

Поступила 07.03.19

Контактная информация: Контаров Николай Александрович, к.б.н.,
119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2, р.т. (499)246-99-01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

А.О.Смирнова^{1,2}, С.А.Барановская², М.М.Токарская², С.И.Елкина², Н.Е.Ястребова²

МОДЕЛИ ЗАВИСИМОСТИ КОЛИЧЕСТВА БИОМАССЫ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE И ЕГО КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И.Менделеева, ²НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова, Москва

Цель. Разработка полусинтетической питательной среды, обеспечивающей получение максимального количества капсульного полисахарида (КПС). *Материалы и методы.* В работе использовали штамм 521 S. pneumoniae серотипа 23F. Культивирование проводили в пробирках с 10 мл полусинтетической питательной среды определенного состава. Количество полисахарида в пробах определялось с помощью ракетного иммуноэлектрофореза. Построение моделей и сравнение влияния различных компонентов осуществлялось согласно методике, указанной в учебном пособии. Расчет коэффициентов уравнения и оценка адекватности самих уравнений проводился с применением пакетов RStudio версии 1.0.153. *Результаты.* В результате серии экспериментов были вычислены коэффициенты уравнений регрессии, оценена их значимость и построены модели зависимости продукции биомассы и КПС в зависимости от состава питательной среды. Для решения поставленной задачи был проведен эксперимент согласно методу Бокса-Уилсона. В качестве оптимизируемых параметров были выбраны концентрации пептона и глюкозы.

Величина шага ΔS_i в направлении увеличения градиента рассчитывалась, исходя из коэффициентов регрессионного уравнения. Одновременно с этим определялся точный характер зависимости. Оптимальные расчетные концентрации пептона и глюкозы, при которых образование КПС максимально, составляют 32,6 и 12,1 г/л соответственно. При этом прогноз выхода полисахарида составляет 239 мг/л. *Заключение.* С помощью метода дробного факторного эксперимента были получены модели зависимости количества биомассы *S. pneumoniae* и его капсульного полисахарида от состава питательной среды. Были найдены оптимальные концентрации компонентов среды, которые позволяют увеличить по сравнению со стандартной прописью уровень образования биомассы на 10%, а КПС — в 1,5 — 2 раза.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 68—72

Ключевые слова: пневмококк, биомасса, капсульный полисахарид, полнофакторный эксперимент, математическое прогнозирование, коэффициенты уравнений регрессии

A.O.Smirnova^{1,2}, *S.A.Baranovskaya*², *M.M.Tokarskaya*², *S.I.Elkina*², *N.E.Yastrebova*²

MODELS OF DEPENDENCE OF THE QUANTITY OF THE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* BIOMASS AND HIS CAPSULAR POLYSACCHARIDE FROM THE COMPOSITION OF THE FEEDING ENVIRONMENT

¹Mendeleev Russian University of Chemical Technology, ²Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. The development of a semi-synthetic nutrient medium that provides the maximum amount of capsular polysaccharide (CPS). *Materials and methods.* We used the strain 521 of *S. pneumoniae* serotype 23F. Cultivation was carried out in test tubes with 10 ml of polysynthetic nutrient medium of a specific composition. The amount of polysaccharide in the samples was determined using rocket immunoelectrophoresis. Building models and comparing the effects of various components was carried out according to the methodology specified in the tutorial. The calculation of the coefficients of the equation and the assessment of the adequacy of the equations themselves was carried out using RStudio version 1.0.153. *Results.* As a result of a series of experiments, the coefficients of the regression equations were calculated, their significance was evaluated, and models of dependence of biomass production and CPS were constructed depending on the composition of the nutrient medium. To solve the problem, an experiment was carried out according to the Box-Wilson method. The peptone and glucose concentrations were selected as optimized parameters. The step size ΔS_i in the increasing gradient direction was calculated based on the coefficients of the regression equation. At the same time, the exact nature of the dependence was determined. The optimal calculated concentrations of peptone and glucose, at which the formation of CPS is maximum, are 32.6 and 12.1 g/l, respectively. In this case, the forecast yield of the polysaccharide is 239 mg/l. *Conclusion.* Using the method of fractional factorial experiment, models of the dependence of the biomass amount of *S. pneumoniae* and its capsular polysaccharide on the composition of the nutrient medium were obtained. The optimal concentrations of the components of the medium were found, which make it possible to increase the level of biomass formation by 10% compared to the standard formulas, and the CPS — by 1.5—2 times.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 68—72

Key words: pneumococcus, biomass, capsular polysaccharide, full factorial experiment, mathematical prediction, coefficients of regression equations

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается постоянный рост числа случаев внебольничной пневмонии, 30—50% которых вызваны *Streptococcus pneumoniae*. Основной проблемой лечения является формирование устойчивости пневмококка ко многим классам антибиотиков, что влечет за собой значительное снижение эффективности лечебных мероприятий [2]. По этой причине, особую актуальность приобретает вакцинация в качестве методики борьбы с такими заболеваниями. Так как основной стадией производства вакцины является получение капсульного полисахарида, важно подобрать оптимальные условия культивирования штаммов-продуцентов *S. pneumoniae*.

Целью данного исследования явилась разработка полусинтетической питательной среды, обеспечивающей получение максимального количества капсульного полисахарида (КПС). Поскольку эмпирический подбор концентраций каждого компонента является трудоемким процессом, мы прибегнули к методам математического прогнозирования. Для этого была оценена степень их влияния на количество биомассы и КПС после суточного культивирования *S. pneumoniae*, путем проведения ряда опытов по плану полнофакторного эксперимента (ПФЭ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была выбрана культура *S. pneumoniae* серотипа 23F шт. 521. Штамм выделен в естественных условиях из трахеального аспирата детей с заболеванием органов дыхания в лаборатории микробиологии НЦЗД РФ.

В качестве минерально-солевой основы для питательной среды использовалась пропись Ледерберга (на 1 л среды): 7 г K_2HPO_4 ; 3 г KH_2PO_4 ; 0,1 г $MgSO_4$; 1 г $(NH_4)_2SO_4$; 6 г NaCl [4]. «Нулевые» концентрации для соевого пептона и глюкозы составляли 20 г/л и 12,5 г/л соответственно. Дополнительно вносилась смесь витаминов, содержащая 1,6 мг рибофлавина мононуклеотида; 1,6 мг никотиновой кислоты; 8 мг тиамин хлорида; 8 мг пиридоксина.

Культивирование проводили в пробирках с 10 мл полисинтетической питательной среды определенного состава. Выращивание проходило при температуре 37°C в атмосфере с повышенным содержанием углекислого газа (5%) в течение 24 часов.

Оптическую плотность (ОП) проб определяли на фотоэлектрокалориметре при длине волны 530 нм. Количество полисахарида в пробах определялось с помощью ракетного иммуноэлектрофореза [3]. Построение моделей и сравнение влияния различных компонентов осуществлялось согласно методике, указанной в учебном пособии [1]. Расчет коэффициентов уравнения и оценка адекватности самих уравнений проводился с применением пакетов RStudio версии 1.0.153.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, необходимые для построения модели и сравнения степени влияния различных компонентов, были получены в ходе проведения дробного факторного эксперимента, разбитого на два ПФЭ. В первой серии опытов варьировались концентрации пептона и глюкозы на двух уровнях: 10 и 30 г/л для пептона, 5 и 20 г/л для глюкозы. Дополнительно исследовался рост пневмококка при пептоне в концентрации 20 г/л, но при полном отсутствии глюкозы. Затем исследовалось изменение количества биомассы и КПС в зависимости от наличия или отсутствия холина (50 мг/л) и витаминов в среде. Все варианты концентраций компонентов представлены в табл.

Матрица опытов для построения регрессионной модели

№ опыта	№ варианта	Наименование факторов (концентраций компонентов среды)			
		x_1 , соевый пептон, г/л	x_2 , глюкоза, г/л	x_3 , холин, мг/л	x_4 , витамины, мл/л
1	1	(+) 30	(+) 20	0	0,8
	2	(+) 30	(-) 5	0	0,8
	3	(-) 10	(+) 20	0	0,8
	4	(-) 10	(-) 5	0	0,8
	5	20	0	0	0,8
2	6	20	12,5	(+) 50	(+) 0,8
	7	20	12,5	(+) 50	(-) 0
	8	20	12,5	(-) 0	(+) 0,8
	9	20	12,5	(-) 0	(-) 0

Так как количество микроорганизмов может различаться и, следовательно, ОП посевной культуры варьироваться, для построения адекватных моделей в качестве выходных переменных были выбраны натуральный логарифм отношения оптической плотности суточной культуры и в момент посева $\ln(N/N_0)$ и скорректированное количество полисахарида с учетом заданной начальной ОП, равной 0,2 ($P \cdot 0,2 / y_{нач}$). Этот выбор обусловлен линейной зависимостью ОП от концентрации биомассы и равной вероятностью деления каждой клетки во время процесса культивирования.

В результате серии экспериментов были вычислены коэффициенты уравнений регрессии, оценена их значимость и построены модели зависимости продукции биомассы и КПС в зависимости от состава питательной среды. Адекватность коэффициентов была оценена с помощью критерия Стьюдента t ($p = 0,05$ при $\alpha = 0,95$), а полученных уравнений — по критерию Фишера F .

Отмечено, что количество биомассы и КПС в разной степени зависели от питательных веществ. Холин и витамины существенно повышали рост пневмококка. Предположительно, они не влияли на полисахарид, поскольку, согласно тесту Стьюдента для нескольких независимых выборок, средние значения выборок равны. Глюкоза менее значима, чем пептон, поскольку пневмококк хорошо рос в среде с пониженным ее содержанием. Однако полное отсутствие глюкозы существенно ухудшало рост, то есть ей нельзя пренебрегать при подготовке питательной среды. Выход КПС зависел только от начального содержания пептона, причем полиномиальная зависимость второй степени более точно описывала экспериментальные данные по сравнению с линейной.

Для решения поставленной задачи, а именно нахождения состава оптимальной питательной среды для пневмококка, был проведен эксперимент согласно методу Бокса-Уилсона [1]. В качестве оптимизируемых параметров были выбраны концентрации пептона и глюкозы. Величина шага ΔS_i в направлении увеличения градиента рассчитывалась, исходя из коэффициентов регрессионного уравнения. Одновременно с этим определялся точный характер зависимости.

Исходя из полученного значения шага, проводилось культивирование на пяти питательных средах с соответствующими концентрациями пептона и глюкозы. Солевой состав аналогичен предыдущим средам.

Данные опыта по уточнению зависимости образования продуктов при увеличении концентраций пептона и глюкозы по градиенту говорят о том, что в действительности обе зависимости не являются линейными и имеют максимумы в промежутке концентраций 26 — 32 г/л для пептона и 13,54 — 14,6 г/л для глюкозы. При более высоком содержании этих компонентов, предположительно, происходит ингибирование роста. Поэтому согласно результатам были построены новые модели, представляющие собой полиномы второй степени, которые более точно описывали экспериментальные данные. Зависимости прироста биомассы и образования КПС представлены на рис. 1 и 2 соответственно.

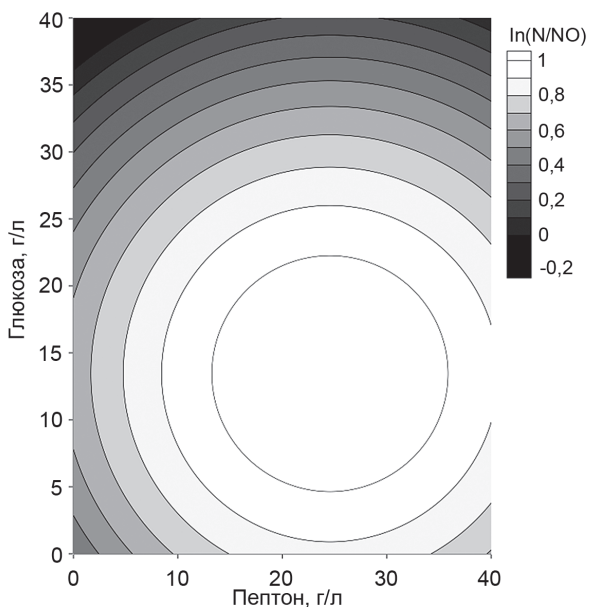


Рис. 1. Поверхность функции отклика $\ln(N/N_0)$ от концентрации пептона и глюкозы

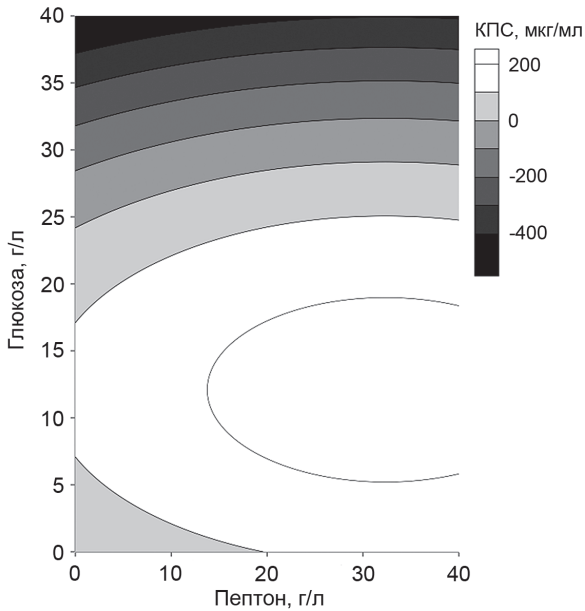


Рис. 2. Поверхность функции отклика количества КПС от концентрации пептона и глюкозы

Таким образом, с помощью метода дробного факторного эксперимента были получены модели зависимости количества биомассы *S. pneumoniae* и его капсульного полисахарида от состава питательной среды. Были найдены оптимальные концентрации компонентов среды, которые позволяют увеличить по сравнению со стандартной прописью уровень образования биомассы на 10%, а КПС — в 1,5 — 2 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бирюков В.В., Галицкая Л.И., Кантере В.М. Основы промышленной биотехнологии. М., Колос, 2004.
2. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Тюрин И.Е., Рачина С.А. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2013, 2(3): 91-123.
3. Laurell C.B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Analytical Biochemistry. 1966, 1(15): 45-52.
4. Lederberg J. Isolation and characterization of biochemical mutants of bacteria. Methods Med. Res. 1950, 195(3): 5-22.

Поступила 17.10.18

Контактная информация: Ястребова Наталия Евгеньевна, д.м.н., 105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-07-41

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ ОБЪЕКТОВ ВНУТРИБОЛЬНИЧНОЙ СРЕДЫ

¹Национальный медико-хирургический центр им. Н.И.Пирогова, ²Национальный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф.Гамалеи, ³Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

Цель. Провести сравнительный анализ эффективности использования бактериологических и молекулярно-биологических методов исследования с целью оценки микробной обсемененности объектов внутрибольничной среды как факторов передачи микроорганизмов. *Материалы и методы.* Проведено комплексное лабораторное обследование объектов внутрибольничной среды хирургических, реанимационных, гематологических отделений крупной многопрофильной клиники в течение 2017 г., в ходе которого отобрано 215 проб. *Результаты.* Микробная обсемененность объектов внутрибольничной среды составила 54,0% при проведении бактериологического исследования и 80,0% — при проведении молекулярно-биологического исследования. Между частотой бактериологического выделения микроорганизмов и определением ДНК возбудителей в различных отделениях стационара выявлена сильная прямая корреляционная связь ($r=0,92$). Совпадение результатов при двух методах исследования в большинстве случаев отмечено при высоких значениях числа копий ДНК (800-10000). При молекулярно-биологическом методе диагностики в 1,9 раза чаще выявлялся ген резистентности (*mec A*) у золотистого стафилококка и в 19,4±7,2% смывов обнаружены гены металло-бета-лактамаз (MBL) у основных грамотрицательных возбудителей. *Заключение.* Использование молекулярно-биологических методов диагностики позволяет значительно чаще обнаруживать микроорганизмы на объектах внутрибольничной среды.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 73—78

Ключевые слова: инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи; бактериологические и молекулярно-биологические методы диагностики, микроорганизмы, объекты внутрибольничной среды

О.А.Orlova^{1, 2, 3}, Т.А.Semenenko², V.G.Akimkin³

COMPARATIVE ANALYSIS OF EFFICIENCY OF BACTERIOLOGICAL AND MOLECULAR-BIOLOGICAL METHODS FOR THE ASSESSMENT OF MICROBIAL CONTAMINATION OF HOSPITAL ENVIRONMENT OBJECTS

¹Pirogov National Medical and Surgical Center, ²Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, ³Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Aim. To conduct a comparative analysis of bacteriological and molecular biological research methods to assess the microbial contamination of objects of hospital environment as factors of microbial transmission. *Materials and methods.* A comprehensive laboratory investigation of nosocomial environment of surgical, intensive care, hematology divisions of a large multi-disciplinary clinic during 2017 was carried out, while 215 samples were selected. *Results.* Microbial contamination of hospital environment facilities accounted for 54,0% when carrying out bacteriological tests and 80,0% — in conducting molecular biological studies. Between the frequency of bacteriological isolation of microorganisms and the determination of DNA of pathogens in different departments of the hospital, a strong direct correlation was revealed ($r=0.92$). The coincidence of the results of the two methods of research in most cases was observed at high values of the number of DNA copies (800-10000). The molecular biological method of diagnosis revealed the Methicillin-resistant Staphylococcus 1.9 times more often and in 19,4±7,2% of swabs detected metal-beta-

lactamase (MBL) genes in major gram-negative pathogens. *Conclusion.* The use of molecular biological methods allows to detect microorganisms on the objects of hospital environment much more often than during bacteriological examination.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 73—78

Key words: health-care-associated infections, bacteriological and molecular biological diagnostic methods, microorganisms, environmental objects

ВВЕДЕНИЕ

Стратегической задачей здравоохранения является обеспечение качества медицинской помощи и создание безопасной среды пребывания для пациентов и персонала в медицинских учреждениях [6]. Неотъемлемой составляющей мер по обеспечению безопасности и качества медицинской деятельности является оптимизация системы эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Актуальность ИСМП определяется их широким распространением, негативным воздействием на здоровье и жизнь пациентов, увеличением расходов на оказание медицинской помощи и др. [9].

Результаты научных исследований показали, что ИСМП поражают в Российской Федерации в среднем 10% госпитализированных пациентов, составляя ежегодно не менее 2,5 — 3 млн случаев [5]. Общий экономический ущерб, причиняемый ИСМП ежегодно, при этом может достигать 300 млрд рублей [1].

В каждой медицинской организации циркулируют те или иные микроорганизмы, которые представляют собой угрозу развития ИСМП у пациентов. Уровень колонизации ими больничных объектов при использовании бактериологических методов исследования составляет от 5% до 36% [4,7]. В то же время, проблема профилактики ИСМП требует качественного эпидемиологического анализа ситуаций с привлечением современных высокочувствительных методов, которые используются в диагностике традиционных инфекционных заболеваний, в том числе для выявления источников инфекции и факторов передачи возбудителя во время эпидемических вспышек.

В настоящее время методы молекулярной биологии, основанные на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР), находят все более широкое применение в целях диагностики и экспресс-анализа разнообразного биологического материала. Интенсивное развитие подобных методик обусловлено очень высокой чувствительностью ПЦР, возможностью быстрого получения результатов, низкой стоимостью получаемых результатов (по сравнению с другими методиками) и технологичностью. Их использование необходимо для решения таких серьезных проблем, как широкое распространение устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к лекарственным препаратам, что наиболее ярко проявляется в отношении возбудителей ИСМП [12]. В последние годы отмечается глобальный характер распространения детерминант резистентности к антимикробным препаратам, при этом значительную угрозу представляет возможность выноса за пределы стационаров и распространения в обществе устойчивых к антимикробным препаратам микроорганизмов или генетических структур, содержащих гены антибиотикорезистентности [11].

Эпидемиологические и медицинское значение заболеваний, вызываемых устойчивыми к антибиотикам патогенами, чрезвычайно велико, так, например, лишь с нечувствительными к цефалоспорином 3 поколения *K.pneumoniae*, *E.coli* и метициллинрезистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA) в России связаны общие затраты на лечение пациентов в РФ в размере более 12 млрд руб. [2].

Генетической характеристикой всех MRSA, независимо от генотипов SCCmec элемента, является наличие гена *mecA*, обуславливающего устойчивость данных штаммов к оксацилину и бета-лактамам антибиотикам, и генов *сst*-комплекса, которые кодируют белки, осуществляющие эксцизию и сайт специфическую интеграцию *mecA* в геном стафилококков [13].

На основании результатов исследований, проведенных в последние годы, рекомендовано использование методов молекулярно-биологической диагностики при проведении микробиологического мониторинга, в т.ч. и состояния объектов внутрибольничной среды, что позволит быстро реагировать на эпидемические вспышки, обусловленные «госпитальными» штаммами, сформировавшимися в стационарах, и штаммами, заносимыми в стационары из других медицинских организаций [3,8,10].

Цель исследования — провести сравнительный анализ эффективности использования бактериологических и молекулярно-биологических методов для оценки микробной обсемененности объектов внутрибольничной среды как факторов передачи микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено комплексное лабораторное обследование объектов внутрибольничной среды хирургических, реанимационных, гематологических отделений крупной многопрофильной клиники в течение 2017 года. Отобрано 215 проб с наиболее значимых в эпидемиологическом плане объектов: рук и спецодежды медицинского персонала, телефонных аппаратов, клавиатуры компьютера, кнопок перфузора, ручек дозаторов, мониторов аппаратов ИВЛ, манипуляционных столиков, дверных ручек, спинок кроватей пациентов, штативов для внутривенных инфузий, консолей.

Смывы с объектов внутрибольничной среды проводили с использованием традиционных питательных сред (мясо-пептонный бульон, среды Эндо, Вильсон-Блер, псевдомонадный агар, манитолагар, среда Сабуро). Для идентификации микроорганизмов бактериологическим методом использовали автоматический микробиологический анализатор «Vitek-2» (Лашенкова Н.Н., НМХЦ им. Н.И. Пирогова).

Выявление в образцах биоматериала ДНК основных бактериальных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и генетических детерминант их антибиотикорезистентности проводили методом мультиплексной ПЦР-РВ с использованием методик и наборов реагентов, разработанных в ЦНИИ эпидемиологии. Использованные методики и наборы реагентов основаны на ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с помощью флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных зондов. ПЦР-исследование выполнялось с помощью систем для проведения ПЦР-РВ RotorGene Q и CFX96 Touch. Экстракцию ДНК из образцов биоматериала (смывы с объектов внутрибольничной среды) проводили с использованием комплектов реагентов «РИБО-преп».

Для выявления ДНК *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Enterococcus* spp. использовали методику, включающую два мультиплексных ПЦР-РВ-теста, позволяющие детектировать специфические фрагменты ДНК возбудителей инфекций каждого из выявляемых видов или групп бактерий по отдельному каналу флуоресцентной детекции. Для выявления генов приобретенных карбапенемаз основных групп — металло-бета-лактамаз (MBL) групп VIM, NDM и IMP у основных грам-отрица-

тельных возбудителей инфекций использовали наборы реагентов «АмплиСенс® MDR-MBL-FL» и «АмплиСенс® MDR-KPC/OXA-48-FL». Для выявления ДНК метициллин-резистентных стафилококков (как MRSA, так и MRCNS) и идентификации ДНК *S. aureus* использовали набор реагентов «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» (Савочкина Ю.А., Скачкова Т.Н., ЦНИИ эпидемиологии).

Рассчитывали интенсивные показатели частоты выделения микроорганизмов, экстенсивные показатели распределения структуры выделенных микроорганизмов, коэффициент линейной корреляции между выделением микроорганизмов и ДНК микроорганизмов, достоверность различий показателей оценивали с использованием критерия Стьюдента (*t*). Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период проведения исследования микробная обсемененность объектов внутрибольничной среды составила $54,0 \pm 2,8\%$ на основании данных бактериологического изучения и $80,0 \pm 3,4\%$ — по результатам использования молекулярно-биологических методов. Между частотой бактериологического выделения микроорганизмов и определением ДНК возбудителей в различных отделениях стационара выявлена сильная прямая корреляционная связь ($r=0,92$).

С помощью бактериологического метода обнаружено 129 микроорганизмов, с преобладанием коагулазонегативных стафилококков (КНС) в 91 (70,5%) случае. Использование методов молекулярной диагностики позволило выявить 288 микроорганизмов с преимущественным выделением ДНК КНС в 160 (55,6%), *Streptococcus spp.* — в 57 (19,8%) и *Enterococcus spp.* — в 48 (16,7%) случаях.

Микроорганизмы на объектах внутрибольничной среды были обнаружены как в изолированном виде, так и в виде ассоциаций. Достоверно чаще сочетания различных микроорганизмов выявлялись с помощью молекулярно-биологического метода по сравнению с бактериологическим методом: $30,9 \pm 2,8\%$ против $13,5 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$). В ассоциациях микроорганизмов доминирующими являлись следующие сочетания: КНС с *Enterococcus spp.* — в $33,3 \pm 4,6\%$ и КНС с *Pseudomonas spp.* — в $27,8 \pm 3,8\%$ случаев. Методом молекулярной диагностики чаще всего обнаруживали комбинации таких микроорганизмов как КНС и *Streptococcus spp.* — $24,7 \pm 1,2\%$, КНС и *Enterococcus spp.* — $14,6 \pm 2,6\%$ и КНС, *Streptococcus spp.* и *Enterococcus spp.* — $39,3 \pm 1,5\%$.

Частота выделения эпидемиологически значимых микроорганизмов, относящихся к группе ESCAPE, составила $22,7 \pm 4,3\%$ с использованием бактериологического метода и $41,3 \pm 3,2\%$ — при молекулярно-биологическом тестировании ($p < 0,05$). Наиболее часто выделялись *Enterococcus spp.* (6,0% и 16,7%), а также *Staphylococcus aureus* (2,6% и 3,1%), соответственно.

Достоверно чаще молекулярно-биологическим методом исследования обнаруживали ген *mec A* (устойчивости к метициллину) у *Staphylococcus spp.* — $58,1 \pm 8,7\%$, чем бактериологическим методом исследовании выявляли метициллинрезистентные стафилококки (MRS) — $30,0 \pm 5,4\%$ ($p < 0,05$).

Также молекулярно-биологическим методом исследования в $19,4 \pm 7,2\%$ случаев были выявлены гены металло-β-лактамазы (VIM, NDM, IMP), тогда как бактериологическим методом металло-β-лактамазы выявлены не были ($p < 0,05$).

Наиболее часто встречаемым микроорганизмом при использовании двух методов исследования являлся КНС, однако частота его выявления варьировала в зависимости от отделения. Совпадение результатов двух методов исследования установлено только в 65 случаях. В остальных пробах отмечено несовпадение результатов: положительные результаты бактериологических исследований и отрицательные мо-

лекулярно-биологических исследований определены в 26 случаях, а отрицательные результаты бактериологических исследований на фоне положительных молекулярно-биологических исследований — в 95 случаях.

Проведенное исследование не позволяет дать ответ на вопрос о жизнеспособности микроорганизмов, находящихся на объектах внутрибольничной среды, однако обнаружение ДНК возбудителей свидетельствует о том, что они в течение времени контаминировали поверхности и могли являться источником внутрибольничного заражения пациентов, что согласуется с результатами ранее опубликованных работ о возможности использования ПЦР в реальном времени как метода прогнозирования загрязнения внутрибольничной окружающей среды [14].

Таким образом, основным назначением молекулярно-биологических методов в эпидемиологии ИСМП в ближайшее время должно стать слежение за популяционной структурой возбудителей, а также определение колонизации объектов внутрибольничной среды, как факторов их передачи, с целью оценки, прогнозирования эпидемической ситуации и обоснования своевременного вмешательства в ход эпидемического процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акимкин В.Г., Семененко Т.А., Никитина Г.Ю., Годков М.А., Скворцов С.В. Эпидемиология гепатитов В и С в лечебно-профилактических учреждениях. М., ООО Издательский дом «Бионика», 2013.
2. Гомон Ю.М., Светличная Ю.С., Колбин А.С., Сидоренко С.В., Дарьина М.Г., Зуева Л.П., Курылев А.А., Иванов И.Г., Стрижелецкий В.В. Бремя резистентности бактериальных инфекций, вызванных резистентными штаммами *S.aureus*, *E.coli*, *K.pneumoniae* в России. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018, 4:310-317.
3. Гончаров А.Е. Молекулярно-генетический мониторинг за эпидемическими клонами *Staphylococcus aureus* и *Acinetobacter baumannii* в системе эпидемиологического надзора за внутрибольничными инфекциями. Дисс. д-ра. мед. наук, 2017.
4. Захарова Ю.А. Совершенствование эпидемиологического надзора за гнойно-септическими инфекциями в акушерских стационарах на основе оптимизации эпидемиологического и микробиологического мониторингов. Автореф. дисс. д-ра мед. наук. Пермь, 2009.
5. Найговзина Н.Б., Попова А.Ю., Бирюкова Е.Е., Ежлова Е.Б., Игонина Е.П., Покровский В.И., Акимкин В.Г., Тутельян А.В., Шестопалов Н.В., Краевой С.А., Костенко Н.А., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Фельдблюм И.В., Шкарин В.В., Козлов Р.С., Стасенко В.Л., Голубкова А.А., Сухих Г.Т., Припутневич Т.В., Шамаков Р.Г., Зубков В.В., Шкода А.С., Шумилов В.И., Митрохин С.Д., Ершова О.Н., Селькова Е.П., Гренкова Т.А., Иванов И.В., Швабский О.Р. Оптимизация системы мер борьбы и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в Российской Федерации. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2018, 1: 6-14.
6. Онищенко Г.Г. Национальная Концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 6 ноября 2011 г.). <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70000121/#ixzz31Obdk4MV>.
7. Орлова О.А., Акимкин В.Г. Микробиологический пейзаж отделения хирургической реанимации. Дезинфекционное дело. 2014, 4 (90): 53-58.
8. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2011, 1:4-7.
9. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Игонина Е.П., Мельникова А.А., Фролова Н.В. Надзор за соблюдением санитарно-эпидемиологического законодательства при оказании медицинской помощи в целях обеспечения ее качества и безопасности. Вестник Росздравнадзора. 2016, 1: 74-78.
10. Федеральные клинические рекомендации. Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. 2015. http://nasci.ru/_resources/directory/198/common/2014_8_Molec_monitoring_new.pdf.

11. Abdollahi S., Ramazanzadeh R., Khiabani Z.D. et al. Epidemiological and Inducible Resistance in Coagulase Negative Staphylococci. *Glob. J. Health Sci.* 2015, 8(4): 109-119.
12. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
13. Katayama J., Ito T., Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44: 1549-1555.
14. Livorsi D.J., Arif S., Garry P. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) nasal real-time PCR: a predictive tool for contamination of the hospital environment. *Infection Control and Hospital Epidemiology.* 2015 Jan; 36(1): 34-39.

Поступила 07.06.19

Контактная информация: Орлова Оксана Анатольевна, д.м.н.,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)193-30-01

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Г.В.Кужлина, Г.Д.Елагин, Д.В.Печенкин, О.О.Фоменков, А.В.Еремкин, А.А.Кытманов, С.А.Шурупов, С.С.Ипатов

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К АНТИГЕНАМ BURKHOLDERIA MALLEI И BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI

Филиал 48 Центрального НИИ Министерства обороны Российской Федерации, Киров

Цель. Получение гибридом, продуцирующих специфические моноклональные антитела к антигенам Burkholderia mallei и Burkholderia pseudomallei. *Материалы и методы.* В работе использовали микробные культуры из Государственной коллекции микроорганизмов филиала 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров); мыши линии BALB/c. Гибридизацию В-лимфоцитов и миеломных клеток SP2/0-Ag14 проводили по методике G.Kohler и С.Milstein в модификации De St.Fazekas и D.Scheidegger. Исследование специфической активности иммунных сывороток, супернатантов гибридом и асцитических жидкостей, а также оценку диагностических возможностей моноклональных антител проводили методом иммуноферментного анализа. *Результаты.* В результате проведенных гибридизаций получены и охарактеризованы гибридомы-продуценты моноклональных антител к специфическим антигенам возбудителей сапа и мелиоидоза. Полученные гибридомы являются активными и стабильными антителопродуцентами при многократном пассировании in vitro и in vivo. Получены асцитические жидкости, из которых выделены иммуноглобулины. Проведен выбор антител, обеспечивающих наибольшую чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа. *Заключение.* Моноклональные антитела, продуцируемые полученными гибридомами, планируется использовать для конструирования иммунобиологических препаратов.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 78—82

Ключевые слова: Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei, гибридомы, моноклональные антитела

MANUFACTURING OF HYBRIDOMAS, PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *BURKHOLDERIA MALLEI* AND *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* ANTIGENS

Branch of the 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russia

Aim. Obtaining hybridomas, stable producing specific monoclonal antibodies against *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* antigens. *Materials and methods.* The microbial cultures from State Collection of Microorganisms from the Branch of 48 CSRI of the Defense Ministry of Russian Federation (Kirov) and BALB/c mouse were used in research. Hybridization of B lymphocytes with SP2/0-Ag14 myeloma cells was performed by G.Kohler and C.Milstein procedure in De St. Fazekas and D.Scheidegger modification. The specific activity of immune sera, hybridoma supernatants, ascites and evaluating the diagnostic capabilities of monoclonal antibodies was studied by ELISA. *Results.* Hybridomas, producing monoclonal antibodies against causative agents of glanders and melioidosis antigens, were obtained and characterized. Obtained hybridomas are active and stable antibody producers after repeated *in vitro* and *in vivo* passaging. Immunoglobulins from obtained ascites were isolated. Antibodies provided the greatest sensitivity and specificity were selected. *Conclusion.* Monoclonal antibodies, producing by obtained hybridomas may be used for creating of immune biological tests.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 78–82

Key words: *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, hybridomas, monoclonal antibodies

Среди представителей рода *Burkholderia* особое место занимают *B. mallei* и *B. pseudomallei*, относящиеся к микроорганизмам второй группы патогенности. В национальных системах классификации особо опасных бактериальных патогенов России, Великобритании, США и Канады возбудители сапа и мелиоидоза входят в ведущие группы по степени опасности для человека [2]. В настоящее время заболевания, вызываемые *B. mallei* и *B. pseudomallei*, продолжают регистрировать в Турции, Иране, Объединенных Арабских Эмиратах, Афганистане, Индии, Китае, Монголии, на Филиппинах, а также в странах Африки и Латинской Америки [4]. Заболеваемость сапом и мелиоидозом среди людей носит, в основном, спорадический характер [2]. Актуальность создания эффективных средств диагностики сапа и мелиоидоза определяется реальной угрозой их заноса на территорию России из эндемичных стран в связи со значительным ростом транспортных связей, возросшими объемами грузоперевозок и пассажиропотоков, увеличением числа туристических поездок российских граждан в эндемичные регионы, привлечением иностранной рабочей силы и незаконной миграцией населения.

На сегодняшний день существующие методы обнаружения патогенных буркхольдерий оказываются недостаточно эффективными для экспресс-диагностики, а идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза по-прежнему является трудоемкой задачей. Традиционная лабораторная диагностика, направленная на выделение чистой культуры возбудителя с последующей ее идентификацией, позволяет дать положительный ответ лишь через 36–48 часов. Классические серологические методики дают более быстрые результаты, но обладают относительно низкой чувствительностью и недостаточной специфичностью из-за возможных перекрестных реакций с гетерологичными видами и антигенной вариабельности штаммов гомологичных микроорганизмов. В настоящее время для детекции различных патогенов все более активно используют полимеразную цепную реакцию. Однако опыт зарубежных исследователей свидетельствует, что молекулярно-биологические методы обнаружения патогенных буркхольдерий целесообразно включать в качестве подтверждающих тестов в схему лабораторной диагностики [5].

Многолетний опыт лабораторной диагностики различных инфекционных заболеваний свидетельствует о том, что иммунологические методы исследования в силу своей достаточно высокой чувствительности и специфичности, относительной методической простоты и невысокой себестоимости являются эффективным способом решения задач обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов. Создание современных иммунобиологических средств, предназначенных для выявления возбудителей опасных инфекционных заболеваний бактериальной природы, невозможно без высокоактивных и специфичных антител. Такими свойствами обладают моноклональные антитела (МКАТ), которые получают с использованием гибридной технологии. Применение МКАТ для создания иммунобиологических средств позволяет значительно повысить их диагностические показатели.

Препараты для иммунизации мышей линии BALB/c готовили из смеси суспензий инактивированных культур *B. mallei* штаммов Ц-5, 11, 10230 и *B. pseudomallei* штаммов С-141, Dalat, Duc-V. Иммунизацию осуществляли подкожно в дозах 2 млрд, 4 млрд, 8 млрд и 16 млрд микробных клеток (м.к.) на животное. Специфическую активность иммунных сывороток определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА).

Животным с наибольшим уровнем сероконверсии вводили бустер-дозу (15 млрд м.к.) антигенного препарата. На четвертые сутки с момента бустерной инъекции селезенку асептически извлекали, спленоциты получали путем перфузии. Процедуру слияния В-лимфоцитов селезенки мыши и клеток миеломы SP2/0-Ag14 проводили по методике G.Kohler и C.Milstein [6] в модификации De St.Fazekas и D.Scheidegger [3]. Клонирование гибридных клеток проводили методом лимитирующих разведений из расчета одна клетка на лунку. Иммунологический скрининг гибридных культур и их клонов проводили, начиная с 10 суток после гибридизации, трижды с интервалом три дня методом непрямого ИФА.

С целью изучения культуральных свойств гибридом готовили разведения культур от 200 тыс. клеток в 1 мл до 6,25 тыс. клеток в 1 мл и засеивали ими лунки 24-луночного планшета в объеме 1 мл. За минимальную посевную концентрацию принимали разведение, при котором на пятые сутки не наблюдали гибели клеток.

Изучение секреторных свойств полученных клонов проводили методом непрямого ИФА. Для исследования использовали культуральные и асцитические жидкости гибридом-продуцентов. Культуральные жидкости получали от гибридных культур в логарифмической фазе роста. Для получения асцитических жидкостей в брюшную полость мышей линии BALB/c вводили гибридные клетки в количестве от 1 млн до 2 млн на животное. В случае развития у мышей асцитических опухолей на 15-20 сутки производили забор перитонеального экссудата. Иммуноглобулины из асцитической жидкости выделяли путем осаждения раствором сульфата аммония. Фракционированные антитела очищали методом ионообменной хроматографии [1]. Из очищенных иммуноглобулинов готовили конъюгаты с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) по методике периодатного окисления [7].

С целью обоснованного выбора МКАТ, позволяющих «сэндвич»-методом ИФА выявлять микробные культуры возбудителей сапа и мелиоидоза, был проведен анализ различных сочетаний антител в качестве сенситина и в составе конъюгата. Для этого планшеты сенсibilизировали очищенными иммуноглобулинами в концентрации 20 мкг/мл. В качестве положительного контроля использовали культуры *B. mallei* штамма Ц-5 и *B. pseudomallei* штамма С-141 в концентрации 5 млн м.к./мл. Иммунопероксидазные конъюгаты (ИПК) вносили в рабочем разведении. Реакцию учитывали определением оптической плотности субстратно-индикаторной смеси при длине волны 492 нм (ОП₄₉₂). Результат считали положительным при ОП₄₉₂ ≥ 0,3.

Изучение диагностических возможностей МКАТ проводили в ИФА с использованием микробных культур возбудителей сапа и мелиоидоза в диапазоне concentra-

ций от 16 млн м.к./мл до 125 тыс. м.к./мл, а также близкородственных буркхольдерий в концентрации 10 млн м.к./мл и гетерологичных микроорганизмов: *Yersinia pestis* (1 штамм), *Yersinia enterocolitica* (3 штамма), *Yersinia pseudotuberculosis* (3 штамма), *Escherichia coli* (1 штамм), *Francisella tularensis* (4 штамма), *Brucella abortus* (5 штаммов), *Brucella melitensis* (4 штамма), *Brucella suis* (5 штаммов), *Legionella pneumophila* (3 штамма), *Bacillus anthracis* (3 штамма), *Vibrio cholerae* (1 штамм) в концентрации 100 млн м.к./мл. Постановку ИФА осуществляли, как описано выше.

Результаты исследования сывороток крови животных, иммунизированных антигенам *B. mallei* и *B. pseudomallei*, показали высокий уровень их специфической активности в титрах антител в ИФА 1:40000 — 1:320000 и 1:5000 — 1:640000, соответственно. Животных с наибольшим уровнем сероконверсии использовали в качестве источника иммунных спленоцитов.

В ходе проведенных экспериментов по гибридизации миеломных клеток с В-лимфоцитами иммунных мышей и скрининга гибридных культур на специфическую антителопродукцию получили 17 первично-позитивных гибридных клеточных линий, продуцирующих антитела к антигенам *B. mallei* и 20 — к антигенам *B. pseudomallei*. Из дальнейшей работы исключили гибридные клеточные культуры, характеризующиеся наименьшим уровнем продукции специфических антител по результатам трехкратного тестирования в ИФА. Оставшиеся первичные культуры клонировали, размножили путем последовательных пересевов и криоконсервировали. Таким образом, получили 9 гибридом: 258F12H11, 292G4D4, 298C11E11, 301E5F10 — специфичные к *B. mallei* и 253B4D4, 255A6F5, 255B6E1, 283B5H2, 298E9B4 — специфичные к *B. pseudomallei*.

Результаты исследования культуральных и секреторных свойств полученных гибридом показали устойчивость пролиферативной и антителопродуцирующей активности на протяжении 10 пассажей *in vitro* и трех пассажей *in vivo*. При этом их минимальная посевная концентрация составила 12,5 тыс. клеток в 1 мл и 25 тыс. клеток в 1 мл, титр антител в культуральной жидкости находился в интервале от 1:160 до 1:5120, а в асцитической жидкости — от 1:160000 до 1:2560000.

Исследование различных сочетаний МКАТ в качестве сенситина и в составе ИПК показало, что сапные МКАТ гибридных клеточных линий 258F12H11 и 298C11E11 и мелиоидозные МКАТ гибридных клеточных линий 253B4D4, 255A6F5 и 255B6E1 обеспечивают наибольший сигнал иммуноферментной реакции при выявлении микробных культур *B. mallei* и *B. pseudomallei*, соответственно (ОП₄₉₂>2,0).

Вышеуказанные гибридомы были взяты в опыт по оценке диагностических возможностей МКАТ. Результаты опыта показали возможность выявления в ИФА культур *B. mallei* и *B. pseudomallei* в диапазоне концентраций от 250 тыс. м.к./мл до 2 млн м.к./мл. При этом сочетания «сенситин-конъюгат» — «258F12H11-258F12H11» и «255A6F5-255B6E1» обеспечивают наибольшую чувствительность ИФА. Все исследованные МКАТ не взаимодействовали в ИФА с культурами близкородственных и гетерологичных микроорганизмов, что свидетельствует об их специфичности.

В ходе исследований по получению гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к антигенам возбудителей сапа и мелиоидоза, было проведено четыре эксперимента по гибридизации клеток мышинной миеломы с В-лимфоцитами мышей линии BALB/c, иммунизированных инактивированными культурами *B. mallei* и *B. pseudomallei*. В результате проведенных гибридизаций и последующих клонирований получены гибридомы-продуценты моноклональных антител к антигенам *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Полученные гибридомы являются активными и стабильными антителопродуцентами специфических моноклональных антител. Показана принципиальная возможность создания иммуноферментных средств выявления возбудителей сапа и мелиоидоза с использованием моноклональных антител, продуцируемых полученными гибридомами, с пределом обнаружения 250 тыс. м.к./мл и более.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кэтти Д., Райкундалия Ч., Браун Дж. и др. Антитела. Методы. Книга 1. М., 1991.
2. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18: 383-416.
3. Fazekas De St., Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980, 35: 1-21.
4. Harvey S.P., Minter J.M. Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005 Apr 1; 44 (1): 91-97.
5. Inglis T.J.J. Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2005 May, 43 (5): 2201-2206.
6. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975, 256(5517): 495-497.
7. Nakane P.K., Kawaoui A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated. *J. Histochem. Cytochem.* 1974, 22(12): 1084-10891.

Поступила 24.01.19

Контактная информация: Куклина Г.В.,
610117, Киров, Октябрьский пр-т, 119, р.т. (8332)64-18-13

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

В.Ф.Лавров^{1,2}, О.А.Свитич¹, А.С.Казанова¹, А.Р.Кинкулькина¹, В.В.Зверев¹

VARICELLA ZOSTER-ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ИММУНИТЕТ, ДИАГНОСТИКА И МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VIVO

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

Varicella Zoster Virus (VZV) — высоко контагиозный вирусный агент семейства Herpesviridae, обладающий строгой видовой специфичностью и вызывающий два различных заболевания — ветряную оспу, преимущественно у детей, и опоясывающий герпес — чаще у пожилых людей. Получение дополнительных сведений о жизненном цикле вируса, его биологии, патогенетических особенностях вызываемых им осложнений будет способствовать появлению более совершенных методов диагностики и профилактики, разработке новых экспериментальных подходов, позволяющих изучать врожденные и адаптивные механизмы иммунной защиты при VZV-инфекции.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 82—89

Ключевые слова: VZV-инфекция, ветряная оспа, опоясывающий герпес, врожденный иммунитет, диагностика, моделирование инфекции in vivo

V.F.Lavrov^{1,2}, O.A.Svitich¹, A.S.Kazanova¹, A.R.Kinkulkina¹, V.V.Zverev¹

VARICELLA ZOSTER VIRUS INFECTION: IMMUNITY, DIAGNOSIS AND MODELLING IN VIVO

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

Varicella Zoster Virus (VZV) is a highly contagious viral agent of the Herpesviridae family, which has a strict species specificity, and causes two different diseases — chickenpox, mainly in children, and herpes

zoster — more often in the elderly. Obtaining additional information about the life cycle of the virus, its biology, pathogenetic features of the complications caused by it, will contribute to the emergence of more advanced methods of diagnosis and prevention, the development of new experimental approaches that allow to study the innate and adaptive mechanisms of immune protection in VZV-infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 82—89

Key words: VZV infection, chickenpox, herpes zoster, innate immunity, diagnosis, simulation of infection *in vivo*

Исследования показали, что возбудитель ветряной оспы (ВО) и опоясывающего герпеса (ОГ), или вирус герпеса человека 3 типа эволюционировал вместе с приматами и вышел из Африканского континента вместе с ранними гоминидами около 7 млн лет назад [7]. ВО многие годы считалась незначительной медицинской проблемой, легким детским заболеванием [3]. Однако после успешного внедрения С. Фарбером химиотерапевтического метода лечения злокачественных новообразований, Т. Веллер сообщил о двух случаях смерти детей, победивших рак с помощью химиотерапии, но вскоре умерших от ятрогенной ВО [26]. Болезнь протекала в тяжелой форме, сопровождаясь обширной геморрагической везикулярной сыпью. Выяснилось, что для таких детей ВО смертельно опасна, вследствие возникающего на фоне химиотерапии иммунодефицита [12]. Вскоре химиотерапия стала распространенным и эффективным методом борьбы со злокачественными новообразованиями, а успешное культивирование вируса в лаборатории Т. Веллера стало тем необходимым условием, которое привело к созданию японским ученым проф. Такахаши вакцины против ВО [26]. Таким образом, реальный контроль за распространением VZV-инфекции стал возможен благодаря накопленным знаниям о жизненном цикле вируса, его биологии и патогенезе вызываемых им осложнений. Результаты клинических наблюдений указывают на то, что ВО и ОГ — это самостоятельные заболевания, этиологическим агентом которых является VZV. Также показано, что одним из условий развития ОГ является длительная бессимптомная персистенция VZV в организме переболевшего ВО человека [8]. VZV относится к роду *Varicellavirus* семейству *Herpesviridae* подсемейству *α-herpesvirinae*. В обычных условиях вирус паразитирует только в организме человека. Его геном состоит из линейной двухцепочечной ДНК (124884 н.п.), кодирующей последовательности 72 генов. Икосаэдрический нуклеокапсид вируса (162 капсомера) окружен липидной оболочкой, вирионы плеiomорфны, их диаметр достигает 150-200 нм [5]. Через 72 ч после заражения культуры клеток наблюдается выраженное цитопатическое действие вируса с характерным формированием многоядерных синцитиев без продукции стабильных вирионов. В процессе репликации продуцируются 12 вирусных белков, в том числе, гликопротеины В, I и Н, с преобладанием gE, к которому формируется основной пул вируснейтрализующих антител. Показано, что главной функцией антител к VZV является нейтрализация вируса, а их продукция возникает в результате VZV-инфекции или вакцинации. Установлено, что gE связан с вирулентностью вируса в патогенезе неврологических поражений [21]. Антитела к gB также обладают вируснейтрализующими свойствами, однако не всегда обнаруживаются в крови [22]. В инициации клеточного иммунного ответа участвуют вирусные белки — продукты трансляции с ORF4 и ORF63 [24]. Обычно, при латенции вируса в нейронах, удается выявить транскрипты ORF4, 21, 29, 62, 63 и 66 [9]. Исследование с помощью ПЦР-РВ латентно инфицированных ганглиев тройничного нерва показало наличие в них транскриптов вирусных генов, транскрируемых с ORF11, 41, 43, 57 и 68 [14]. Ранее считалось, что существует лишь один серотип VZV [19], однако в 1998 году обнаружен мутантный штамм (VZV-MSP), в gE которого отсутствовал В-клеточный эпитоп, необходимый для реализации процессов комплемент-зависимой нейтрализации и антитело-зависимой цитотоксичности. В 1999 году в Канаде у 75-летнего мужчины с клиникой ОГ был выделен штамм

вируса (VZV-BC) со схожей мутацией в гене gE [14]. В 2006 году опубликованы данные о штаммах VZV, относящихся к категории «ускользающих» мутантов, которые не взаимодействуют с вируснейтрализующими моноклональными антителами, что существенно затрудняет серологическую диагностику инфекции [18]. Выяснилось, что мутантные штаммы фенотипически отличаются от обычных вирусов и лучше размножаются *in vitro* и *in vivo* [15]. Предполагается, что эти штаммы могут вызывать у человека более тяжелые формы VZV-инфекции, чем обычные дикие вирусы, что, в частности, подтверждается сообщением об иммунокомпетентном больном с тяжелой, завершившейся летально, диссеминированной формой гепатита, вызванной мутантным по gE VZV [7]. VZV относится к высоко контагиозным вирусам, вызывающим ВО, преимущественно у детей, и ОГ у взрослых, чаще пожилых людей. В естественных условиях VZV может вызывать заболевание только у человека.

ИММУНИТЕТ. В результате проникновения в организм вирус инфицирует слизистую оболочку дыхательных путей, проникает в эпителиальные клетки миндалин, где начинает реплицироваться. Нейтрализация вируса в этот период возможна путем пассивной иммунизации [23]. В инкубационном периоде VZV начинает инфицировать CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки [23]. При возникновении вирусемии, которая обычно длится несколько суток, зараженные Т-лимфоциты мигрируют по направлению к кожным покровам, попутно инфицируя кератиноциты и другие клетки и ткани. Система врожденного иммунитета, за счет продукции α -ИФН и других факторов сдерживает репликацию вируса в коже, однако «первая линия обороны» все же прорывается, что сопровождается появлением на коже характерных высыпаний [26]. Врожденный иммунитет замедляет процесс репликации вируса, обеспечивая тем самым формирование адаптивного иммунитета, который в дальнейшем контролирует репликацию VZV [23]. Известный механизм распространения VZV из «клетки в клетку» свидетельствует о более важной роли CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в защите хозяина, чем специфических антител. У пациентов с дефицитом врожденных [7] и (или) адаптивных клеточно-опосредованных реакций [22] часто возникают тяжелые формы инфекции, которые иногда может вызывать даже вакцинный штамм вируса (vOka). Исследования активности клеточного иммунитета у взрослых пациентов продемонстрировали, что тяжесть заболевания у них прямо пропорциональна вирусной нагрузке и обратно пропорциональна активности вирусспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов. После выздоровления у большинства реконвалесцентов формируется пожизненный адаптивный иммунитет, гуморальное звено которого обеспечивает защиту от рецидива ВО. Установлена прямая коррелятивная связь между концентрацией VZV IgG в крови больных и отсутствием клинически выраженной инфекции [17]. У пожилых людей с высокими титрами VZV IgG в крови риск развития ВО, как правило, минимизирован. Показано, что заболевание можно предотвратить путем введения контактному лицу иммуноглобулиновых препаратов [15]. Однако описан случай повторной инфекции у 32-летней женщины, перенесшей в 5-летнем возрасте ВО, в крови которой за два года до повторного заболевания определяли высокие титры VZV IgG. Источником инфекции в этом случае являлся больной ОГ [22]. Полагают, что повторное заражение VZV может быть обусловлено низкими концентрациями в крови вирусспецифических высокоаффинных IgG и (или) нарушением процесса «созревания» их аффинности [10]. При этом, необходимо отметить, что далеко не все переболевшие ВО с преобладанием в крови низкоаффинных VZV IgG заболевали ВО повторно. Наличие у человека высоких титров VZV IgG, несомненно, позитивный фактор, способствующий выздоровлению, однако абсолютным условием выздоровления является все же формирование полноценного адаптивного (клеточного) иммунитета. Наиболее тяжелые случаи ВО, часто с летальным исходом, наблюдали у лиц с отсутствующим или существенно сниженным уровнем клеточных реакций [11]. Назначение при этом иммуноглобулиновых пре-

паратов малоэффективно ввиду вероятности межклеточного (без выхода в кровяное русло) распространения вируса [11].

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА. Клинические признаки ВО и ОГ обычно характерны и очевидны, поэтому диагноз «VZV-инфекция» чаще всего ставится на основании клинических симптомов болезни. Лабораторное тестирование необходимо в сомнительных случаях, например, у лиц с нарушением иммунитета или при подозрении на VZV-инфекцию, устойчивую к лекарственным препаратам [23]. Долгое время «золотым стандартом» лабораторной диагностики было выделение вируса из культуры клеток, что требовало использования свежей везикулярной жидкости, которую наслаивали на субстрат, чаще эмбриональные фибробласты легкого человека. Клетки инкубировали при 37°C в течение 3-7 суток и под микроскопом учитывали цитопатогенный эффект вируса. К недостаткам метода можно отнести его длительность и относительно высокую стоимость [6]. Медленный рост VZV в культуре не обеспечивал своевременного лечения. В связи с этим, культуральный метод используется редко, хотя, по-прежнему, применяется при определении чувствительности вируса к новым препаратам, а также в научных целях. Сейчас диагностической процедурой выбора является ПЦР, которая отличается быстротой постановки, высокой чувствительностью и специфичностью. Эту реакцию можно использовать для обнаружения вирусной ДНК в везикулярной жидкости, соскобах кожи, мазках со слизистой, в ликворе и тканях, а также в крови и слюне пациентов [18]. Определение ДНК в слюне особенно перспективно, ввиду неинвазивности метода сбора материала. [23]. Появление вирусной ДНК в слюне больных ОГ, рассматривается как диагностически значимый признак [23]. Этот тест особенно важен при диагностике инфекции у пациентов с отсутствием кожных высыпаний, например, zoster sine herpete или enteric zoster [21]. Кратковременное присутствие в слюне вирусной ДНК как явления было впервые установлено у 1/3 космонавтов после полета в космос, при этом каких-либо симптомов заболевания у них не наблюдалось [18]. Этот феномен, вероятно, мог возникнуть вследствие эндогенной реактивации VZV в экстремальных условиях полета, на фоне снижения активности клеточного иммунитета. В крови космонавтов, под влиянием стресса, уровень вирусной ДНК колебался от 0 до 6×10^3 копий/мл, у 30% из них вирусную ДНК определяли в слюне [13]. В слюне 17% детей-пациентов отделений интенсивной терапии также отмечалось присутствие вирусной ДНК [16]. Различия в количестве ДНК у больных ОГ колебались в интервале от 10 до 1×10^6 копий ДНК в 1 мл слюны [21]. Помимо применения ПЦР в диагностике заболеваний, эта реакция может быть использована для выявления различий между WTVZV и vOka, что принципиально важно при оценке безопасности вакцин против ВО и ОГ. Для определения различий в молекуле ДНК, кодирующей белки vOka и продукты генов VZV дикого типа (WTVZV), необходима обработка продуктов ПЦР рестрикционными ферментами [17]. Для идентификации вируса может быть использован рестрикционный эндонуклеазный анализ продуктов ПЦР в нуклеотидных последовательностях дикого и вакцинного штаммов вируса. Например, ORF38 WTVZV обладает сайтом рестрикции PstI, который отсутствует в ORF38 vOka. Поэтому простой скрининговый тест позволяет судить о наличии или отсутствии этого сайта в анализируемых образцах вирусной ДНК [1]. Подавляющее большинство генов ORF38 WTVZV содержит сайт PstI, и, таким образом, эти гены можно отнести к «PstI-позитивным». Однако в некоторых ORF38 дикого вируса этот сайт рестрикции отсутствует, ввиду чего «PstI-негативные» штаммы VZV не всегда являются вакцинными. Для полной уверенности в том, что исследуемый штамм является вакцинным, проводится дополнительное тестирование. В частности, рекомендуется анализ четырех локусов вирусной ORF62 (105705, 106262, 107252 и 108111), что используется для окончательной идентификации вируса [17]. Еще одним диагностическим тестом VZV-инфекции является метод непрямой иммуно-

флюоресценции, с помощью которого возможна идентификация вируса из кожных везикул. Этот метод является более чувствительным, чем культуральный, однако уступает ПЦР, вследствие чего он менее эффективен при выявлении различий между вакцинным и диким штаммами VZV [14]. Диагноз «VZV-инфекция» может быть также подтвержден по 4- и более кратному нарастанию титра VZV IgG в крови больных. Однако для данного теста характерна длительность постановки (от 10 до 14 дней) и невысокая специфичность. В крови некоторых пациентов с ВПГ-инфекцией также выявляются VZV IgG, в основном, за счет перекрестных реакций между VZV и ВПГ [6]. Серологические методы могут быть также использованы в качестве индикаторных тестов, позволяющих выявлять наличие протективного иммунитета к ВО, однако большинство из них не обладает достаточной чувствительностью, позволяющей определенно ответить на этот вопрос. Наличие антител к VZV может быть выявлено в сыворотке крови с помощью твердофазного ИФА. Многие коммерческие ИФТС различаются по степени своей чувствительности и специфичности. Наиболее распространенным их недостатком является низкая чувствительность, поэтому у некоторых реципиентов антитела к VZV могут не выявляться [6]. С целью повышения чувствительности метода была разработана тест-система, с помощью которой можно определять антитела к gE VZV, однако ее практическое применение ввиду слишком высокой чувствительности имеет ограничения, так как она может выявлять антитела в очень низких, недостаточных для защиты титрах. При этом могут возникать ошибки, связанные с мнением, что тестируемое лицо защищено от заражения [2]. Более надежным, чем ИФА, является метод определения флуоресцирующих антител к мембранному вирусному антигену (ФАМА-тест). Использование данного теста показало, что он является весьма эффективным суррогатным методом определения уровня иммунной защиты от ВО [6]. Установлено, что после заражения VZV, согласно результатам ФАМА-теста, у менее чем 2% лиц с титром антител $\geq 1:4$ ($n=131$) наблюдалась «мягкая» форма ВО. При этом заболеваемость ветрянкой лиц с титром антител $< 1:4$ составляла 59% ($n=68$). ФАМА-тест часто использовали как метод, с помощью которого осуществлялась корреляция иммунитета при проверке эффективности вакцины против ВО [25]. Однако метод оказался не достаточно надежным при определении уровня иммунной защиты у лиц с ослабленным иммунитетом, некоторые из них после заражения заболевали «мягкой» формой ВО даже если ФАМА-тест указывал на наличие у них гуморальной защиты [25]. Выяснилось, что ИФТС, выявляющие у пациентов VZV IgM, недостаточно надежны, ввиду получения частых ложноположительных результатов, например, при наличии в крови пациентов С-реактивного белка [7].

В отличие от ВО вируснейтрализующие антитела не защищают от заболевания ОГ. Гуморальный иммунитет не препятствует эндогенной реактивации вируса; в крови таких больных часто выявляются высокие титры анти-VZV. Таким образом, определение концентрации антител к VZV в сыворотке крови не является необходимым условием при выяснении вопроса, существует ли опасность развития ОГ [10]. Показано, что для предотвращения заболевания вследствие реактивации VZV важным является функциональная активность эффекторов клеточного иммунитета [22]. Замечено, что нейроны, инфицированные ВПГ, окружены CD8+Т-клетками, а вокруг нейронов, зараженных VZV, скопление Т-лимфоцитов отсутствует [10]. Механизм, посредством которого клеточный иммунитет управляет процессом реактивации VZV, требует дальнейшего изучения. Лица, у которых развивается ОГ, обычно демонстрируют низкие показатели клеточного иммунитета [22]. Можно предположить, что активность иммунокомпетентных клеток снижается из-за физиологически обусловленных причин, в частности, старения организма. Заболевание чаще всего наблюдается в 50 — 60-летнем возрасте [5]. У пациентов с клеточным иммунодефицитом риск развития ОГ значительно повышается [14]. Дети и подрост-

ки, у которых диагностируют ОГ, отличаются транзиторным снижением активности клеточных реакций, возможно, из-за предшествующих эпизодов бессимптомной вирусной инфекции или стресса [18]. Эндогенная реактивация VZV не всегда сопровождается сыпью, при ее отсутствии, например, у пациентов с *zoster sine herpette* или *enteric zoster* выявление вирусной ДНК в слюне или спинномозговой жидкости приобретает особо важное диагностическое значение.

МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VIVO. Известно, что естественным резервуаром VZV в природе является только человек, что создает определенные сложности для детального изучения патогенетических механизмов VZV-инфекции. В связи с этим, необходимо было создать модель заболевания на животных, которая включала бы все стадии инфекции, в том числе, стадию эндогенной реактивации вируса, что долго не удавалось, и, таким образом, изучение механизмов иммунного ответа у лиц с первичной VZV-инфекцией или у реципиентов живой вакцины было ограничено [25]. Были попытки создания модели латентной VZV-инфекции на хлопковых крысах или крысах линии Вистар, однако воспроизвести стадию эндогенной реактивации вируса у этих животных не удавалось [18]. Впервые латентную инфекцию воспроизвели на морских свинках в лаборатории Герсона [14]. Было показано, что в составе энтеральной нервной системы (ЭНС) этих животных находятся внутренние первичные афферентные нейроны (*intrinsic primary afferent neurons*). Латенция вируса происходит в первичных афферентных нейронах дорзальных заднекорешковых ганглиев (*primary afferent neurons of dorsal root ganglia, DRG*) и нейронах краниальных нервных ганглиев (*cranial nerve ganglia, CNG*). С учетом того, что перmissive системой для VZV являются клетки человека, моделирование VZV-инфекции на животных — довольно сложная задача [23]. Однако, благодаря инновационным подходам эта задача была решена путем пересадки инфицированных VZV эмбриональных клеток человека иммунодефицитным мышам линии SCID, что позволило детально изучить реакции врожденного иммунного ответа независимо от адаптивных иммунных реакций [4]. Мышам SCID под кожу пересаживают зараженные вирусом эмбриональные клетки кожи, а под почечную капсулу — эмбриональные Т-лимфоциты и клетки спинномозговых ганглиев человека. Ксенотрансплантат приживается обычно через 3-4 недели, а Т-лимфоциты и клетки нервных ганглиев — через 8-12 недель [10]. Клетки кожи дифференцируются и образуют типичные слои дермальных и эпидермальных клеток. В результате в тимусе мышей появляются незрелые и зрелые формы CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов [26]. Нейроны в ксенотрансплантатах спинномозговых ганглиев обычно окружены клетками-сателлитами, на поверхности которых наблюдается экспрессия специфических белков, в том числе, тропомиозин-рецепторной киназы А (TRKA), молекул адгезии нервных клеток (NCAM), медиатора проникновения вируса герпеса (HVEM) и некоторых другие молекул. Через 12 недель после пересадки в тимусе появляется ряд белков, участвующих в блокаде апоптоза и реакциях врожденного иммунитета, включая преобразователь сигнала и активатор транскрипции (STAT), лейкомиический белок (PML — *promyelocytic leukaemia protein*) [5]. С целью изучения влияния вирусных и клеточных белков на процесс репродукции вируса используют модели с ингибиторами малых интерферирующих РНК (siRNA). В инфицированных ксенотрансплантатах определяют титры VZV и копии вирусного генома [21]. Иммуногистохимическими методами в биоптатах тканей определяют экспрессию вирусных и клеточных белков, а также ультраструктурные изменения в клетках. Для мониторинга инфекции в естественных условиях используется рекомбинантный VZV, экспрессирующий молекулы люциферазы [6]. Опыты с использованием Т-клеточных ксенотрансплантатов у мышей SCID в естественных условиях и Т-клеток миндалин *in vitro* показали, что VZV обладает тропизмом к CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитам, а также к двойным CD4CD8-позитивным Т-клеткам, не препятствующим процессу репликации вируса и формированию

инфекционных вирионов [10]. VZV инфицирует Т-лимфоциты и дендритные клетки, что обеспечивает его присутствие в лимфатических узлах и распространение по всему организму. Зараженные VZV CD4+ Т-клетки экспрессируют такие маркеры активации, как CLA (cutaneous leukocyte antigen) и CCR4 (СС-хемокиновый рецептор 4). У мышей — реципиентов ксенотрансплантатов кожи, зараженные Т-клетки мигрируют по направлению к поверхности кожи, циркулируют в крови, концентрируются вокруг волосяных фолликулов, окруженных скоплением капилляров [10], что указывает на способность Т-лимфоцитов проникать сквозь эндотелий мелких сосудов. Известно, что в естественных условиях зараженные Т-клетки переносят вирус ксенотрансплантатам DRG, что способствует развитию латенции вируса. Известно, что VZV вызывает образование симпластов, состоящих из эпителиальных клеток, при этом слияния Т-лимфоцитов не происходит [20]. Гликопротеины оболочки VZV гомологичны с гликопротеинами других α -герпесвирусов. Показано, что в процессе заражения Т-клеток участвует вирусный белок (gI). Экспериментально установлено, что блокирование промотора гена gI приводит к ослаблению связи с ним клеточных транскрипционных факторов и препятствует транскрипции и репликации вируса в Т-клетках ксенотрансплантата [23]. Получены данные об участии в заражении Т-клеток пяти белков тегумента, в том числе, ORF10, IE63, ORF65 и вирусной киназы — ORF47 и ORF66. Белок ORF10 увеличивает экспрессию IE62, IE63, регулирует экспрессию IE62 и трансктивирует клеточный фактор элонгации 1a (EF-1a). Киназа ORF47, участвующая в транскрипции IE62, GE и ORF47, необходима для сборки вирионов. Блокирование экспрессии ORF47 нарушает репликацию VZV в Т-клетках ксенотрансплантата, что указывает на их важность в моделировании VZV-инфекции *in vivo* [10]. Белок ORF66 крайне необходим для сборки вирионов в Т-клетках. Кроме того, киназа ORF66 блокирует апоптоз и ослабляет экспрессию ИФН. ORF66 также способствует снижению уровня экспрессии антигенов ГКГ I по типу отрицательной обратной связи. Исследование мутантов VZV, в которых были заблокированы участки связывания клеточных транскрипционных факторов, указывает на важность синергидного регулирования вирусных генов IE62 и клеточных кофакторов, например, специфического белка фактора транскрипции 1 (Sp1) увеличивающего сродство IE62 к вирусному промотору. Мутация двух Sp1-мотивов в промоторе gE предотвращает репликацию VZV [7].

В заключение следует отметить, что инфицированность населения нашей планеты VZV остается высокой. Во многих регионах мира, несмотря на профилактические мероприятия, заболеваемость первичной VZV-инфекцией и опоясывающим герпесом увеличивается. Таким образом, разработка научно обоснованных инновационных мероприятий по борьбе с данным видом патологии является актуальной задачей, требующей более детального изучения особенностей развития VZV-инфекции, углубленных исследований жизненного цикла вируса и его биологии, факторов врожденного и адаптивного противовирусного иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганковская О.А., Бахарева И.В., Ганковская Л.В. Исследование экспрессии генов TLR9, NF- κ B, ФНО α в клетках слизистой цервикального канала беременных с герпесвирусной инфекцией. Журн. микробиол. 2009, 2: 61-64.
2. Григорьева О.Ю. Роль TLR9 в противогерпетическом иммунитете. Влияние науки на инновационное развитие. Сборник статей международной научно-практической конференции. 2017, 2: 7-9.
3. Казанова А.С., Лавров В.Ф., Зверев В.В. Вирус varicella zoster и заболевания сосудов центральной нервной системы. Журн. микробиол. 2015, 3: 106-116.
4. Казанова А.С., Лавров В.Ф., Дубоделов Д.В. и др. Ветряная оспа и опоясывающий лишай: история и перспективы вакцинопрофилактики. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2011, 2: 36-39.

5. Лавров В.Ф., Казанова А.С., Кузин С.Н. и др. Ветряная оспа и опоясывающий лишай: особенности заболеваемости и клинических проявлений. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы, 2011, 3: 54-58.
6. Aronson P.L., Lyons T.W., Cruz A. Impact of Enteroviral Polymerase Chain Reaction Testing on Length of Stay for Infants 60 Days Old or Younger. J. Pediatr. 2017, 189: 169-174.
7. Depledge D.P., Kundu S.T., Jensen N.J. et al. Deep sequencing of viral genomes provides insight into the evolution and pathogenesis of varicella zoster virus and its vaccine in humans. Mol Biol Evol. 2014, 31(2): 397-409.
8. Elwee M.N., Vijayakrishnan S.N., Rixon F et al. Structure of the herpes simplex virus portal-vertex. PLoSBiol. 2018, 16(6): 526-535.
9. Galassi G.N., Genovese M.N., Meacci M. et al. Comment on ischemic stroke after herpes zoster. J Med Virol. 2018, 5(6): 167-175.
10. Gershon A.A., Gershon M.D. Pathogenesis and current approaches to control of varicella-zoster virus infections. Clin Microbiol Rev. 2013, 26(4): 728-743.
11. L'Huillier A.G., Ferry T., Courvoisier D.S. et al. Impaired antibody memory to varicella zoster virus in HIV-infected children: low antibody levels and avidity. HIV Med. 2012, 13(1): 54-61.
12. Kanbayashi Y.N., Matsumoto Y.N. Predicting risk factors for varicella zoster virus infection and postherpetic neuralgia after hematopoietic cell transplantation using ordered logistic regression analysis. Ann Hematol. 2017, 96(2): 311-315.
13. Kim S.K., Kim M.C., Han S.B. et al. Clinical characteristics and outcomes of varicella zoster virus infection in children with hematologic malignancies in the acyclovir era. Blood Res. 2016, 51(4): 249-255.
14. Kennedy P.G., Rovnak J.N., Badani H. et al. A comparison of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency and reactivation. J. Gen. Virol. 2015, 96(7): 1581-1602.
15. Komadina N.N., McVernon J.N., Hall R. et al. A historical perspective of influenza A(H1N2) virus. Emerg. Infect. Dis. 2014, 20(1): 6-12.
16. Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Gankovskaya O.A., Lavrov V.F. et al. Herpes simplex virus: treatment with antimicrobial peptides. Advances Experimental Medicine and Biology. 2007, 601: 369-376.
17. Li Y., Zhu B. et al. Genotyping of clinical varicella-zoster virus isolates collected from Yunnan in Southwestern China. Biomed Rep. 2016, 4(2): 209-214.
18. Mathew T., Thomas K., Shivde S. et al. Post herpes zoster infection neuromyelitis optica spectrum disorder. Mult Scler Relat Disord. 2017, 18: 93-94.
19. Norberg P., Depledge D.P., Kundu S. et al. Recombination of Globally Circulating Varicella-Zoster Virus. Depledge. J Virol. 2015, 89(14): 7133-7146.
20. Ojha R.P., Stallings-Smith S., Aviles-Robles M.J. et al. Incidence and case fatality of varicella zoster virus infection among pediatric cancer patients in developing countries. Eur J Pediatr. 2016, 175(4): 581-586.
21. Park S.Y., Kim J.Y., Kim J.A. et al. Diagnostic Usefulness of Varicella-Zoster Virus Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of DNA in Saliva and Plasma Specimens From Patients With Herpes Zoster. J Infect Dis. 2017, 217(1): 51-57.
22. Suenaga T., Matsumoto M., Arisawa F. et al. Sialic Acid on Varicella-Zoster Virus Glycoprotein B Are Required for Cell-Cell Fusion. J Biol Chem. 2015, 290(32): 19833-19843.
23. Sauerbrei A. Diagnosis, antiviral therapy and prophylaxis of varicella-zoster virus infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016, 35(5): 723-734.
24. Science M., MacGregor D., Richardson S.E. et al. Central nervous system complications of varicella-zoster virus. J Pediatr. 2014, 165(4): 779-785.
25. Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Lavrov V.F. Herpes simplex virus type 2 infection during pregnancy is correlated with elevated TLR9 and TNF α expression in cervical cells. International Trends in Immunity. 2014, 2(1): 62-66.
26. Weller T.H. Intradermal vaccination against influenza. N Engl J Med. 2005, 352(10): 1044-1046.

Поступила 30.01.19

Контактная информация: Лавров Вячеслав Федорович, проф.,
115088, Москва, ул. 1 Дубровская, 15, стр.1, р.т. (495)674-55-01

ВАКЦИНАЦИЯ ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ ПРОТИВ ГРИППА И ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

¹Самарский государственный медицинский университет; ²Чувашский государственный университет, Чебоксары; ³Городская детская клиническая больница, Чебоксары; ⁴ГНЦ Институт иммунологии, Москва

В обзоре представлены данные о роли респираторных агентов в патогенезе обострений бронхиальной астмы и влияние вакцинации на течение заболевания. Проанализированы особенности формирования защитного иммунитета при различных схемах иммунизации. У больных бронхиальной астмой дано обоснование схемы вакцинации с преимуществом приоритетного введения конъюгированной полисахаридной вакцины с последующим введением полисахаридной пневмококковой вакцины через 8 недель. Показано, что вакцинация против пневмококковой инфекции приводит к элиминации из мокроты *Streptococcus pneumoniae*. Вакцинации против гриппа у больных бронхиальной астмой уменьшается частота и длительность обострений. Комбинированная вакцинация против гриппа и пневмококковой инфекции не снижала клинико-иммунологического эффекта.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 90—98

Ключевые слова: пневмококковая инфекция, вакцинация, астма, грипп, схема вакцинации

A.V.Protasov¹, N.P.Andreeva^{2,3}, A.M.Kostinova⁴

VACCINATION OF PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA AGAINST INFLUENZA AND PNEUMOCOCCAL INFECTION

¹Samara State Medical University; ²Chuvash State University, Cheboksary; ³City Children's Clinical Hospital, Cheboksary; ⁴National Research Center Institute of Immunology, Moscow, Russia

The review presents data on the role of respiratory agents in the pathogenesis of exacerbations of bronchial asthma and the impact of vaccination on the clinical course of the disease. The features of the formation of protective immunity in various immunization schemes are analyzed. In patients with bronchial asthma, the substantiation of the vaccination scheme with the advantage of priority administration of conjugated polysaccharide vaccine followed by the introduction of polysaccharide pneumococcal vaccine after 8 weeks is given. It was shown that vaccination against pneumococcal infection resulted in elimination from sputum *S. pneumoniae*. Influenza vaccination in patients with bronchial asthma reduced the frequency and duration of exacerbations. Combined vaccination against influenza and pneumococcal infections did not reduce the clinical and immunological effect.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 90—98

Key words: pneumococcal infection, vaccination, asthma, influenza, vaccination scheme

Бронхиальная астма (БА) является глобальной проблемой здравоохранения. В мире около 300 млн больных БА, заболевание наносит большой ущерб, связанный не только с затратами на лечение, но также с потерей трудоспособности [1]. По данным эпидемиологических исследований, в России около 7 млн больных БА, из них зарегистрировано только 1,4 млн. Летальность от БА увеличивается с возрастом: у детей она составляет 1%, у взрослых 2—4% [36]. В процессе изучения особенностей течения заболевания достигнуто понимание новых аспектов формирования патологии. Определение фенотипов БА позволяет персонифицировать лечение путем подбора наиболее эффективных препаратов или методов диагностики, или профилактики заболевания [27].

Основной целью в лечении БА является достижение контроля симптомов заболевания, что прежде всего предполагает уменьшение обострений, обусловленных в

том числе респираторными инфекциями. Вирусные инфекции служат одной из основных причин обострений астмы, а экспрессия ИФН- γ -индуцируемого белка весом 10 кДа (IP-10) и цистеиниловых лейкотриенов (cysLT) повышается при вирус-индуцированной бронхиальной астме. Исследования показали, что из бронхов больных бронхиальной астмой может быть выделено до 100 вирусов. В последние годы получены доказательства появления повторных эпизодов бронхиальной обструкции у детей раннего возраста после перенесенных бронхолитов как рино-синцитиальной вирусной (RSV), так и риновирусной (hRV) этиологии или смешанной вирусной инфекции. hRV-инфекцию диагностируют у 40 % госпитализированных с бронхолитом детей. Установлено, что hRV-инфекция у детей с ранним синдромом бронхиальной обструкции является не только фактором риска повторной бронхиальной обструкции, но и фактором риска БА к школьному возрасту. Респираторные вирусы могут вызывать обострение БА с помощью разных механизмов [27].

Актуальна проблема гриппа как острой вирусной инфекции (ОРИ), вызывающей ежегодные эпидемические вспышки. Тяжелое течение ОРИ и гриппа у 20-30% больных детей сопровождается развитием осложнений, таких как возникновение вторичного иммунодефицитного состояния; дисбиоза слизистых оболочек, созревания функциональных систем, формирование хронической патологии легких, почек, желудочно-кишечного тракта, поражение центральной нервной системы, нередко с симптомами нейротоксикоза (головная боль, энцефалопатия, менингеальные симптомы). Одной из наиболее частых причин летального исхода при тяжелой форме гриппа является энцефалопатия в сочетании с гемодинамическими расстройствами. Грипп особенно опасен для детей и взрослых с бронхиальной астмой, длительно получающих ингаляционные кортикостероиды. Опасности связаны со способностью вируса гриппа подавлять иммунные реакции организма и нарушать обменные процессы, тем самым усугубляя тяжесть заболевания и вызывая его декомпенсацию. У детей, больных бронхиальной астмой, присоединение гриппа не только вызывает приступ, но и существенно ухудшает состояние бронхов, затрудняя наступление ремиссии [38]. Дети, страдающие аллергическими заболеваниями, особенно бронхиальной астмой, нуждаются в защите от острых респираторных инфекций, поскольку многочисленными исследованиями установлено, что респираторные вирусные инфекции могут приводить к обострениям и неконтролируемому течению бронхиальной астмы [4,9-11,32,34,40].

Респираторные вирусы могут вызывать обострение БА с помощью разных механизмов. Вирусные инфекции могут вызывать повреждение эпителия и провоцировать воспаление бронхиального дерева, что может приводить к возникновению симптомов БА. Другим механизмом является выработка вирусспецифичных IgE, которые идентифицированы для респираторно-синцитиального вируса и вируса парагриппа, причем эти вирусы могут вызывать выработку и высвобождение медиаторов аллергии из клеток легких человека [27].

Сенсибилизирующие свойства вирусов хорошо известны. У детей с БА выявлена значительно более высокая по сравнению со здоровыми детьми сенсибилизация к вирусам гриппа, парагриппа, адено- и респираторно-синцитиальному вирусу [8,27,28].

Вирусы, вызывающие ОРИ, повреждают защитные механизмы дыхательных путей, нарушают мукоцилиарный клиренс и создают благоприятные условия для их инфицирования пневмококком (*S. pneumoniae*) и другими бактериальными агентами [7]. В большинстве отечественных и зарубежных литературных источников основным возбудителем, колонизирующим нижние отделы дыхательных путей у пациентов с респираторной патологией, обозначен *S. pneumoniae* независимо от региона и возраста. *S. pneumoniae* является одним из наиболее частых бактериальных патогенов при БА (42,3% случаев). Пневмококк в зависимости от антигенных свойств

полисахаридной капсулы подразделяется более чем на 90 серологических типов, 23 из которых — наиболее вирулентные. Одной из особенностей данного возбудителя является высокий уровень носительства у здоровых людей. Микроорганизмы у больных БА оказывают двойное действие: с одной стороны, сенсибилизирующее, с другой — бактериальная инфекция (в том числе *S. pneumoniae*) вызывает хроническое неспецифическое воспаление в бронхах, усиливая их гиперреактивность [5,6,12-17]. В ряде работ доказано, что при БА микроорганизмы также выступают в качестве аллергенов. По данным И.В. Лукачева и др., 78,4% детей с БА имеют полисенсибилизацию к бактериальным антигенам, моносенсибилизация выявлена в 11,4% случаев. При этом наиболее часто среди бактериальных аллергенов встречаются *S. pneumoniae* (42,3%), *H. influenzae* (39,7%), *K. pneumoniae* (38,4%), *S.aureus* (34,6%). Установлено, что эпизоды свистящего дыхания чаще наблюдаются у детей младше 5 лет с колонизацией *S. pneumoniae* [17-21].

Таким образом, иммунопрофилактика инфекционных заболеваний при бронхиальной астме имеет два стратегических направления. Во-первых, вакцинация против респираторных инфекций является важным компонентом профилактики обострений и вторичных осложнений у больных с данной патологией. Второе направление — это вакцинация и ревакцинация против бактериальных и вирусных инфекций в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок [28].

В настоящее время с целью вакцинации против пневмококковой инфекции на территории Российской Федерации, как и во всем мире, доступны вакцинные препараты: 23-валентная полисахаридная пневмококковая вакцина (ППВ23) и 13-валентная конъюгированная полисахаридная пневмококковая вакцина (ПКВ13).

Для вакцинации против гриппа доступны как сплит-, так и субъединичные противогриппозные вакцины. Анализ результатов, приводимых разными авторами при иммунизации пациентов с бронхиальной астмой против пневмококковой инфекции и гриппа, показал хорошую переносимость препаратов ППВ23, ПКВ13 и противогриппозных вакцин при различных схемах вакцинации.

Вакцинация против пневмококковой инфекции. Накоплен большой опыт применения пневмококковых вакцин, которые существенно улучшают клиническое течение БА с достижением длительной ремиссии заболевания [22-25]. Применение вакцин против пневмококка преследует не только профилактические цели, но и может снизить распространение антибиотикорезистентных штаммов пневмококка, появляющихся в результате неконтролируемого применения антибиотиков. Предложение использования вакцинопрофилактики в борьбе с антибиотикорезистентностью рассмотрено в Распоряжении Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года».

Вакцинацию против пневмококковой инфекции у пациентов с БА проводят амбулаторно — в кабинете вакцинопрофилактики поликлиники, возможна вакцинация больных БА при выписке из стационара при удовлетворительном состоянии пациента. Медикаментозная подготовка или сопровождение вакцинации с дополнительным назначением лекарственных средств индивидуальна. Осмотр пациента с БА перед вакцинацией против пневмококковой инфекции проводит врач-терапевт, врач-педиатр или врач другой специальности. У взрослых пациентов с БА при вакцинации против пневмококковой инфекции с использованием различных препаратов и схем иммунизации на фоне проводимой базисной терапии получен ряд положительных эффектов.

Клинический эффект у взрослых пациентов с БА наиболее изучен при использовании вакцинации против пневмококковой инфекции по схемам: только поликомпонентная полисахаридная вакцина (ППВ23), только поликомпонентная конъюгированная вакцина (ПКВ13), последовательное введение ППВ23/ПКВ13 с интерва-

лом 8 недель и ПКВ13/ППВ23 с интервалом 8 недель. Через 1 год после вакцинации меньший эффект в отношении числа пациентов без обострений БА отмечался в группе пациентов, получивших вакцинацию против пневмококковой инфекции по схеме ППВ23 и затем ПКВ13 (38,8%, $p < 0,05$ по сравнению с исходным значением). Остальные схемы вакцинации (только ППВ23, только ПКВ13, ПКВ13/ППВ23) приводили к значимому увеличению количества пациентов без обострений БА (56-84,8%, $p < 0,001$ по сравнению с исходным значением) [16,30]. Через 4 года после вакцинации только в группе ПКВ13/ППВ23 отмечалось значимое увеличение числа пациентов без обострений БА по сравнению с исходным значением, составившее 48,1% ($p < 0,01$). В отношении числа пациентов с БА, не принимавших антибактериальных химиопрепаратов, на первом году после вакцинации выявлено значимое увеличение в группах ПКВ13, ППВ23 и ПКВ13/ППВ23, через 4 года данный показатель был выше исходных значений только в группах ПКВ13 и ПКВ13/ППВ23. Через 1 год у пациентов с БА все схемы вакцинации, кроме ПКВ13/ППВ23, приводили к значимому увеличению числа пациентов без госпитализаций, через 4 года только в группе ПКВ13 выявлено значительное увеличение числа пациентов с БА без госпитализаций по сравнению с исходным показателем (81,8% против 54,5%, $p < 0,05$).

У детей и подростков с БА в основном применялась моновакцинация с использованием в основном ППВ23. У большинства (94,3%) детей с БА поствакцинальный период протекал без особенностей. Наблюдение за пациентами осуществлялось не более 1-1,5 года, частота приступов БА снижалась на 40-60% по сравнению с аналогичным сроком до вакцинации. Применение ППВ23 в сочетании с противогриппозной сплит-вакциной у детей с бронхиальной астмой способствует профилактике частых респираторных заболеваний и обострений астмы на их фоне [22-26, 33,35, 37, 39].

Вакцинация против пневмококковой инфекции у больных БА приводит к элиминации возбудителя из мокроты. Так, у детей с БА однократное введение пневмококковой вакцины способствует элиминации *S. pneumoniae* из мокроты в 88% случаев, а в остальных случаях приводит к переходу ассоциации микробов в монокультуру [31]. При анализе микробного спектра мокроты, полученной у детей с бронхиальной астмой во время обострений, триггерами которых были ОРИ, из 48 образцов до вакцинации и в течение года после вакцинации из 40 образцов в группе моновакцинации ППВ23 элиминация *S. pneumoniae* из мокроты была достигнута в 35,5% случаев, соответственно в группе детей получивших одновременно ППВ23 + слит вакцину против гриппа — в 56,7%. В отношении других микробов статистически значимых изменений не регистрировали. Наблюдавшаяся после вакцинации ППВ23 элиминация из мокроты *S. pneumoniae*, безусловно, связана с формированием местного защитного иммунитета, который препятствовал колонизации слизистой оболочки дыхательного тракта инвазивными штаммами пневмококка либо способствовал устранению персистирующих штаммов [2].

Вакцинация против пневмококковой инфекции сопровождается у пациентов с БА увеличением содержания IgG к смеси полисахаридов, входящих в состав вакцины. Анализ уровня IgG к полисахаридам вакцинных штаммов *S. pneumoniae* в сыворотке крови детей с бронхиальной астмой обнаружил их исходные значения от 55,1 до 60,0 УЕ, в группах наблюдаемых детей при схемах как моновакцинации ППВ23, так сочетания ППВ23 + слит вакцина против гриппа они были сопоставимы. Введение ППВ23 у детей, как и сочетанное введение ППВ23 + слит вакцины против гриппа у пациентов с БА, привело к статистически значимому нарастанию уровня IgG к полисахаридам вакцинных штаммов *S. pneumoniae* через 3 месяца и составило соответственно 77,8 УЕ и 81,1 УЕ. Мы обратили внимание на то, что уровень IgG в сыворотке крови детей с бронхиальной астмой в таких же высоких значениях сохранялся на протяжении всего года наблюдения. При этом иммунологическая эффек-

тивность в отношении формирования IgG к полисахаридам вакцинных штаммов *S. pneumoniae* при сочетанной вакцинации против пневмококковой и гриппозной инфекций была у детей с легким персистирующим течением заболевания статистически значимо выше, чем при моновакцинации ППВ23. В то же время, у детей со среднетяжелым течением бронхиальной астмы сочетанная вакцинация сопровождалась выраженным клиническим эффектом, однако статистически значимый прирост IgG к полисахаридам вакцинных штаммов *S. pneumoniae* сохранялся лишь в первые 6 месяцев после иммунизации [3,29]. Снижение уровня IgE к *S. pneumoniae* свидетельствует о гипосенсибилизирующем действии вакцинации [18-20].

Снижение числа обострений БА на фоне вакцинации против пневмококковой инфекции приводит к улучшению уровня контроля заболевания. Было проведено исследование по оценке уровня контроля с использованием специального вопросника по контролю БА — ACQ-5 (Asthma Control Questionnaire). Полученные результаты свидетельствовали об улучшении уровня контроля БА на фоне вакцинации против пневмококковой инфекции (снижение показателя по ACQ-5 с 2 [1,5; 1,8; 3] баллов (отсутствие контроля БА) до 0,6 [0; 1] балла (контроль БА), $p < 0,001$) [30].

Вакцинация против вируса гриппа. Респираторные вирусы, в том числе вирус гриппа, вызывают обструкцию преимущественно малых дыхательных путей и бронхиальную гиперреактивность, которые служат одной из основных причин обострения БА.

Гриппозная вакцина содержит РНК гриппозного вируса и является сильным интерференогеном: доказано повышение уровня ИФН- γ после введения вакцины, и это может предотвратить заболевание, связанное с заражением другим респираторным вирусом [27].

Согласно данным ряда исследований при анализе переносимости противогриппозной вакцинации детьми с различной патологией, в том числе часто болеющих, детей с аллергическими заболеваниями, патологией нервной системы, патологией почек и мочевыводящих путей, патологией желудочно-кишечного тракта и с редко встречающимися заболеваниями — процент местных реакций на введение противогриппозной вакцины варьировал от 16,4% в группе детей с заболеваниями желудочно-кишечного тракта до 20,5% в группе часто болеющих детей, составляя в среднем 18,3%. При этом в большинстве случаев наблюдалась слабая по своей выраженности реакция. Процент сильных местных реакций варьировал от 0% в группе детей с редко встречающейся патологией до 3,6% в группе часто болеющих детей, составляя в среднем 3,3%. Большинство исследователей при оценке эффективности противогриппозной вакцинации указывают ее выраженное влияние на показатели заболеваемости гриппом. Но во многих сообщениях отмечается также и снижение заболеваемости другими ОРИ как среди взрослых, так и детей. Согласно литературным данным противогриппозная вакцинация влияет на заболеваемость не только гриппом, но и другими ОРИ. Так, отмечено в течение гриппозного сезона частота эпизодов ОРИ на одного привитого ребенка составила 0,69 по сравнению с 0,89 для непривитых. Это влияние особенно ярко проявляется у детей с аллергией и бронхиальной астмой, как известно, наиболее склонных к частым ОРИ [36].

Результаты вакцинации субъединичной противогриппозной вакциной, проведенные в 2008-2009 гг. у пациентов с патологией респираторного тракта (в том числе с БА), показал, что за год после вакцинации субъединичной противогриппозной вакциной количество обострений основного заболевания уменьшилось в 1,5 раза по сравнению с предыдущим годом ($p < 0,01$). У пациентов с бронхиальной астмой улучшился контроль основного заболевания. В целом, прирост уровня IgG к различным подтипам вируса после вакцинации наблюдался у 91% пациентов. При этом уровень IgG после вакцинации увеличился от 2 до 20 раз [39,40].

Вакцинация против вируса гриппа у пациентов с БА приводит к снижению частоты и длительности обострений и госпитализаций в 2 раза. Также отмечается синтез антител в защитных титрах к вакцинным штаммам вируса гриппа [10,11,41,42].

Тяжесть течения бронхиальной астмы привлекает пристальное внимание к исследованиям, направленным на уменьшение обострений заболевания. У больных бронхиальной астмой триггером обострения нередко является респираторная инфекция. Воздействие вирусов, колонизация слизистой оболочки дыхательных путей бактериями приводят к микробному повреждению и воспалению в ответ на бактериальную инфекцию, облегчается процесс проникновения аллергенов в организм и, как следствие, обострение бронхиальной астмы. В связи с вышеперечисленным, приобретает большое значение повышение резистентности путем усиления адаптивного иммунитета.

Вакцинопрофилактика позитивно влияет на активность эпидемического процесса при пневмококковой инфекции. При проведении активной иммунизации пневмококковыми вакцинами уменьшается частота обнаружения в мокроте пневмококка. Наблюдавшаяся после вакцинации пневмококковыми вакцинами элиминация из мокроты *S. pneumoniae* была связана с формированием местного защитного иммунитета, который препятствовал колонизации слизистой оболочки дыхательного тракта инвазивными штаммами пневмококка. Следует отметить, что через 1 и 4 года пневмококк высеивался только у привитых ППВ23.

При иммунизации взрослых пациентов с БА выявлено преимущество первоочередного введения конъюгированной полисахаридной вакцины, дающей формирование полноценной активации системы врожденного иммунитета с экспрессией иммунологической памяти. Показано улучшение качества жизни. У больных БА через 1 и 4 года после вакцинации против пневмококковой инфекции при использовании как ППВ23, так и ПКВ13 показано значимое улучшение уровня контроля заболевания, оцененное с помощью вопросника АСQ-5.

Вакцинация против вируса гриппа у пациентов с БА сопровождается синтезом антител в защитных титрах к вакцинным штаммам, в результате чего уменьшается частота и длительность обострений и госпитализаций. При множественном влиянии на организм больных с атопией различных аллергенов введение ППВ23 и сплит вакцины против гриппа могло привести к суммации антигенного воздействия как при моновакцинации одним из них, так и при сочетании вакцин. Однако, не наблюдалось ни клинических, ни иммунологических маркеров ухудшения течения аллергического заболевания. Напротив, формирование поствакцинального иммунного ответа на полисахариды вакцинных штаммов *S. pneumoniae* привело к уменьшению количества обострений бронхиальной астмы, триггерами которых были острые респираторные заболевания, что, в целом, привело к снижению объема противовоспалительной терапии (путем уменьшения доз принимаемых препаратов либо их отмены). Это, в свою очередь, позволило более успешно подготовить детей к проведению аллергенспецифической иммунотерапии. Результаты проведенных нами исследований послужили обоснованием для включения этих вакцин в комплексное лечение больных бронхиальной астмой.

Применение вакцинных препаратов для предупреждения и/или уменьшения присоединения инфекций дыхательных путей при бронхиальной астме в сочетании со стандартными методами лечения показывает высокую эффективность, позволяет улучшать контроль заболевания и повышать качество жизни пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. Р.М.Хаитов, Н.И.Ильина. М., «ГЭОТАР-Медиа», 2014.

2. Андреева Н.П., Петрова Т.И., Костинов М.П. Влияние активной иммунизации против гриппа и пневмококковой инфекции у детей с бронхиальной астмой на течение заболевания и микробный спектр мокроты. *Российский аллергологический журнал*. 2006, 5:31-35.
3. Андреева Н.П., Петрова Т.И., Костинов М.П. Клиническая эффективность профилактики гриппа у детей с аллергическими заболеваниями органов дыхания. *Медицинская иммунология*. 2011, 13(4-5): 348-349.
4. Афиногенова В.П., Лукачев И.В., Костинов М.П. Иммуноterapia: механизм действия и клиническое применение иммунокорректирующих препаратов. *Лечащий врач*. 2010, 4: 9.
5. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. *Практическое руководство для врачей*. 4-е изд. М.П. Костинов, ред. М., «Медицина для всех», 2013.
6. Гушина Я.С., Маркелова Е.В., Костинов М.П., Ибрагимова Е.М. Возможности вакцинации детей с бронхиальной астмой. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2009, 4:17-19.
7. Костинов М.П., Лукачев И.В., Гервасиева С.Н., Жирова С.Н., Магаршак О.О., Карпочева С.В. Динамика уровня общего IgE у детей с бронхиальной астмой, вакцинированных препаратами «PNEUMO-23» и «Act-NiB» в зависимости от исходного уровня сенсибилизации. *Russian journal of Immunology*. 2004, 1: 337.
8. Костинов М.П., Ерофеева М.К., Харит С.М. Эффективность и безопасность вакцинопрофилактики гриппа у разных контингентов. *Всероссийский междисциплинарный журнал TERRA MEDICA*. 2011; 2:7-11.
9. Костинов М.П., Чучалин А.Г., Чебыкина А.В. Особенности формирования поствакцинального иммунитета к гриппу у пациентов с хронической бронхолегочной патологией. *Инфекционные болезни* 2011, 9(3):35-40.
10. Костинов М.П., Чучалин А.Г., Чебыкина А.В. Поствакцинальный иммунитет к гриппу у впервые и повторно вакцинированных больных с бронхолегочной патологией. *Иммунология*. 2011, 32(6):306-310.
11. Костинов М.П. Новый препарат для лечения гриппа и острых респираторных вирусных инфекций. *Инфекционные болезни* 2011, 9(4):29-34.
12. Костинов М.П., Катосова Л.К., Рыжов А.А., Магаршак О.О., Волков И.К., Есьман В.Н. Влияние бактериальных вакцин против пневмококковой и гемофильной b инфекций на микробный пейзаж мокроты у детей с хроническими воспалительными заболеваниями легких. *Russian journal of Immunology*. 2004. 9(S1):336.
13. Костинов М.П., Лукачев И.В., Магаршак О.О., Карпочева С.В., Ванеева Н.П., Ястребова Н.Е. Клинический и иммунологический эффекты вакцины «ПНЕВМО 23» у детей с бронхиальной астмой. *Вакцинация (информационный бюллетень)*. 2004, 2(32):7.
14. Костинов М.П., Катосова Л.К., Рыжов А.А., Волков И.К. Способ профилактики обострений хронических воспалительных заболеваний легких у детей. Патент на изобретение № 2252784, 2005.
15. Костинов М.П., Гервасиева В.Б., Лукачев И.В. Способ профилактики обострений бронхиальной астмы. Патент на изобретение № 2252785, 2005.
16. Костинов М.П., Протасов А.Д., Жестков А.В., Полищук В.Б. Перспективные данные применения пневмококковой 13-валентной конъюгированной вакцины у взрослых пациентов с хронической бронхолегочной патологией. *Пульмонология*. 2014, 4:57-62.
17. Лукачев И.В., Костинов М.П., Шабалина С.В. Бронхиальная астма и бактериальная инфекция. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2003, 3:48-52.
18. Лукачев И.В., Костинов М.П., Шабалина С.В., Гервасиева В.Б., Жирова С.Н. Клинический эффект вакцинации препаратами PNEUMO 23 и ACT-NiB детей, страдающих бронхиальной астмой. *Педиатрия*. 2005, 3:74-77.
19. Лукачев И.В., Костинов М.П., Шабалина С.В., Жирова С.Н. Применения вакцины «PNEUMO-23» в комплексной терапии детей с бронхиальной астмой. *Аллергология и иммунология*. 2004, 5(1):89-90.
20. Лукачев И.В., Костинов М.П., Шабалина С.В., Магаршак О.О., Жирова С.Н. Вакцина «PNEUMO-23» в комплексном лечении детей с бронхиальной астмой. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2004, 3(16):41-44.
21. Лукачев И.В., Костинов М.П., Магаршак О.О., Карпочева С.В. Клиническое течение бронхиальной астмы у детей в процессе вакцинации препаратом «PNEUMO-23». *Детские инфекции*. 2004, 4(9):36-38.

22. Магаршак О.О., Костинов М.П., Рыжов А.А., Сухинин М.В. Пневмококковые вакцины и их место в профилактике осложнений респираторных инфекций и гриппа. Педиатрия. 2010, 1:84-86.
23. Магаршак О.О., Костинов М.П., Краковская А.В., Козлов В.К., Благовидов Д.А., Полищук В.Б., Рыжов А.А., Костинов А.М. Клиническая эффективность против гемофильной типа В и пневмококковой инфекций у детей с хронической патологией органов дыхания. Педиатрия. 2018, 97(2): 122-129.
24. Маркелова Е.В., Гушина Я.С., Костинов М.П., Журавлева Н.В. Клинико-иммунологический эффект вакцинации «ПНЕВМО 23» детей с atopической бронхиальной астмой. Журн. микробиол. 2005, 2:83-85.
25. Маркелова Е.В., Гушина Я.С., Костинов М.П. Эффективность вакцинации «ПНЕВМО 23» у детей с atopической бронхиальной астмой. Russian journal of Immunology. 2004, 9(S1):343.
26. Маркелова Е.В., Гушина Я.С., Костинов М.П., Касснер Л.Н. Клинико- иммунологические аспекты применения поликомпонентной пневмококковой вакцины «ПНЕВМО-23» у детей с atopической бронхиальной астмой. Методические рекомендации. Владивосток, 2004.
27. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». 5-е издание. М., 2017.
28. От профилактического к терапевтическому эффекту вакцин против пневмококковой и гемофильной типа b инфекций у пациентов с бронхолегочной патологией. М.П. Костинов, ред. М., Общероссийский фонд «Здоровье человека», 2007.
29. Петрова Т.И., Андреева Н.П., Голубцова О.И., Кожевникова С.Л., Костинов М.П., Карпачева С.В. Клинико-иммунологическая эффективность вакцинации детей с бронхиальной астмой против пневмококковой инфекции. Аллергология. 2006, 4:27-30.
30. Протасов А.Д. Сравнительная оценка эффективности вакцинации против пневмококковой инфекции у пациентов с бронхиальной астмой при использовании 13-валентной конъюгированной и 23-валентной полисахаридной вакцин. Пульмонология. 2014, 5:52-56.
31. Рыжов А.А., Костинов М.П., Магаршак О.О. Применение вакцин против пневмококковой и гемофильной типа b инфекций у лиц с хронической патологией. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2004, 6(19):24-27.
32. Руководство по клинической иммунологии в респираторной медицине. Под ред. М.П. Костинова, А.Г. Чучалина, М., АТМОСФЕРА, 2016.
33. Соловьева И.Л., Костинов М.П., Кусельман А.И. Особенности вакцинации детей с измененным преморбидным фоном против гепатита В, кори, эпидемического паротита. Ульяновск, УлГУ, 2006.
34. Соловьева И.Л., Кусельман А.И., Костинов М.П., Анохина Е.В. Применение иммуномодулирующих препаратов в подготовке детей к вакцинации. Аллергология и иммунология. 2007, 8(2):206- 208.
35. Сизоненко А.Л., Бениова С.Н., Костинов М.П., Маркелова Е.В., Таранова С.В. Иммунологический эффект вакцинации «Пневмо 23» детей с носительством Streptococcus pneumoniae. Медицинская иммунология. 2009, 11(2—3):289-292.
36. Таточенко В.К., Озерцовский Н.А. Иммунопрофилактика 2018. Москва, 2018.
37. Чучалин А.Г., Биличенко Т.И., Осипова Г.Л., Курбатова Е.А., Егорова Н.Б., Костинов М.П. Вакцинопрофилактика болезней органов дыхания в рамках первичной медико-санитарной помощи населению. Клинические рекомендации. Пульмонология. Приложение. 2015, 2(25):1-19.
38. Чучалин А.Г., Аметов А.С., Костинов М.П., Брико Н.И., Снегова Н.Ф., Галицкая М.Г., Современные подходы к вакцинопрофилактике пневмококковой инфекции у взрослых пациентов групп риска. Эндокринология: новости, мнения, обучение. 2013, 1:85-88.
39. Чебыкина А.В., Костинов М.П., Магаршак О.О. Оценка безопасности и эффективности вакцинации против гриппа пациентов с бронхообструктивным синдромом. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 6(55):50-53.
40. Чебыкина А.В., Костинов М.П. Поствакцинальный иммунитет против гриппа у пациентов с хронической бронхолегочной патологией. Журн. микробиол. 2011, 4:76-80.
41. Чебыкина А.В., Андреева Н.П., Петрова Т.И., Костинов М.П., Рыжов А.А., Протасов А.Д. Новые возможности профилактики гриппа у пациентов с хроническими заболеваниями органов дыхания. Русский медицинский журнал. 2010, 18(24):1473-1476.

42. Jianping H., Xin F., Changshun L. et al. Assessment of effectiveness of Vaxigrip. Vaccine. 1999, 17:57-58.
43. Odelin M., Pozzetto B., Aymaed M. et al. Role of influenza vaccination in the elderly during an epidemic of A/H1N1 virus in 1998—1999: clinical and serological data. Gerontology. 1999, 39:109-116.

Поступила 22.11.18

Контактная информация: Протасов Андрей Дмитриевич, к.м.н.,
443079, Самара, ул. Чапаевская, 89, р.т. (846)332-16-34

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

И.Г.Бажанова, М.В.Брицина, Н.У.Мерцалова, М.Н.Озерецковская

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *BORDETELLA PERTUSSIS* И ЕЕ РОЛЬ В ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКЕ КОКЛЮША

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

Во многих странах мира, несмотря на высокий уровень вакцинации населения, увеличилось число вспышек коклюша во всех возрастных группах. MLST, MLVA и CGH исследования выявили несоответствие генотипов циркулирующих штаммов *B.pertussis* генотипам вакцинных штаммов, вследствие адаптации бактерий к вакцинированному хозяину, что привело к снижению иммунитета и возникновению вспышек заболевания коклюшем. Мутации в генах, кодирующих основные факторы вирулентности, аллельный полиморфизм и редукция генома в циркулирующих штаммах *B.pertussis* являются основой адаптации патогена к иммунизированной популяции и зависят от типа вакцин, используемых для иммунизации популяции. В странах, использующих бесклеточную коклюшную вакцину, доминируют в настоящее время изоляты, содержащие генотипы: ptxA1-ptxC2- ptxP3-prn2- tcfA2-1-fim3-2 и ptxA1- ptxC2- ptxP3- prnA2- tcfA2- fim2-1- fim3-1, а использующих корпускулярную вакцину, доминируют изоляты генотипов ptxA1-ptxC1- ptxP1-prn1-tcfA2- fim2-2 fim3-1 и ptxA1- ptxC1- ptxP1- prn2- tcfA2- fim2-1- fim3-1. Необходимо проведение постоянного мониторинга генотипов циркулирующих штаммов *B.pertussis* для своевременного выявления доминирующего генотипа и его использования в иммунизационной программе в сочетании с вакцинными штаммами *B.pertussis*.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 98—105

Ключевые слова: коклюш, вакцинные штаммы *B.pertussis*, циркулирующие штаммы *B.pertussis*, изоляты, доминирующие генотипы, гены

I.G.Bazhanova, M.V.Britsina, N.U.Mertsalova, M.N.Ozeretskovskaya

GENETIC VARIABILITY OF *BORDETELLA PERTUSSIS* AND ITS ROLE IN VACCINE PREVENTION OF PERTUSSIS

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

In many countries of the world despite the extensively vaccination against pertussis has increased the incidence of the whooping cough in all age group of the population. The MLST, MLVA and CGH investigations revealed the differences in genotypes between the vaccine strains *B.pertussis* and the circulating isolates *B.pertussis* in consequence of adaptation of the bacterium *B.pertussis* to the immunized hosts. It is lead to waning immunity and outbreak of incidence of pertussis. The mutations in the genes encoding the major virulence factors, the allelic polymorphism and decreasing the genome size of *B.pertussis* strains are the basis of the *B.pertussis* adaptation to the immunized hosts and dependent on the type of the vaccine used for immunization Programme. In countries that use acellular pertussis vaccine for vaccination programme the dominant isolates genotypes are: ptxA1-ptxC2- ptxP3-prn2- tcfA2-1-fim3-2 и ptxA1- ptxC2- ptxP3-

prnA2- tcfA2- fim2-1- fim3-1, and that use the cellular pertussis vaccine the dominant isolates genotypes are ptxA1-ptxC1- ptxP1-prn1- tcfA2- fim2-2 fim3-1 и ptxA1- ptxC1- ptxP1- prn2- tcfA2- fim2-1- fim3-1. The constant monitoring of the genotypes of isolates *B.pertussis* is necessary to reveal the dominant genotypes and include them in the national immunization programme in combination with vaccine strains *B.pertussis*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 98–105

Key words: pertussis, *B. pertussis* vaccine strains, *B. pertussis* circulating strains, isolate, dominant genotypes, genes

Коклюш является контагиозным заболеванием, вызываемым бактериями *Bordetella pertussis* и поражающим все возрастные группы населения, но особенно опасным для грудных младенцев [1,5,12,32,34]. По данным ВОЗ, в 2008 г. в мире было зарегистрировано 16 млн случаев коклюша, 195 тысяч детей погибли от этого заболевания. В 2011 г. в мире было зарегистрировано 162047 случаев заболевания коклюшем, из них тяжелых 38040.

В 2005, 2010, 2013 — 2016 гг. заболеваемость на 100 000 детей в возрасте до 14 лет составляла 19,8; 20,6; 18,3; 18,3; 24,4 и 30,392, соответственно. Вакцинация против коклюша, начавшаяся в 1940-х годах, резко снизила уровень заболевания, однако в последующие годы постепенно снова началось повышение вспышек коклюша, особенно увеличившееся в последнее десятилетие, несмотря на высокий уровень охвата населения прививками во всех странах мира [2,4,12,14 — 16,18,25,28,30,31,37].

Для выяснения причин этого явления в ряде стран мира проведены исследования генома популяции *B.pertussis* в разные периоды с помощью современных методов: Multi-Locus Sequence Typing (MLST); Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA); Comparative Genomic Hybridization (CGH) с использованием геном-широких ДНК микрорядов для филогенетических исследований.

Проведенные исследования показали, что основными причинами возврата коклюша являются: 1. Несоответствие генотипов *B.pertussis* вакцинных штаммов, генотипам циркулирующих штаммов *B.pertussis*, вследствие адаптации патогена к изменяющимся условиям существования, связанным с вакцинацией; 2. Снижение напряженности иммунитета [3,6,7,14 -18,20,24,29,30,38]. Кроме того, усовершенствование методов диагностики также способствовало выявлению даже нетипичных форм заболевания у подростков и взрослых [3,6,36].

Мутации в генах, кодирующих основные факторы вирулентности, аллельный полиморфизм, редукция генома в циркулирующих штаммах *B.pertussis* как основа адаптации патогена к условиям вакцинации популяции. Исследования геномов циркулирующих штаммов позволило выявить значительные различия между циркулирующими и вакцинными штаммами, которые происходят благодаря мутациям в генах, кодирующих факторы вирулентности [16], аллельному полиморфизму [37] и редукции генов, осуществляющихся с помощью мобильных генетических вставных элементов (ISE элементов) и *Bvg* локуса, содержащего *Bvg A* и *Bvg S* гены, контролирующие экспрессию генов, ассоциированных с вирулентностью, что связано с увеличивающейся вирулентностью [9,15]. Потерянными или инактивированными генами являются включенные, главным образом, в мембранный транспорт, метаболизм малых молекул, регуляцию экспрессии гена и синтез поверхностных структур [9,20].

Потеря в геноме *B.pertussis* районов различий (RDS)-BP0910A-BP00930 совпадало с введением корпускулярной коклюшной вакцины в 50-е годы, а потеря RDS-BP1948-BP1962 произошла после введения бесклеточной коклюшной вакцины (БКВ) и ассоциируется с распространением большинства современных штаммов *B.pertussis* [22]. Потеря генного материала, происходящая в настоящее время у *B.pertussis*, отмечается во многих публикациях как адаптация патогена к высокому уровню вакцинации населения и связанное с увеличением вирулентности патогена и повышением им экспрессии коклюшного токсина [9,14,19,20,38]. Изучение

в Нидерландах геномов 171 штамма *B.pertussis*, изолированных с 1949-2008 гг. в Нидерландах, Швеции, Японии, Австралии, Кении и Сенегале, показало, что ядро генома *B.pertussis* состоит из 3281 гена, законсервированных во всех штаммах *B.pertussis* и представляющих 84,8 % всех генов, найденных в 171 штамме. CGH анализом выявлено, что величина генома *B.pertussis* прогрессивно уменьшилась за последние 60 лет. Содержимое генома высоко коррелируется с типом промотера коклюшного токсина *ptxP* [20,38].

Динамика изменения генотипов циркулирующих штаммов *B.pertussis* за периоды с начала вакцинации против коклюша до настоящего времени. Популяция *B.pertussis* изменилась во многих странах мира, начиная с 1950-х годов, после введения иммунизации населения корпускулярной коклюшной вакциной. Антигенные различия были найдены между циркулирующими и вакцинными штаммами относительно коклюшного токсина (*ptx*) и пертактина (*prn*) [23]. В более поздних исследованиях был найден полиморфизм и в других поверхностных антигенах, включая фактор колонизации трахеи — фактор А (*TcfA*), серотип 2 и 3 фимбриальных субъединиц (*Fim2* и *Fim3*) и промоторный район коклюшного токсина — оперона *ptxP* [35].

С 1990-х годов увеличилась частота популяции циркулирующих штаммов с *ptxP-3* аллелем и совпала с увеличением числа заболеваний коклюшем. Штаммы *B.pertussis* с *ptxP-3* аллелем отличались повышенной вирулентностью. С 1993-1996 гг. уровень количества изолятов *B.pertussis* с *ptxP-3* аллелем был сравнительно невысоким, а начиная с 1996 г. и по настоящее время держится на высоком уровне [5].

MLST анализ показал полиморфизм 3 генов за 1993-2004 гг. *ptxP*, *fim3* и *prn* у 158 штаммов *B.pertussis*: *ptxP* наблюдался 2 аллелями: *ptxP1* и *ptxP3*, ген фимбрий — 4 аллелями: *fim3-1*, *fim3-2*, *fim3-3* и *fim3-4* и *prn3* аллелями: *prn1*, *prn2* и *prn3*; наблюдались также 9 различных MLST профиля в 158 изолятах [19].

Штаммы с *ptxP1* аллелем постепенно сменились на штаммы с *ptxP3* аллелем, которые доминируют с 1998 г. во многих странах мира.

PtxP1 аллель был связан с *fim3-1* (100% связь) и 3 *prn* аллелями: *prn1*, *prn2* и *prn3* (связь соответственно 16%, 30% и 54%). MLST 113 преобладала до 1996 г. (с частотой 61% — 42%), затем численность ее значительно уменьшилась с 1996-1999 гг., после чего уже не была определяема. MLST 111 была определена в период с 1994-1997 гг. (с частотой 9 — 25%); MLST 112 штаммы были найдены за весь период с частотой 8-22%.

В противоположность, *ptxP3* был связан с 2 *fim3* аллелями *fim3-1* и *fim3-2* (связь соответственно 52% и 48%). *PtxP1* и *ptxP3* были ассоциированы с *prn1*, *prn2* и *prn3* аллелями (связь 2%, 96%, 2%). В контраст *ptxP1*, *ptxP3* был в большей степени связан с *prn2-3* аллелем. MLST312 преобладал с 1998-2004 гг. (с частотой 44% и 58% соответственно). MLST322 сначала был определен в 1997 г. (частота 6%) и преобладал в период 2000-2003 гг. (с частотой 50-85%). В этот период отмечено увеличение *ptxP-3* — *fim3-2*. Предполагается что аллель *ptxP3* происходит из аллеля *ptxP1* при потере в геноме 23000 br [19].

Происхождение промотера коклюшного токсина P3 и его связь с эпидемиями коклюша. Штамм *B.pertussis*, несущий в генотипе аллель *ptxP3*, впервые был определен в 1988 г. в Нидерландах. Предполагается, что этот аллель происходит из *ptxP1*, который преобладал в период 1950-1989 гг. Была представлена модель эволюции *ptxP-1* в *ptxP-3* аллель. Предположительно, что точка мутации предшествовала потере районов различий *RD₃*, *RD₅* и *RD₁₀*, 2 пункта точечных мутаций, найденных в *ptxP* и *fim3*, привели к появлению 3 линий: *ptxP1- fim3-1*; *ptxP3- fim3-1* и *ptxP3- fim3-2*. Большинство штаммов *ptxP3- fim3-2* линии содержат *prn2* (98 %). CGH и MLVA анализы показывают, что *ptxP1* и *ptxP3* штаммы *B.pertussis* представляют разные линии, тем не менее, *ptxP3- fim3-1* и *ptxP3- fim3-2* не были различены этими методами, что, возможно, отражает происхождение от общего предшественника. Поскольку *fim3-2*

не был определен до 1996 г., возможно, что мутация в *ptxP3- fim3-1* штаммах результировала в *ptxP3- fim3-2* линию. Но авторы не исключают альтернативную гипотезу, что *ptxP3* аллели появились отдельно: *ptxP3- fim3-1* и *ptxP3-fim3-2* [19].

Отсутствие 2 районов: RD_3 и RD_5 в геноме *V.pertussis* было найдено во всех анализируемых датских штаммах с 1993-2004 гг. перед появлением 2 аллелей *ptxP3*. Отсутствие RD_{10} района было характерно для *ptxP3* линии, возможно, что это удаление предшествовало точечной мутации в *ptxP3* или происходило ранее в истории этой линии. Возможно, эта потеря дает селективное преимущество в клональном расширении и замещении *ptxP* штаммов, еще содержащих RD_{10} . Анализ *V.pertussis* штаммов из различных Европейских стран выявил отсутствие RD_{10} в *ptxP3* штаммах. RD_{10} присутствовал во всех Европейских *ptxP1* изученных штаммах. Штаммы, где RD_{10} отсутствовал, были найдены в Австралии, Италии и США, во Франции и в Финляндии. Недавно отсутствие RD_{10} было найдено во всех штаммах соответствующего PFGE профиля (SR11), ассоциированных с национальными эпидемиями [19]. В Австралии после эпидемии коклюша в 2008-2010 гг. 84% изолятов были *ptxA1 ptxP3/prn2* [21]. В Корее штаммы, несущие *ptxP3*, появились в 2009 г., достигли 100% в 2012 г. и ассоциируются с настоящим увеличением заболеваемости коклюшем.

Исследования 2006 г. показали наличие *ptxP3* аллеля, ассоциирующегося с высокой экспрессией *ptx* и с увеличенной вирулентностью изолятов [38]. Этот штамм доминировал в Нидерландах и способствовал возрождению коклюша. Штаммы, несущие *ptxP1* аллель, такой же как шт. *Tahama1*, экспрессировали более низкий уровень *ptx*, чем *ptxP3* штаммы, превратившиеся в преобладающие в настоящее время. 71 из 76 усиленных изолятов (93%) имели *ptxP3* аллели; 5 усиленных образцов (7%) имели *ptxP1* аллель и 4 из них были *ptxP1/7* изотипом [5,19].

Появление высокой степени полиморфизма в генах, кодирующих основные факторы вирулентности в циркулирующих штаммах *V.pertussis*. Исследование 110 образцов назофарингиальных мазков из 3 австрийских городов за период 2001-2008 гг. выявило полиморфизм в генах, кодирующих 2 субъединицы коклюшного токсина (*ptxA* и *ptxB*), фимбриального адгезина (*fimD*), фактора колонизации трахеи (*tcfA*) и сенсорного белка вирулентности (*bvgS*). *PtxP* был представлен *ptxP3*, ассоциированным с повышенной продукцией коклюшного токсина. Обнаружены субтипы *prn*, *prn1/7*, *prn2*, *prn3* с преобладанием невакцинного типа *prn2*, найденного вне Австрии [37]. MLVA анализ выявил высокий уровень полиморфизма с отсутствием MLVA типа 29. Анализ полиморфизма *ptxA*, *ptxB*, *fimD*, *tcfA* и *BvgS* генов показал наличие штамма, представляющего смесь генотипов вакцинного штамма *Tahama1* и клинического изолята 2006 г. (L517). 93% образцов выявляли *ptxP3* аллель [36].

Район 1 *prn* гена является районом с высокими сиквенс-различиями. Было найдено 13 вариантов *prn* при доминировании *prn2*, что отмечено во многих странах (Аргентина, Франция, США, Польша, Финляндия, Швеция, Россия, Япония) [18,26], в Австралии только 2% *ptxP3* образцов были не *prn2* варианты. Однако, после эпидемии в 2008-2010 гг. в Австралии 84% образцов были *ptxP3/ prn2*. 16% австрийских образцов были *ptxP3/ prn2* и 1% *ptxP3/ prn1*. В целом, в Австрии 17% образцов были *ptxP3/ prn2*, 16% *ptxP3/ prn3*. Высокая вариабельность найдена в повторяющихся элементах, таких как пентапептидные повторения в *prn* вариабельном районе 1 [36].

Были проведены исследования геномов аденилатциклазного гемолизина, играющего важную роль в вирулентности *V.pertussis*, *V.parapertussis* и *V.bronchiseptica*, несущего на С-концевом районе протективные эпитопы и рецептор сайта присоединения к клеткам хозяина. Геномный анализ этого района показал отсутствие полиморфизма у *V.pertussis* и *V.parapertussis* изолятов, но значительную вариабельность у *V.bronchiseptica*.

Появление циркулирующих штаммов *V.pertussis*, дефицитных в продукции *prn* и других антигенов, в ряде стран, использующих БКВ вакцину, как стратегия приспособления *V.pertussis* к давлению вакцинации. Скрининг 722 исследуемых изолятов, собранных в США в 2010-2016 гг., идентифицировал 2 изолята Prn- и Fha-дефицитными. 3 дополнительно Fha-дефицитных лабораторных штамма были также определены в исторической коллекции 65 изолятов из периода до 1935 г. Только 4 изолята содержали мутацию генов, вовлеченных в продукцию Fha. Хромосомы двух Fha-дефицитных изолятов включали структурные вариации, которые, похоже, не влияли на продукцию Fha. Интеграция IS элементов в FhaV была также определена и в ранее идентифицированном rtx-дефицитном изоляте, который еще продуцировал нормальный уровень Fha [10].

Большинство из современных изолятов, rpn-негативные штаммы из США, имели ранее rpn2 аллель, который был преобладающим типом с 1990-х годов. Однако, мутации, вызывая инактивацию экспрессии rpn-гена, по данным других авторов, имели место в rpn1, ptxA2, ptxP1 генотипе и были в штамме MT186, принадлежащему к SNP типу V или связаны с MT194 или MT226, принадлежащим к SNP типу I. 2 изолята из Финляндии, которые ранее имели rpn1, были также rpn-негативными.

Изоляты, которые не экспрессируют rpn, из Австралии и других стран, не принадлежат к одному клону, и в настоящее время почти одновременное появление и расширение rpn-негативных изолятов в разных странах было независимым явлением, а не глобальным распространением одного клона. Мультипроисхождение rpn-негативных штаммов, похоже, стратегия к селективному давлению вакцинации на бактерии [21]. Многочисленные исследования показали, что rpn-отрицательные мутанты не колонизируют легкие мышей, также как изоляты, экспрессирующие rpn. Однако, они были более инвазивны в эпителиальных клетках и присутствовали в течение долгого периода. Prn-негативные штаммы имели большее преимущество роста *in vitro*, чем rpn-позитивные, что могло быть выигрышным в поддержании высокого уровня распространения в популяции и связано с увеличением числа инфекций с rpn-негативными изолятами, идентифицируемыми во Франции, Австралии и других странах. Потеря rpn может, по-видимому, компенсироваться внутри *V.pertussis* [10].

Исследования в Австралии на больных коклюшем детях моложе 3 мес не показали связи тяжести заболевания коклюшем со статусом rpn- и rpn+, но она увеличивалась с изолятами, содержащими ptxP3 аллель [13]. В Канаде в изолятах 2002-2014 гг. преобладали также rpn дефицитные штаммы *V.pertussis* [33]. Адаптация штаммов *V.pertussis* к вакцинированной популяции в прогрессе происходит при потере генетического материала через IS элементы. Число IS элементов, содержащихся в геноме изолятов, временно увеличивается во время эпидемии [11,26]. Современные изоляты не приобретают дополнительный материал в сравнении с вакцинными штаммами или изолятами довакцинной эры.

Зависимость адаптационной изменчивости генотипов изолятов *V.pertussis* от типа вакцин, используемых для иммунизации популяции. Первые коклюшные вакцины, содержащие убитые формалином или теплом клетки бактерий *V.pertussis* — корпускулярные вакцины (КВ) были введены во многих странах мира в 1950-е годы. И с 1967-1978 гг. общие профили генотипов изолятов были ptxP1, ptxA2, prnA1, fim3B и ptxP1, ptxA2, prnA3 [27]. В ряде стран мира, где продолжается вакцинация популяции КВ, в настоящее время доминирующими генотипами изолятов *V.pertussis* с 2000-2013 гг. являются два невакцинных генотипа: ptxA1-ptxC1-ptxP1-prn1-tcfA2-2-fim3-1 и ptxA1-ptxC1-ptxP1-prn2-tcfA2-fim2-1-fim3-1 [27]. Замена КВ на БКВ в большинстве европейских стран, США и др. привело к появлению новых изолятов *V.pertussis* с невакцинным генотипом, содержащим ptxA1-ptxC2-ptxP3-prn2-tcfA2-1-fim3-2 и ptxA1-ptxC2-ptxP3-prnA2-tcfA2-fim2-

1- fim3-1 профили. Генетические профили этих изолятов *B.pertussis* отличаются от изолятов *B.pertussis*, циркулирующих в странах, использующих для вакцинации населения KB [6,8,26,27].

Исследования изолятов, выделенных в 2006-2012 гг. в России, показало 14 различных генотипов, из которых 98,6% принадлежали к новым невакцинным генотипам ptxP3, fim3B и fim3A, prn2/prn4/prn3/prn9 — штаммы 322 и 329 и к смешанным генотипам невакцинных prn9 и вакцинных ptxP2/ fim3A — аллелей шт. 219; невакцинного ptxP3/prn2 и вакцинного fim3A — шт. 312 [1]. Штаммы *B.pertussis* 329 и 322 доминировали в России в 2013-2015 гг. с высокой степенью вирулентности, вызывали тяжелые клинические формы коклюша [1].

Различия генотипов циркулирующих штаммов *B.pertussis* в разных странах мира зависели от состава вакцин, используемых для вакцинации населения. Генетическая изменчивость *B.pertussis* является следствием защиты патогена от воздействия вакцинопрофилактики [14,38]. Совершенствование вакцин — одно из важных условий стратегии борьбы с коклюшем, требующее необходимости проведения постоянного мониторинга генотипов циркулирующих штаммов *B.pertussis* для своевременного выявления доминирующего генотипа с использованием его в производстве коклюшных вакцин. Наличие циркулирующих штаммов со смешанными генотипами свидетельствует о целесообразности использования циркулирующих штаммов *B.pertussis* с доминирующим генотипом в сочетании с вакцинными штаммами *B.pertussis* для национальной иммунизационной программы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Петрова М.С., Попова О.П., Алешкин В.А., Кафарская Л.И., Донских Е.Е., Юсуф Е.В., Остапенко Н.А., Москвина Т.И., Щербакова Т.А. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 15(4): 22-28.
2. Еженедельный эпидемиологический бюллетень. Вакцины против коклюша: документ по позиции ВОЗ, август 2015 г., № 35. <http://www.who.int/wer>.
3. Каратаев Г.И., Сияяшина Л.Н., Медкова А.Ю., Семин Е.Г. Персистенция бактерий *Bordetella pertussis* и возможный механизм ее формирования. Журн. микробиол. 2015, 6: 114-121.
4. Allen A.C., Mills K.H. Improved pertussis vaccines based on adjuvants that induce cell-mediated immunity. *Expert Rev. Vaccines*. 2014 Oct, 13(10): 1253-1264.
5. Anselmo A., Buttinelli G., Ciammaruconi A. et al. Draft Genome Sequence of a *Bordetella pertussis* Strain with the Virulence-Associated Allelic Variant ptxP3, Isolated in Italy. *Genome Announc*. 2015 Sep 10, 3(5): e00944-15.
6. Bailon H., Leyn-Janampa N., Padilla C. et al. Increase in pertussis cases along with high prevalence of two emerging genotypes of *Bordetella pertussis* in Перу, 2012. *BMC Infect. Dis*. 2016 Aug 17, 16: 422.
7. Belcher T., Preston A. *Bordetella pertussis* evolution in the (functional) genomics era. *Pathog Dis*. 2015 Nov, 73(8): ftv064.
8. Bottero D., Gaillard M.E., Basile L.A. et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Bordetella pertussis* strains used in different vaccine formulations in Latin America. *J. Appl. Microbiol*. 2012 Jun, 112(6): 1266-1267.
9. Bouchez V., Caro V., Levillain E. et al. Genomic content of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination. *PLoS One*. 2008 Jun 18, 3(6) e2437.
10. Bouchez V., Hegerle N., Strati F. et al. New Data on Vaccine Antigen Deficient *Bordetella pertussis* Isolates. *Vaccines (Basel)*. 2015 Sep 14, 3(3): 751-770.
11. Bowden K.E., Weigand M.R., Peng Y. et al. Genome Structural Diversity among 31 *Bordetella pertussis* Isolates from Two Recent U.S. Whooping Cough Statewide Epidemics. *mSphere*. 2016 May 11, 1(3) pii, e00036-16.
12. Carbonetti N.H., Wirsing von Künig C.H., Lan R. et al. Highlights of the 11th International *Bordetella* Symposium: from Basic Biology to Vaccine Development. *Clin. Vaccine Immunol*. 2016 Nov 4, 23(11) 842-850. Print 2016 Nov.

13. Clarke M., McIntyre P.B., Blyth C.C. et al. The relationship between *Bordetella pertussis* genotype and clinical severity in Australian children with pertussis. *J. Infect.* 2016 Feb, 72(2) 171-178.
14. van Gent M., Heuvelman C.J., van der Heide H.G. et al. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015 Apr, 34(4) 821-830.
15. Gorringe A.R., Vaughan T.E. *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert. Rev. Vaccines.* 2014 Oct, 13(10): 1205-1214.
16. Haghghi F., Shahcheraghi F., Abbasi E. et al. Genetic Profile Variation in Vaccine Strains and Clinical Isolates of *Bordetella pertussis* Recovered from Iranian Patients. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2014 Jul, 6(3): 178-184.
17. Hardwick T.H., Cassiday P., Weyant R.S. et al. Changes in predominance and diversity of genomic subtypes of *Bordetella pertussis* isolated in the United States, 1935 to 1999. *Emerg. Infect. Dis.* 2002 Jan, 8(1): 44-49.
18. King A.J., Berbers G., van Oirschot H.F. et al. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology.* 2001 Nov, 147(Pt 11): 2885-2895.
19. King A.J., van Gorkom T., Pennings J.L. et al. Comparative genomic profiling of Dutch clinical *Bordetella pertussis* isolates using DNA microarrays: identification of genes absent from epidemic strains. *BMC Genomics.* 2008 Jun 30, 9: 311.
20. King A.J., van Gorkom T., van der Heide H.G. et al. Changes in the genomic content of circulating *Bordetella pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? *BMC Genomics.* 2010 Jan 26, 11: 64.
21. Lam C., Octavia S., Ricafort L. et al. Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 2014 Apr, 20(4) 626-633.
22. Lam C., Octavia S., Sintchenko V. et al. Investigating genome reduction of *Bordetella pertussis* using a multiplex PCR-based reverse line blot assay (mPCR/RLB). *BMC Res. Notes.* 2014 Oct 15, 7: 727.
23. Hijnen M., Mooi F.R., van Gageldonk P.G. et al. Epitope structure of the *Bordetella pertussis* protein P.69 pertactin, a major vaccine component and protective antigen. *Infect. Immun.* 2004 Jul, 72(7): 3716-3723.
24. de Melker H.E., Conyn-van Spaendonck M.A., Rümke H.C. et al. Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg. Infect. Dis.* 1997 Apr-Jun, 3(2): 175-178.
25. de Melker H.E., Schellekens J.F., Neppelenbroek S.E. et al. Reemergence of pertussis in the highly vaccinated population of the Netherlands: observations on surveillance date. *Emerg. Infect. Dis.* 2000 Jul-Aug, 6(4): 348-357.
26. Miyaji Y., Otsuka N., Toyozumi-Ajisaka H. et al. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. *PLoS One.* 2013 Oct 4, 8(10): e77165.
27. Mosiej E., Krysztopa-Grzybowska K., Polak M. et al. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis of *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland in the period 1959-2013. *Med. Microbiol.* 2017 Jun, 66(6): 753-761.
28. Petersen R.F., Dalby T., Dragsted D.M. et al. Temporal trends in *Bordetella pertussis* populations, Denmark, 1949-2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2012 May, 18(5): 767-74.
29. Poynten M., McIntyre P.B., Mooi F.R. et al. Temporal trends in circulating *Bordetella pertussis* strains in Australia. *Epidemiol. Infect.* 2004 Apr, 132(2): 185-193.
30. Sealey K.L., Harris S.R., Fry N.K. et al. Genomic analysis of isolates from the United Kingdom 2012 pertussis outbreak reveals that vaccine antigen genes are unusually fast evolving. *J. Infect. Dis.* 2015 Jul 15, 212(2): 294-301.
31. Sealey K.L., Belcher T., Preston A. *Bordetella pertussis* epidemiology and evolution in the light of pertussis resurgence. *Infect. Genet. Evol.* 2016 Jun, 406:136-143
32. Sedighi I., Karimi A., Amanati A. Old Disease and New Challenges: Major Obstacles of Current Strategies in the Prevention of Pertussis. *Iran. J. Pediatr.* 2016 Jun 12, 26(4): e5514.
33. Shuel M., Lefebvre B., Whyte K. et al. Antigenic and genetic characterization of *Bordetella pertussis* recovered from Quebec, Canada, 2002-2014: detection of a genetic shift. *Can. J. Microbiol.* 2016 May, 62(5):437-441.
34. Sönmez C., Cöplü N., Gözalan A. et al. Serological evaluation of *Bordetella pertussis* infection in adults with prolonged cough. *Microbiyol. Bul.* 2016 Jul, 50(3): 361-370.

35. Vaughan T.E., Pratt C.B., Sealey K. et al. Plasticity of fimbrial genotype and serotype within populations of *Bordetella pertussis*: analysis by paired flow cytometry and genome sequencing. *Microbiology*. 2014 Sep, 160(Pt 9): 2030-2044.
36. Wagner B., Melzer H., Freymüller G. et al. Genetic Variation of *Bordetella pertussis* in Austria. *PLoS One*. 2015 Jul 16, 10(7): e0132623.
37. Weber C., Boursaux-Eude C., Coralie G. et al. Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J. Clin. Microbiol.* 2001 Dec, 39(12): 4396-4440.
38. Xu Y., Liu B. et al. Whole-genome sequencing reveals the effect of vaccination on the evolution of *Bordetella pertussis*. *Sci. Rep.* 2015 Aug 18, 5: 12888.

Поступила 21.01.19

Контактная информация: Бажанова Ирина Глебовна, к.б.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)916-22-63

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Б.А.Шендеров¹, С.М.Юдин¹, А.В.Загайнова¹, М.П.Шевырева^{1,2}

AKKERMANSIA MUCINIPHILA — НОВЫЙ УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ПРОБИОТИК НА ОСНОВЕ ЖИВЫХ КОММЕНСАЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА: ДЕЙСТВИТЕЛЬНОСТЬ ИЛИ ЛЕГЕНДА?

¹Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, ²Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва

В обзоре представлены современные сведения о биологии *Akkermansia muciniphila*, комменсального представителя анаэробной кишечной микробиоты, обладающего выраженной муколитической активностью и способного модулировать различные функции, метаболические и сигнальные реакции у здоровых и больных людей. Установленные зарубежными исследователями благоприятные и негативные эффекты связывают с наличием у этих грамотрицательных бактерий специфических поверхностных мембранных белков, продукцией определенных короткоцепочечных жирных кислот, деградацией муцина, изменением барьерной функции кишечника, продукцией эндотоксина, а также синтезом некоторых нейромедиаторов. Рассматриваются перспективы и сложности создания новых микробных нутрицевтиков и лекарственных препаратов на основе живых клеток *A. muciniphila* или их специфических низкомолекулярных компонентов и метаболитов.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 105—115

Ключевые слова: муколитические бактерии, эндотоксин, мембранные белки, барьерная функция, короткоцепочечные жирные кислоты, пробиотики, нутрицевтики, метабиотики, здоровые и больные люди

B.A.Shenderov¹, S.M.Yudin¹, A.V.Zagaynova¹, M.P.Shevyreva^{1,2}

AKKERMANSIA MUCINIPHILA IS A NEW UNIVERSAL PROBIOTIC ON THE BASIS OF LIVE HUMAN COMMENSAL GUT BACTERIA: THE REALITY OR LEGEND?

¹Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, ²Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Contemporary information on biology of *Akkermansia muciniphila* and the role of these gut mucolytic anaerobic bacteria in physiological functions, metabolic and signaling reactions in human health and diseases are presented in the review. Established by foreign researchers, favorable and negative effects

are associated with the presence in these gram-negative bacteria specific surface membrane proteins, the production of certain short-chain fatty acids and endotoxin, as well as with the ability degrading mucin, changing intestinal barrier function and synthesizing some neurotransmitters. Prospects and difficulties of creation of new microbial nutraceuticals and drugs on the basis of living cells of *A. muciniphila* or their specific low-molecular components and metabolites are considered.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 105—115

Key words: mucolytic bacteria, endotoxin, membrane proteins, barrier function, short chain fatty acids, probiotics, nutraceuticals, metabiotics, healthy and sick people

Микробиота желудочно-кишечного тракта представляет собой сложную экосистему, участвующую в многочисленных нутритивных, физиологических, иммунологических функциях, метаболических и сигнальных реакциях организма здорового и больного человека [39]. В пищеварительном тракте человека присутствует до 2500 видов микроорганизмов [35]. В настоящее время представители первых 1057 видов комменсальных кишечных бактерий, грибов и археев уже культивированы на различных питательных средах. До 150-200 новых видов микроорганизмов, населяющих пищеварительный тракт, ежегодно подвергаются дополнительной таксономической идентификации [33]. В последнее время помимо лактобацилл и бифидобактерий в качестве основы пробиотических продуктов функционального питания и живых медицинских (лекарственных) препаратов пытаются использовать новые кишечные комменсальные микроорганизмы [5, 36]. Среди перспективных кандидатов в живые пробиотические штаммы называют *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*), анаэробные бактерии с муколитической активностью, населяющие нижние отделы желудочно-кишечного тракта здорового человека. Как известно, у всех живых организмов поверхность эпителиальных клеток, взаимодействующих с окружающей средой, покрыта мукозным (слизистым) слоем, в состав которого входят вода, электролиты, липиды и различные белки. Толщина этого слоя в желудочно-кишечном тракте находится в пределах 200-800 μm . Плотные и рыхлые слои мукозного слоя на поверхности кишечника предотвращают проникновение кишечных микроорганизмов через кишечную стенку и обеспечивают проникновение низкомолекулярных пищевых и иных соединений в муколитические и другие бактерии, а также в ниже лежащие слои стенок пищеварительного тракта. Главными функциональными компонентами мукозного слоя являются муцины, представленные в нем в концентрации 1-5%; в толстой кишке муцины составляют до половины всех источников углерода. У человека идентифицировано более 20 различных муцинов, которые классифицируют на секреторные (MUC2, 5AC, 5B, 6, 7, 8, 9, 19) и муцины (MUC1, 3A, 3B, 4, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 20, 21), связанные с мембранами. MUC2 является наиболее распространенным гель-формирующим муцином кишечника. Синтез гликопептидов муцина кишечника кодируется 22 муциновыми генами, локализованными в специализированных goblet и мукозных эпителиальных клетках. В полости кишечника также присутствуют некоторые микроорганизмы (например, *Methanobrevibacter smithii*), способные продуцировать схожие по составу и функциям бактериальные муциноподобные гликаны. Аминокислотный состав муцинов представляет собой tandemные повторы пептидов, богатые пролином, серином и треонином. Как мембранные, так и секреторные муцины высоко гликозилированы; на углеводы падает до 80% всей их массы. Муциновый гликан преимущественно состоит из GalNAc (acetyl galactosamin), GlcNAc (acetyl glucosamin), фукозы, галактозы и сиаловых кислот или NANA / NeuNAc (N-acetyl neuraminic acid) и относительно малого количества манозы. В состав гликана входят также фрагменты сульфатов. Полимеризация муцинов ведет к формированию слизи; мембранные муцины преимущественно участвуют в сигнальных связях внутри и между клетками. Деградация муцинового слоя кишечными микроорганизмами является важнейшим фактором формирования микробных

сообществ на слизистых пищеварительного тракта. В настоящее время известно более 50 мукозо-деградирующих штаммов бактерий, преимущественно принадлежащих *A. muciniphila*, *Bacteroides* spp., *Barnesiella intestinihominis*, *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Lactobacillus mucosae*, *Ruminococcus* spp. [1, 2, 27, 42]. Наиболее известными муцин-деградирующими бактериями являются *A. muciniphila*. Эти бактерии впервые были выявлены из образца фекалий здоровой женщины (уроженки Кавказа) в университете г. Wageningen (Голландия); там же они получили и свое название в честь микробиолога Antoon Akkermans. В последующем эти бактерии были изолированы из фекалий различных здоровых людей (от новорожденных до лиц престарелого возраста). У ребенка *A. muciniphila* обнаруживаются уже на первом месяце жизни; их количество быстро возрастает к 6-12 месяцам и достигает уровня взрослого человека к 3 годам жизни. У грудных детей и лиц в возрасте 25-35 лет содержание этих бактерий достигало 5.0-8.8 log клеток на грамм фекалий; у 95,5% лиц старше 80 лет количество *A. muciniphila* в толстой кишке заметно снижается. Содержание этих бактерий (± 8 log клеток/мл) более высокое в дистальных отделах толстой кишки; в нижних отделах их количество уменьшается (± 4 log клеток/мл). У здоровых взрослых людей уровень *A. muciniphila* может достигать 0,5-4% всех микроорганизмов, присутствующих в толстой кишке [8, 10, 12, 28]. У жителей южной провинции Китая уровень *A. muciniphila* в толстой кишке выше, чем у европейцев [17]. Содержание этих бактерий в просвете, мукозном слое кишечника и в фекалиях здоровых людей и больных с воспалительными заболеваниями кишечника может значительно различаться. Последовательности бактериальной ДНК, соответствующие роду *Akkermansia*, выявляются не только в содержимом толстой кишки, но и в молоке матери, полости рта, поджелудочной железе, билиарной системе, тонком кишечнике и в аппендикулярном отростке [14]. Помимо человека, изоляты *A. muciniphila* были также выявлены из толстого кишечника у домашних и диких животных, птиц, рыб и рептилий [10, 44]. По современной систематике бактерии этого вида относятся к роду *Akkermansia*, который входит в семейство *Akkermansiaceae*, порядок *Verrucomicrobiales*, класс *Verrucomicrobiae*, тип (phylum) *Verrucomicrobia*. В настоящее время в *Verrucomicrobia* phylum кроме *A. muciniphila* входят еще бактерии, принадлежащие виду *Prostheco bacter uviatilis*, обнаруживаемые в микробиоте грудных детей и в материалах больных, страдающих дивертикулезом подвздошной кишки [8, 12, 33].

A. muciniphila представляют собой грамотрицательные, строго анаэробные, неподвижные, неспоро-образующие с овальными концами палочковидные микроорганизмы размером 0.5-1 μm , обнаруживаемые как отдельными клетками, так и парами или короткими цепочками [12]. На наружной мембране *A. muciniphila* идентифицированы пили-схожие белковые структуры [28]. Рост *A. muciniphila* на питательных средах происходит при диапазоне 20-40°C (оптимум 37°C), при pH 5,5-8,0 (оптимум pH 6,6) [6, 12, 23]. *A. muciniphila* являются облигатным хемоорганотрофом; оба компонента клеточных и микробных муцинов (гликан и аминокислоты муциновых пептидов) эти бактерии могут деградировать как самостоятельно, так и в ассоциации с другими микробными кишечными бактериями, утилизируя муцины как единственный источник углерода, азота и энергии [12, 14]. *A. muciniphila* также способны стимулировать продукцию муцина, увеличивать толщину мукозного слоя и барьерную функцию толстой кишки [13, 38]. Имеются сведения, что оральное введение *A. muciniphila* приводит к увеличению количества и активности муцинпродуцирующих goblet клеток [38]. С другой стороны, деградация муцина под влиянием *A. muciniphila* может снижать толщину муцинового слоя, что может повышать риск инфекционных осложнений в пищеварительном тракте [19]. Бактериальный геном *A. muciniphila* представляет собой нуклеоид с содержанием G+C порядка 47.6-55,8 mol%. В его состав входят 1408 генов (65%), контролирующие белки с из-

вестными функциями; другие 768 генов (35%) кодируют гипотетически белки, из которых 38 (1,7%) классифицируют как псевдогены. *A. muciniphila* могут синтезировать все канонические аминокислоты, а также многие ко-факторы и витамины. В геноме *A. muciniphila* присутствуют гены, ответственные за синтез пептидогликана. Генетический анализ показал способность этих микроорганизмов метаболизировать галактозу, целлобиозу, мелобиозу и фруктозу [8, 12, 45]; 78 из известных генов этих бактерий, как полагают, связаны с деградацией муцина и ответственны за синтез протеаз, гликозилгидролаз, сиалидаз, фукозидаз и сульфатаз [10, 27]. Несколько сотен белков у этих бактерий связаны с наружной мембраной; один из таких белков (33 kD) ответственен за многие позитивные эффекты этих бактерий на организм человека [8, 14, 44]. Более 600 генов *A. muciniphila* могут быть ответственны за синтез медиаторов, участвующих во взаимодействии этих бактерий с организмом человека [6, 27]. На модели безмикробных мышей, моноассоциированных *A. muciniphila*, установлена способность этих бактерий модулировать экспрессию генов в толстой (442 гена), подвздошной (253 гена) и слепой кишке (211 генов). Значительная часть этих генов связана с липидным метаболизмом, сигнальными клеточными путями, проницаемостью кишечного барьера и мембранными рецепторами иммунных клеток [13]. Молекулярные исследования генома *A. muciniphila* не выявили присутствия у них известных трансмиссивных плазмид, связанных с антибиотикорезистентностью [15]. У штамма *A. muciniphila* GP36 выявлены гены устойчивости к антибиотикам, схожие с таковыми плазмиды pRSF 1010, выявленной у *S. enterica* [17]. В геноме этих бактерий выявлено наличие двух различных CRISPR локусов, а также фрагменты фаговых нуклеиновых кислот. Эти наблюдения позволили предположить, что фаги играли определенную роль в эволюционной истории *A. muciniphila* [45].

В процессе деградации и метаболизации муцина *A. muciniphila* образуют различные низкомолекулярные соединения (например, КЦЖК), которые способны выступать в качестве источника энергии как для кишечных микроорганизмов, так и для клеток хозяина. Эти бактерии продуцируют ацетат, пропионат, небольшое количество 1,2 пропанедиола и сукцината. Добавление пребиотиков и различного количества муцина в модельных экспериментах увеличивало содержание в толстом кишечнике *A. muciniphila* и способствовало нарастанию в этих условиях пропионата и ацетата [12, 13, 44]. Эти КЦЖК, как известно, используются энтероцитами кишечника в качестве источника энергии, а также участвуют как сигнальные молекулы в работе иммунной системы и в метаболических процессах. Пропионат также участвует в повышении скорости прохождения пищевого комка вдоль кишечного тракта; напротив, ацетат тормозит транзитное время. Пропионат также у человека замедляет возникновение чувства насыщения [22]. Соотношение между ацетатом и пропионатом, образуемых *A. muciniphila*, находится под влиянием количества и разнообразия в среде сахаров, насыщения питательной среды молекулами кислорода и присутствием в ней витамина B12. *A. muciniphila* не только устойчивы к действию кислорода, но его присутствие в жидкой питательной среде в наномолярных концентрациях благоприятно воздействует на рост этих бактерий [29]. В присутствии кислорода продукция ацетата снижается, а пропионовой кислоты усиливается, что увеличивает синтез АТФ и НАДН и стимулирует рост *A. muciniphila* [14]. Уменьшение содержания в среде кислорода сопровождается снижением его токсического эффекта для *A. muciniphila* и способствует образованию бутирата. Анализ состава и содержания КЦЖК в сыворотке крови показал связь между повышенным содержанием *A. muciniphila* с сывороточным ацетатом и предотвращением избыточной массы тела за счет аноректического и противовоспалительного эффектов микробного ацетата [9]. *A. muciniphila* совместно с другими кишечными микроорганизмами способны вовлекаться и в другие метаболические реакции. Так, они могут участвовать совместно с *Anaerostipes caccae*, *Eubacterium hallii* и *Faecalibacterium prausnitzii* в продукцию

бутирата, микробного метаболита, используемого эпителиальными клетками кишечника для энергетического обеспечения пищеварительного тракта. *A. muciniphila* также принимают участие в эндогенном и микробном метаболизме сульфата и сероводорода [14]. Присутствие в кишечном тракте *A. muciniphila* модулировало метаболитом мочи и абсорбцию энергии в кишечнике животных. Исследование протеома наружной мембраны *A. muciniphila* выявило наличие у этих бактерий 79 белков, треть которых различалась при выращивании этих бактерий на различных питательных средах [6].

A. muciniphila требуют специфических условий для выращивания на сложных питательных средах (прежде всего, наличие муцина животного происхождения) [12]. Эти бактерии достаточно чувствительны к воздействию кислорода, хотя эти микробы могут быть выращены и в микроаэрофильных условиях [29]. Разработаны несколько специальных питательных сред (муцин желудка свиньи с добавлением витаминов и микроэлементов), благодаря которым при культивировании *A. muciniphila* можно получить достаточное количество микробной биомассы [12, 31]. При создании минимальной питательной среды для культивирования *A. muciniphila* выяснилось, что присутствие в этой среде L-треонина является обязательным лимитирующим нутритивным фактором для роста этих бактерий. Напротив, добавление в эту среду простых сахаров являлось важным, но не обязательным фактором поддержания роста этих микроорганизмов. Ацетилглюкозамин (GlcNAc) и N-ацетилгалактозамин (GalNAc) не могут быть синтезированы *de novo* из глюкозы; поэтому они необходимы для роста *A. muciniphila* и должны присутствовать в питательной среде для этих бактерий. *A. muciniphila* могут деградировать многие сахара, включая глюкозу, фукозу, GlcNAc и GalNAc [27, 44]. Наличие в среде GlcNAc и GalNAc, синтезируемых клетками кишечника хозяина, способствует образованию UDP-GlcNAc, который в последующем после фосфорилирования, аминирования и ацетилирования глюкозы участвует в формировании бактериального пептидогликана (конечного продукта). В процессе синтеза пептидогликана требуется глутамин для процесса аминирования и одна молекула acetyl-CoA для ацетилирования. Для осуществления этих процессов требуется АТФ для синтеза глутамина и аминирования Fru6P. Рост и накопление биомассы *A. muciniphila* происходили, если в состав питательной среды вносили казеиновый триптон, муцин, Columbia бульон или бульон на основе мозговой-сердечной основы [12, 27]. Проведенные исследования позволили разработать минимальную по составу питательную среду для роста *A. muciniphila*, в которую обязательными нутритивными компонентами являются L-треонин и GlcNAc или GalNAc [44]. Минимальная среда готовится на основе минеральной основы, из которой исключали аммоний. Поскольку витамин B₁₂ является важным фактором метилмалонилового пути для превращения сукцината в пропионат, этот витамин также иногда вводят в состав синтетической питательной среды. Внесение в синтетическую среду 0.1%, 0.5% и 1% экстракта желчи увеличивало рост этих бактерий. Присутствие в питательной среде желудочного сока напротив негативно влияло на выживаемость *A. muciniphila*. Предложены также и другие синтетические среды для выращивания *A. muciniphila*, не содержащие животные компоненты: в качестве основы этой среды используется гидролизат соевого белка (соевой пептон 16 г/л) + N-ацетилглюкозамин (GlcNAc)-1.46 г или аминокислоты (треонин-6г и пролин-6г) + N-ацетилглюкозамин-1 г. Клетки этих бактерий, выращенные на соевой среде, были в 1,5 раза более длинными, чем в среде с муцином; кроме того, многие из них полностью не разделялись [44]. По своей биологической эффективности бактерии, выращенные на различных питательных средах, не отличаются по своему эффекту на организм экспериментальных животных, в частности, по своему воздействию на метаболизм глюкозы и инсулинорезистентность [31].

A. muciniphila активно участвуют в регуляции иммунитета и барьерной функции кишечника [10, 13, 27, 28]. В пищеварительном тракте различных млекопитающих, включая человека, эти бактерии усиливают продукцию антимикробного пептида Reg3 в отношении грамположительных бактерий в толстой кишке и индуцируют слабый провоспалительный эффект Treg клеток у мышей [11, 13, 26, 38]. Модуляция воспаления и иммунной системы, осуществляемая *A. muciniphila*, происходит за счет сигнальных путей, связанных с TNF- α , IFN-гамма, IL10 и IL4 [11]. Эти иммунные эффекты *A. muciniphila* связаны с наличием на поверхности этих бактерий большого комплекса (размером более 100 kDa) мембранных белков, прежде всего PilQ (95-kD), вовлеченному в продукцию длинных поверхностных образований (пилей-жгутиков), ответственных за подвижность, адгезию, секрецию, транспорт и взаимодействие с иммунными клетками. В последующем этот мембранный белок *A. muciniphila* (названный Amuc_1100 белок), взаимодействуя с Toll-схожим рецептором 2, как оказалось, мог индуцировать широкий спектр иммуномодулирующих ответов, включая продукцию цитокинов IL6, IL8 и IL10 у сегментоядерных лейкоцитов. Иммуномодулирующая роль этого белка подтверждена как в опытах *in vitro*, так в экспериментах на различных животных. Недавно продемонстрировано, что именно этот белок *A. muciniphila* ответственен за ингибирование диабета 1 типа у животных, склонных к развитию этого заболевания [14, 27, 28]. Обнаружение в крови небольшого уровня TNF- α , IFN- γ ассоциирует у животных с повышенным содержанием *A. muciniphila* в грудном молоке [18, 27]. Будучи грамотрицательными бактериями *A. muciniphila* в своей наружной мембране также содержат липополисахаридный эндотоксин, который отличается от такового у *Escherichia coli* [50]. Более того, с использованием модели на мышах показано, что присутствие этих бактерий в кишечнике не увеличивает, а даже снижает ЛПС-эндотоксинемию у животных, находящихся длительно на диете, обогащенной жировыми компонентами [13].

Многие пищевые компоненты, поступающие в пищеварительный тракт, могут оказывать влияние на содержание в нем *A. muciniphila*. Различные низкомолекулярные олигосахариды, дисахариды, моносахариды и полиолы, используемые для диетической поддержки больных с синдромом раздраженного кишечника, могут при низких концентрациях (1,86-4,25 г/день) уменьшать общее содержание кишечной микробиоты. При назначении этих соединений в дозе 16,9-30,6 г/день в нижних отделах толстой кишки происходит увеличение содержания бутират продуцирующих кластридий (кластер XIV) и *A. muciniphila* и снижение количества *Ruminococcus torques*. При добавлении в пищу пектина содержание *A. muciniphila* у мышей заметно уменьшается по сравнению с контрольными животными. В питательных средах различного типа, содержащих повышенные количества жира и сахарозы, а также инулиновые фруктаны, *A. muciniphila* характеризовались увеличенной скоростью роста [10, 50]. Экстракты черного чая, винограда, клюквы, а также макромолекулярные процианиды яблок значительно усиливают рост *A. muciniphila* в опытах *in vitro* и в кишечнике. Эти бактерии также играют важную роль в деградации и других фенольных соединений (фенольные кислоты, флавоны, антоцианины) [26, 50]. Экстракты граната, зеленого чая и свежеприготовленный сок калифорнийского винограда различным образом влияли на численность *A. muciniphila* в кишечнике здоровых людей и мышей [20, 50]. Экстракт граната (0,18-0,28 мг/мл) в опытах *in vitro* значительно ингибировал рост этих бактерий. При исследовании влияния экстрактов граната на численность *A. muciniphila* у людей были установлены индивидуальные различия. Когда метаболизация феноловых соединений не наблюдалась, численность *A. muciniphila* падала; у лиц, которые могли превращать гранатовые эллагитаннины в уролитинины и другие метаболиты, отмечалось повышение уровня этих бактерий [20]. Рост *A. muciniphila* в организме человека может стимулироваться и капсацином, поступающим в пищеварительный тракт с продуктами питания. Пищевые до-

бавки могут содержать также остатки GlcNA, которые способны комбинироваться с глутаматом для образования гамма-масляной кислоты (GABA) [37].

Исследование микробиоты пищеварительного тракта 60 индийских детей в возрасте 6-11 месяцев показало, что лишь у 20% из них в кишечнике присутствовали *A. muciniphila*. Назначение на протяжении 12 дней макролидного антибиотика азитромицина полностью элиминировало эти бактерии из детских фекалий. Авторы [30] этого исследования полагают, что состав кишечной микробиоты (включая содержание *A. muciniphila*) под влиянием азитромицина может специфически меняться в зависимости от возраста больных, их национальной принадлежности и места географического проживания. Назначение больным бета-лактамовых антибиотиков и ванкомицина увеличивало вдвое содержание *A. muciniphila* в толстом кишечнике [10]. Интрагастральное введение алкоголя мышам приводило к резкому уменьшению у них содержания кишечных *A. muciniphila*. Снижение численности этих бактерий может быть восстановлено оральным введением животным живых представителей этого вида бактерий; это сопровождалось снижением алкогольных повреждений печени, уменьшением стеатоза, нейтрофильной инфильтрации, а также увеличением толщины мукозного слоя кишечника мышей. Воздействие алкоголя также уменьшало количество *A. muciniphila* у больных с хроническим алкогольным стеатогепатитом. Поскольку оральное введение живых *A. muciniphila* восстанавливало целостность кишечного барьера и улучшало состояние больных, страдающих алкогольной болезнью печени, рекомендовано провести детальное клиническое наблюдение по оценке терапевтической эффективности использования *A. muciniphila* у больных с такими нарушениями [16].

В 2013 году было установлено, что большинство известных благоприятных эффектов *A. muciniphila* при введении в организм экспериментальных животных исчезает, если живые бактерии предварительно подвергаются автоклавированию [13]. В условиях медленного и слабого нагревания (30 мин при 70°C; пастеризация) бактерии этого вида не только сохраняют свою физиологическую и метаболическую активность; их благоприятный эффект на организм хозяина в этих условиях даже увеличивается [18, 28, 31].

Изучение чувствительности *A. muciniphila* к антибиотикам показало, что рост этих бактерий ингибировался пенициллинами, макролидами и тетрациклином; с другой стороны, эти бактерии оказались резистентными при воздействии аминокликозидов, гликопептидов и флюорохинолонов [29]. Исследования других штаммов *A. muciniphila* выявило, что они были устойчивы к действию флюорохинолонам и гликопептидным антибиотикам (ванкомицин и офлоксацин), но чувствительны к пенициллину, амоксициллину, цефтриаксону и имипенему. Тетрациклин и хлорамфеникол, использованные в 10 µg/мл и 25 µg/мл на плотной среде полностью ингибировали *A. muciniphila* [44].

С использованием безмикробных мышей установлено, что оральное назначение *A. muciniphila* ведет к изменениям морфологии клеток толстого кишечника, увеличивает его барьерную функцию, ведет к метаболическим и иммунным сигнальным изменениям как в пищеварительной системе, так и вне ее [8, 11, 31].

В настоящее время имеется достаточное количество публикаций, свидетельствующих, что уменьшение количества *A. muciniphila* в толстом кишечнике часто ассоциирует у людей с различными заболеваниями и патологическими синдромами: острым аппендицитом [41], аутизмом [47], атопическими заболеваниями [4], алкогольным стеатогепатитом [16], псориазом [43]. В модельных экспериментах было показано, что *A. muciniphila* участвует в регуляции жирового обмена, формировании метаболической эндотоксинемии, воспалении жировой ткани, развитии резистентности к инсулину [13; 14]. Отчетливо прослежена связь уменьшения *A. muciniphila* с ожирением, диабетом 2 типа, воспалительными поражениями пищеварительного

тракта (язвенный колит, болезнь Крона), гипертонией, патологиями печени, нейродегенеративными заболеваниями, злокачественными новообразованиями и другими патологиями человека [5, 6, 7, 14, 16, 21, 31, 34]. С другой стороны, имеются публикации, свидетельствующие, что у иммунодефицитных мышей [49], а также у мышей с аллергической диареей [40], содержание *A. muciniphila* в кишечнике резко повышено. Заметное возрастание количества этих бактерий в толстом кишечнике наблюдается у людей с повышенной массой тела и жировой ткани, колоректальным раком [46, 48], сахарным диабетом 1 типа [18, 19]. Метагеномный анализ микробиоты 345 лиц китайской национальности (контрольной группы и страдающих сахарным диабетом 2 типа) показал наличие у больных умеренного кишечного дисбиоза с отчетливым уменьшением численности бутират-продуцирующих представителей *Eubacterium* spp., *Fecalibacterium* spp., *Roseburia* spp. и увеличением у них муцин-деградирующих *A. muciniphila* и сульфат-редуцирующих *Desulfovibrio* spp. [32]. Противоречивые данные о роли *A. muciniphila* в риске или лечебно-профилактическом эффекте объясняют тем, что пептиды, образуемые этими бактериями, могут различным образом интерферировать с метаболическими и/или иммунными патогенетическими механизмами при тех или иных заболеваниях [25].

Представленный анализ опубликованных данных, полученных зарубежными исследователями и клиницистами, свидетельствует, что муколитические *A. muciniphila*, населяющие мукозный слой пищеварительного тракта, способны оказывать выраженное модулирующее действие на иммунное, метаболическое, нейро-гормональное и психическое здоровье человека. Эти бактерии фиксируются к эпителиальным клеткам кишечника; при этом, в процессе этой адгезии они формируют плотный монослой на поверхности слизистой [42]. К сожалению, детали взаимодействия *A. muciniphila* с рецепторами клеток пищеварительного тракта на всем его протяжении, также как и взаимодействие низкомолекулярных соединений, образуемых этими кишечными бактериями с мишенями органов и тканей, локализованных вне кишечника, не полностью понятны до последнего времени. Несомненно, что многие благоприятные и негативные эффекты *A. muciniphila* связаны с наличием у них поверхностных мембранных белков, прежде всего, белка *Amuc_1100*, связанного с пилиями IV типа [27, 28, 31], выраженной продукцией определенных КЦЖК (прежде всего, ацетата и пропионата) [28], стимуляцией количества и активности муцин-продуцирующих гоблет клеток, изменением толщины мукозного слоя и барьерной функции толстой кишки [13, 26, 38], модуляцией состава и структуры и химических свойств различных муцинов [2, 42], продукцией липополисахаридного эндотоксина [13] и синтезом γ -аминомасляной кислоты, вмещающейся в микробно-нейро-гуморальный аксис в кишечнике [3]. Не только живые, но и пастеризованные бактерии и даже низкомолекулярные бактериальные компоненты и метаболиты способны на животных моделях и людях индуцировать иммунные, гормональные, биохимические, метаболические и сигнальные функции и биохимические реакции в организме хозяина. Кратковременное (двухнедельное) введение *A. muciniphila* добровольцам не вызывало у них каких-либо побочных эффектов [31]. Это позволяет согласиться с мнением ряда зарубежных исследователей [5, 6, 21, 31], предлагающих рассматривать *A. muciniphila* как представителя новой генерации кишечных бактерий, которые могут служить в качестве объективных микробных маркеров при оценке состояния здоровья и диагностике ряда воспалительных и метаболических заболеваний. Нельзя исключить, что в перспективе те или иные штаммы *A. muciniphila* или их низкомолекулярные компоненты и метаболиты найдут применение в качестве перспективных профилактических и лечебных средств при некоторых заболеваниях, ассоциированных с микрoэкологическим дисбалансом кишечника человека. Инкапсулирование в водно-жировую эмульсию позволяет живым бактериям этого вида проходить через желудок при оральном назначении [44]. С другой стороны, в условиях экспе-

риментах на животных, на культурах различных клеток и на больных показано, что повышенные количества живых *A. muciniphila* могут выступать и в качестве потенциальных негативных биологических агентов при воспалительных, аутоиммунных, аллергических и раковых заболеваниях; нельзя исключать и возникновение других побочных эффектов при назначении высоких доз живых бактерий этого вида.

Анализ кишечной микробиоты около 300 здоровых жителей Японии с использованием V3-V4 секвенирования 16S рРНК показал, что численность *Akkermansia* в толстом кишечнике взрослого населения этой страны достигает 5 и более процентов всей кишечной микробиоты; у 3,6% японских женщин уровень содержания этих бактерий был ниже среднего количества этих бактерий в популяции японского населения. Предлагается разработать специальные диетические приемы и/или физические упражнения, способные помочь таким женщинам увеличивать количественный состав этих бактерий в содержимом их толстого кишечника [26]. Мы убеждены, что расширенные микробиологические, токсикологические и клинические исследования *A. muciniphila* у жителей России и ее многочисленных этносов также позволят получить дополнительные доказательства позитивной и негативной роли *A. muciniphila* в поддержании здоровья граждан нашей стран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aguirre M. Fermentation of indigestible carbohydrates by the gut microbiota. Dissertation Degree of Doctor, Maastricht University. The Netherlands, 2016.
2. Bansil R., Turner D.S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018, 124: 3-15.
3. Burokas A., Arboleya S., Moloney R.D. et al. Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biol Psychiatry*. 2017. Doi:10.1016/j.biopsych. 2016.12.031.
4. Candela M., Rampelli S., Turroni S. et al. Unbalance of intestinal microbiota in atopic children. *BMC Microbiol*. 2012, 12: 95. doi: 10.1186/1471-2180-12-95.
5. Cani P.D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*, 2018: 1-10. Doi:10.1136/gutjnl-2018-316723.
6. Cani P.D., de Vos W.M. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*, 2017,8,1765. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01765/full>.
7. Cekanaviciute E., Yoo B.B., Runia T.F. et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2017, 114: 10713-10718.
8. de Vos W.M. Microbe Profile: *Akkermansia muciniphila*: a conserved intestinal symbiont that acts as the gatekeeper of our mucosa. *Micobiology*. 2017, 163: 646-648.
9. De la Cuesta-Zuluaga J., Mueller N.T., Corrales-Agudelo V. et al. Metformin is associated with higher relative abundance of mucin-degrading *A. muciniphila* and short-chain fatty acid producing microbiota in the gut. *Diabetes Care*. 2017, 40: 54-62.
10. Derrien M., Belzer C., de Vos W.M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microbial Pathogenesis*, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.005>.
11. Derrien M., Van Baarlen P., Hooiveld G. et al. Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Front. Microbiol*. 2011, 2: 166. Doi: 10.3389/fmicb.2011.00166.
12. Derrien M., Vaughan E.E., Plugge C.M., de Vos W.M. *Akkermansia muciniphila* gen.nov., sp.nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2004, 54(Pt 5): 1469-1476.
13. Everard A., Belzer C., Geurts L. et al. Crosstalk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013,110: 9066-9071.
14. Geerlings S.Y., Kostopoulos I., de Vos W.M., Belzer C. *Akkermansia muciniphila* in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How? *Microorganisms*. 2018, 6(3), 75. doi:10.3390/microorganisms6030075.

15. Gymez-Gallego C., Pohl S., Salminen S. et al. Akkermansia muciniphila: a novel functional microbe with probiotic properties. *Benef. Microbes*. 2016; 7: 571-584.
16. Grander C., Adolph T.E., Wieser V. et al. Recovery of ethanol-induced Akkermansia muciniphila depletion ameliorates alcoholic liver disease. *Gut*. 2018, 67(5): 891-901.
17. Guo X., Li S., Zhang J. et al. Genome sequencing of 39 Akkermansia muciniphila isolates reveals its population structure, genomic and functional diversity, and global distribution in mammalian gut microbiotas. *BMC Genomics*. 2017,18(1): 800. Doi: 10.1186/s12864-017-4195-3.
18. Hänninen A., Toivonen R., Pöysti S. et al. Akkermansia muciniphila induces gut microbiota remodelling and controls islet autoimmunity in NOD mice. *Gut*. 2017: gutjnl-2017-314508. Doi:10.1136/gutjnl-2017-314508.
19. Hansson G.C. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr. Opin. Microbiol*. 2012; 15: 57-62.
20. Henning S.M., Summanen P.H., Lee R-R. et al. Pomegranate ellagitannins stimulate the growth of Akkermansia muciniphila in vivo. *Anaerobe*. 2017, 43: 56-60
21. Hur K.Y., Lee M.S. Gut Microbiota and Metabolic Disorders, Diabetes. *Metab. J*. 2015, 39: 198-203.
22. Kolmede C.A., de Vos W.M. Gut health and the personal microbiome. In: *Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease*. 2017, John Wiley & Sons, Ltd. 201-219.
23. Li S.S., Zhu A., Benes V. et al. Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science*. 2016, 352: 586-589.
24. Li J., Zhao F., Wang Y. et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome*. 2017, 5:14. Doi: 10.1186/s40168-016-0222-x.
25. Mithieux G. Does Akkermansia muciniphila play a role in type 1 diabetes? *Gut*. 2018: gutjnl-2017-315732.
26. Naito Y., Uchiyama K., Takagi T. A next-generation beneficial microbe: Akkermansia muciniphila. *J. Clin. Biochem. Nutr*. 2018, 63(1): 33-35.
27. Ottman N., Davids M., Suarez-Diez M. et al. Genome-Scale Model and Omics Analysis of Metabolic Capacities of Akkermansia muciniphila Reveal a Preferential Mucin-Degrading Lifestyle. *Appl. Environ. Microbiol*. 2017, 83(18). pii: e01014-17. doi: 10.1128/AEM.01014-17.
28. Ottman N., Geerlings S.Y., Aalvink S. et al. C. Action and function of Akkermansia muciniphila in microbiome ecology, health and disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2017, 31: 637-642.
29. Ouwerkerk J.P., van der Ark R.C., Davids M. et al. Adaptation of Akkermansia muciniphila to the oxic-anoxic interface of the mucus layer. *Appl. Environ. Microbiol*. 2016. doi:10.1128/AEM.01641-16k.
30. Parker E.P.K., Prahara J., John J. et al. Changes in the intestinal microbiota following the administration of azithromycin in a randomized placebo-controlled trial among infants in south India. *Scientific Reports*. 2017; 7: 9168. DOI: 10.1038/s41598-017-06862-0.
31. Plovier H., Everard A., Druart C. et al. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature Med*. 2017, 23: 107-113.
32. Qin J., Li Y., Cai Z. et al. Metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012, 490: 55-60.
33. Rajilic-Stojanovic M., de Vos W. M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Rev*. 2014, 38: 996-1047.
34. Rajilic-Stojanovic M., Guarner F., Shanahan F., de Vos W.M. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflamm. Bowel. Dis*. 2013,19: 481-488.
35. Ritari J., Salojarvi J., Lahti L., de Vos W.M. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics*. 2015, 16: 1056. Doi: 10.1186/s12864-015-2265-y.
36. Román-Pérez M., Agusti A., Sanz Y. Innovation in microbiome-based strategies for promoting metabolic health. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2017, 20: 1-91.
37. Roopchand D.E., Carmody R.N., Kuhn P. et al. Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium Akkermansia muciniphila and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome, Diabetes. 2015, 64: 2847-2858.
38. Shin N.R., Lee J.C., Lee H.Y. et al. An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*. 2014, 63:727-735.

39. Sommer F., Backhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11(4): 227-238.
40. Sonoyama K., Ogasawara T., Goto H. et al. Comparison of gut microbiota and allergic reactions in BALB/c mice fed different cultivars of rice. *Br. J. Nutr.* 2010, 103: 218-226.
41. Swidsinski A., Dorffel Y., Loening-Baucke V. et al. Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut.* 2011, 60: 34-40.
42. Tailford L.E., Crost E.H., Kavanaugh D., Juge N. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front. Genet.* 2015, 6: 81. Doi: 10.3389/fgene.2015.00081.
43. Tan L., Zhao S., Zhu W. et al. The *Akkermansia muciniphila* is a gut microbiota signature in psoriasis. *Exp. Dermatol.* 2018, 27(2): 144-114.
44. Van der Ark K.C.H. Metabolic characterization and viable delivery of *Akkermansia muciniphila* for its future application. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands. 2018. DOI: 10.18174/427507.
45. Van Passel M.W.J., Kant R., Zoetendal E. The Genome of *Akkermansia muciniphila*, a Dedicated Intestinal Mucin Degrader, and Its Use in Exploring Intestinal Metagenomes. *PLoS ONE.* 2011, 6(3): e16876. Doi: 10.1371/journal.pone.0016876.
46. Wang X., Wang J., Rao B., Deng L. Gut flora profiling and fecal metabolite composition of colorectal cancer patients and healthy individuals, *Exp. Ther. Med.* 2017, 3: 2848-2854.
47. Wang L., Christophersen C.T., Soric M.J. et al. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77: 6718-6721.
48. Weir T.L., Manter D.K., Sheflin A.M. et al. Stool Microbiome and Metabolome Differences between Colorectal Cancer Patients and Healthy Adults. *PLoS One.* 2013, 8: e70803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070803>.
49. Zhang Y.J., Li S., Gan R.Y. et al. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16: 7493-7519.
50. Zhou K. Strategies to promote abundance of *Akkermansia muciniphila*, an emerging probiotics in the gut, evidence from dietary intervention studies. *J. Functionl. Foods.* 2017, 33: 194-201.

Поступила 22.01.19

Контактная информация; Шендеров Борис Аркадьевич, д.м.н., проф.,
119121, Москва, Погодинская ул., 10. стр 1, р.т. (499)248-43-93

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Б.Г.Андрюков, Л.М.Сомова, М.П.Бынина, И.Н.Ляпун

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СОХРАНЕНИЯ ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ САПРОНОЗОВ

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

Для межэпидемических периодов природно-очаговых сапронозов характерны различные способы сохранения жизнеспособности возбудителей в наземных паразитарных системах, связанные с различными адаптационными стратегиями, необходимыми для сохранения популяции. В отличие от спорообразующих бактерий, возбудители сапронозов используют устойчивые клеточные формы — жизнеспособное, но некультивируемое состояние (VBNC) и персистенцию. Реализация этих стратегий обусловлена влиянием различных стрессорных факторов среды обитания и характеризуется снижением метаболизма, изменением морфологии и физиологии бактериальной клетки, прекращением ее репликации. Важно, что устойчивые формы клеток сохраняют вирулентность и при наступлении благоприятных условий вновь трансформируются в активные вегетативные формы. Открытие в последние годы генетических модулей бактериальных токсин-антитоксиновых систем позволило раскрыть сложные регуляторные молекулярные меха-

низмы сохранения патогенного потенциала устойчивых форм возбудителей природно-очаговых сапронозов в межэпидемические периоды.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 115—126

Ключевые слова: сапронозы, устойчивые клеточные формы бактерий, токсин-антитоксин генетические модули, жизнеспособные, но некультивируемые (VBNC) клетки, персистенция

B.G.Andryukov, L.M.Somova, M.P.Bynina, I.N.Lyapun

MOLECULAR-GENETIC MECHANISMS OF CONSERVATION OF THE PATHOGENIC POTENTIAL OF THE CAUSATIVE AGENTS ENVIRONMENTS OF NATURAL-FOCUS SAPRONOSIS

Somov State Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

For interepidemic periods of natural focal sapronoses, various ways of maintaining the viability of pathogens in terrestrial parasitic systems are associated with various adaptation strategies necessary for the conservation of the population. Unlike spore-forming bacteria, sapronose pathogens use stable cellular forms — a viable but uncultivated state and persistence. The implementation of these strategies is due to the influence of various stress factors of the habitat and is characterized by a decrease in metabolism, a change in the morphology and physiology of the bacterial cell, and the cessation of its replication. It is important that stable forms of cells retain virulence and, when favorable conditions come, they are again transformed into active vegetative forms. The discovery in recent years of genetic modules of bacterial toxin-antitoxin systems has made it possible to uncover complex regulatory molecular mechanisms for preserving the pathogenic potential of stable forms of pathogens of natural focal sapronoses in interepidemic periods.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 115—126

Key word: sapronoses, resistant cell forms of bacteria, toxin-antitoxin genetic modules, viable but non-culturable (VBNC) cells, persistence

Проблема сохранения патогенных микроорганизмов и способов их существования в окружающей среде стала одной из актуальных в современной микробиологии. Эндемичность природно-очаговых сапронозов связана со способностью их возбудителей сохраняться в природных экосистемах [6, 18].

Эколого-эпидемиологическое изучение сапронозных инфекций имеет не только медицинское, но и общебиологическое значение, поскольку, несмотря на достаточно длительную историю изучения сапронозов, появляющиеся новые представления о симбиотических отношениях, паразитарных системах и адаптационных стратегиях их возбудителей все больше расходятся с классическими эпидемиологическими и биологическими концепциями [1]. Отчасти это сопряжено с отсутствием единого взгляда на терминологию и экологические особенности возбудителей при их циркуляции в природных условиях и в организме человека [2, 3, 18].

Парадигма межэпидемических периодов предполагает два способа существования возбудителей: активный (циркуляция вне наземной паразитарной системы, в почвах или водоемах) и пассивный (резервация в покоящемся, неактивном состоянии).

В конце прошлого века было доказано существование устойчивых (покоящихся, дремлющих, спящих) клеточных форм у неспорообразующих бактерий, обитающих в почвах и водоемах, жизнеспособных, но некультивируемых клеток (viable, but non-culturable, VBNC), а также явления персистенции бактерий (persister — устойчивый) в организме теплокровных животных и людей [1, 2, 18].

Устойчивые клеточные формы с низкой метаболической и репликативной активностью не обнаруживаются традиционными микробиологическими методами [27, 49]. Эти формы имеют большое значение в реализации биологичес-

ких свойств многочисленной и разнообразной группы возбудителей сапронозов: экологической пластичности, многообразия форм устойчивости к внешним стрессорам, формирование резистентности к антибиотикам и другим антибактериальным средствам [2, 16].

В последние годы всплеск научного интереса к устойчивым формам возбудителей инфекций связан с возрастающим медико-эпидемиологическим значением феномена устойчивых клеточных форм, а также появлением и развитием методов молекулярно-клеточной биологии, открытием генетических модулей токсин-антитоксиновых систем (ТАС) [1]. Это послужило основанием для разработки принципиально новых технологий исследования механизмов сохранения патогенного потенциала устойчивых клеточных форм возбудителей природно-очаговых сапронозов в межэпидемические периоды [2, 18].

Пограничное положение этой своеобразной и обширной группы бактерий, способных как к паразитическому, так и к сапрофитическому существованию, обусловило недостаточную изученность путей и способов резервации возбудителей, а также сохранения ими вирулентности [5]. Возможно, что раскрытие механизмов участия ТАС в формировании устойчивых форм бактерий станет недостающим звеном в изучении общих стратегий выживания возбудителей природно-очаговых сапронозов как в организме человека и животных, так и во внешней среде.

Цель обзора: показать значение генетических модулей ТАС в возникновении устойчивых форм бактериальных клеток и сохранении патогенного потенциала возбудителей природно-очаговых сапронозов.

Возбудители природно-очаговых сапронозов. Сапронозы (сапрос — гнилой и *posos* — болезнь) — это болезни, передающиеся человеку из абиотических субстратов окружающей среды (почвы, воды, разлагающихся растений, экскрементов животных и других) [6].

Наиболее важная особенность сапронозов в том, что бактерии-возбудители не только сохраняются, но и активно размножаются в абиотических субстратах (сапрофитическая фаза), а попав в организм теплокровного животного (или человека), продолжают репликацию и в нем (паразитическая фаза). Возможными источниками возбудителей являются животные, что стало основанием назвать эту группу инфекций сапрозоонозами [18].

К возбудителям инфекций данной группы относятся *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Erysipelothrix*, *Bacillus anthracis*, *Leptospira interrogans*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* spp. и другие бактерии, главным естественным местом обитания которых являются абиотические объекты окружающей среды [2].

В основе патогенных свойств возбудителей природно-очаговых сапронозов лежат генетически детерминированные факторы патогенности (адгезины, инвазины, ферменты, токсины и др.), которые сформировались у них в процессе эволюции для существования в объектах окружающей среды и проникновения в клетки и ткани представителей почвенной, водной, морской флоры и фауны [2, 4]. Эти универсальные факторы патогенности благодаря комплементарности детерминант могут воздействовать на соответствующие химические мишени как в объектах внешней среды, так и в организме теплокровных животных и человека [5].

Парадигма о природной очаговости болезней в течение длительного времени опиралась на постулат о постоянной циркуляции возбудителей на определенной территории. Однако в последние десятилетия был выдвинут и обоснован тезис о межэпидемических (межэпизоотических) периодах и дискретности процесса циркуляции возбудителей (сезонных, годовых, многолетних) как о закономерной особенности природных очагов [2, 3, 5]. Стало очевидно, что в наземных экосистемах циркуляция возбудителей сапронозов (чумы, псевдотуберкулеза, лептоспироза,

листериоза, мелиоидоза, легионеллеза, холеры, туляремии, сибирской язвы) также ограничена во времени и пространстве [5].

Например, перерывы в активной циркуляции *Yersinia pestis* могут длиться десятки лет [2, 5]. Дискретность обращения возбудителей сапронозов выражена и в эпидемических проявлениях холеры и других инфекций, природная очаговость которых связана с водными и наземными системами [1, 5].

Таким образом, обитающие в окружающей среде возбудители типичных сапронозов могут существовать и размножаться без всякой связи с теплокровными организмами и приобретают эпидемиологическое значение, когда появляется возможность передачи их из естественных мест обитания в организм теплокровного животного (или человека), где они продолжают репликацию. Наличие двух сред обитания способствует сохранению их в биосфере и определяет их дальнейшую эволюцию в этом направлении [1, 3, 5, 6, 18].

Как обитатели разных экосистем возбудители сапронозов постоянно сталкиваются с потенциально опасными неблагоприятными факторами, что обусловило необходимость формирования ими в процессе эволюции определенных адаптационных стратегий генетической саморегуляции [1, 3, 18].

Эти стратегии обеспечивают не только высокую экологическую пластичность микроорганизмов-сапрофитов, но и возможность сохранения возбудителей, обладающих значительным инфекционным потенциалом, в условиях влияния многочисленных факторов окружающей среды и организма человека. Источником сапронозных инфекций может служить и госпитальная среда: медицинские приборы и оборудование, трансплантаты и биологические жидкости, на которых возбудители сохраняются в течение длительного времени в виде биопленок, устойчивых клеточных форм, спор. Это обеспечивает фазовое развитие эпидемических проявлений внутригоспитальных инфекций с периодическим доминированием мультирезистентных клонов [24, 32, 33].

Известно, что спорообразующие патогенные бактерии (кlostридии, бациллы) в условиях резкого ограничения питательных веществ в среде обитания могут десятилетиями сохраняться в почвах в виде покоящихся форм — спор или цист до наступления благоприятных для размножения условий. Например, споры *Bacillus anthracis*, возбудителя сибирской язвы, при благоприятных условиях способны прорастать в почве, осуществляя полный вегетативный цикл [27].

В конце XX века было доказано существование покоящихся устойчивых («дремлющих») клеточных форм у неспорообразующих бактерий, обитающих в почвах и водоемах и находящихся в организме теплокровных животных и людей [13]. Субпопуляции этих клеточных форм отличаются сниженными темпами роста и метаболической активности, но при наступлении оптимальных условий роста обладают способностью к быстрому восстановлению тех патогенных характеристик, которые имели ранее [27, 49].

Эволюционная значимость поддержания такой гетерогенности популяции аналогична генетическим стратегиям формирования фенотипов, обусловленных генотипом и условиями внешней среды, увеличивающими вероятность выживания микроорганизмов в условиях нестабильности экологических условий, а также действия антибактериальных средств [16].

Образование устойчивых форм у возбудителей сапронозов вызвано рядом стрессорных факторов среды обитания (изменением гидротермического режима, дефицитом питательных веществ, воздействием антибиотиков и другими) и имеет выраженную адаптивную природу [6, 49].

Возбудители сапронозов, переходя в некультивируемое состояние, получают возможность длительного существования во внешней среде, вне теплокровного организма. При этом неактивные клетки сохраняют свой патогенный потенциал и

при наступлении благоприятных условий вновь трансформируются в вегетативные формы [27].

К настоящему времени устойчивые (покоящиеся) формы выделены у многих бактерий, в том числе возбудителей природно-очаговых инфекций (чумы, псевдотуберкулеза, листериоза и других сапронозов) [16, 32]. Обнаружение этих форм возбудителей сапронозов в очагах, в почвах и водоемах было подкреплено результатами экспериментальных исследований по индукции процессов реверсивного перехода иерсиний, листерий, и сальмонелл в покоящееся состояние [3, 5, 18].

После открытия этих адаптационных феноменов было предположено, что механизмы реверсивного перехода бактерий в покоящееся состояние и обратный переход в вегетативные (активные) формы имеют сложную генетическую регуляцию, а их индукция обусловлена сочетанием комплекса биотических и абиотических факторов среды обитания [2, 4, 6].

Сезонные и климатические сдвиги выраженности этих факторов способны вызывать адаптивную перестройку микробных популяций и индуцировать переход вегетативных форм, присущих фазе циркуляции возбудителей, в покоящееся состояние, обеспечивающее их резервацию в межэпидемических периодах в природных очагах, а также вызывать обострение, рецидивы и хронизацию инфекции [1, 3, 10, 38].

В настоящее время хорошо охарактеризованы две четко определенные устойчивые формы у неспорообразующих бактерий: жизнеспособное, но некультивируемое состояние (VBNC) и персистенция клеток.

Устойчивые клеточные формы. Культивирование микроорганизмов — одна из фундаментальных микробиологических характеристик, а координированное воспроизведение всех клеточных компонентов и структур, ведущее в конечном итоге к увеличению массы клетки — один из главных критериев ее жизнеспособности. Однако в XX веке у микроорганизмов были открыты анабиотические формы существования, которые не в полной мере отвечали критерию жизнеспособности. Это клетки-персистеры и жизнеспособные, но некультивируемые бактерии, которые были объединены под общим названием «покоящиеся клеточные формы» [27, 47].

Клетки-персистеры. Эффект персистенции бактериальных клеток был открыт в середине прошлого века. В последующих многочисленных исследованиях феномен персистенции бактерий был подробно изучен [6-8, 12, 29, 36]. В частности, было установлено, что клетки-персистеры обычно составляют лишь небольшую часть бактериальной популяции. В штаммах *E. coli* дикого типа их частота в планктонных культурах лишь около одной на миллион клеток [10, 21]. Однако в биопленках, сложных многоклеточных бактериальных сообществах, которые обладают высокой устойчивостью к антибиотикам и ответственны за более чем 80% инфекций человека, их частота существенно возрастает — до одной из ста бактерий [21].

Механизм формирования временной антибиотикорезистентности клеток-персистеров связан с репликативным и метаболическим покоем бактерий, находящихся в персистентном состоянии [32, 47]. Механизм действия большинства антибиотиков направлен на подавление жизненно важных внутриклеточных процессов метаболически активных и растущих клеток, поэтому эффективность этих препаратов зависит от физиологического состояния клетки. С этих позиций эффект персистенции представляется как появление спонтанных и временно устойчивых к антибиотикам фенотипических клеточных вариантов в изогенных бактериальных популяциях [32].

В современном определении клетки-персистеры рассматриваются как покоящиеся и нерегулярные субпопуляции, находящиеся в растущей культуре, которые устойчивы к нескольким типам антибиотиков, антисептикам и дезинфектантам [9, 16, 32]. Принципиальное их отличие от антибиотикорезистентных бактерий-му-

тантов в том, что клетки-персистеры не делятся, а их толерантный фенотип сохраняется только в период состояния покоя и, следовательно, не наследуется [21, 26].

Казалось бы, механизм фенотипической антибиотикорезистентности клеток-персистеров связан исключительно с состоянием метаболического и репликативного покоя. Однако недавние исследования [7, 8, 12, 24] показали физиологическую неоднородность фракции клеток-персистеров в популяции и разную степень устойчивости к различным антибиотикам [24]. Экспериментальное селективное ингибирование репликации бактерий вызывало резистентность к антибиотикам только тогда, когда оно сопровождалось активным ответом клеток на стресс. Другие исследователи [34, 47] показали, что подавление только метаболической активности бактериальных клеток не препятствовало гибели 99% популяции от антибактериальных средств.

Кроме того, в работах E. Maisonneuve et al. [29] и Van den Bergh et al. [42] отражено, что фенотипическая популяция единичных клеток-персистеров присутствует в большинстве бактериальных культур, находящихся в стационарной фазе роста и в отсутствии влияния антибиотиков и стресса. В процессе жизнедеятельности вегетативные (активные) бактериальные клетки популяций могут трансформироваться в персистентный фенотип и обратно, при этом скорость таких реверсий ориентирована на фазы роста и условия среды обитания [29, 42].

Таким образом, сделан вывод, что индукция образования клеток-персистеров не связана исключительно с влиянием антибактериальных средств, а уровни бактериальной персистенции зависят от нескольких факторов окружающей среды и генетически детерминированного механизма регуляции их формирования [16, 32, 47]. Эти клетки защищают популяцию от гибели, связанной с внезапной и массивной антибиотикотерапией, давая конкурентное преимущество микроорганизмам в периодически изменяющихся условиях среды обитания [32, 47].

Присутствие клеток-персистеров в бактериальной культуре, в том числе, возбудителей сапронозов, имеет и возрастающее патогенетическое значение в качестве этиологического фактора групп хронических, а также нозокомиальных инфекций (гноино-септические инфекции, пневмонии, кишечные инфекции, столбняк, газовая гангрена и др.) [1, 34].

Жизнеспособные, но некультивируемые клетки. Сапрофитическая фаза возбудителей сапронозов в природных экосистемах нередко проходит в неблагоприятных условиях существования. Нестабильный гидротермический режим, недостаток питательных веществ и другие стрессорные факторы среды обитания угрожают выживанию популяции, что заставляет бактериальные клетки, кардинально изменяя свою физиологическую и морфологическую организацию, входить в устойчивые покоящиеся состояния, приобретая способность сохраняться в агрессивных условиях среды обитания.

В отличие от нормальных бактерий, жизнеспособные, но некультивируемые (VBNC) клетки теряли способность культивироваться на питательных средах и формировать колонии, сохранив при этом признаки жизнеспособности (интактность клеточных мембран, минимальная метаболическая активность, продолжающаяся экспрессия генов) [27]. Установлено, что состояние VBNC индуцируется различными стрессорами окружающей среды (голодание, гипоксия, изменение гидротермического режима и pH, повышение солености, антибактериальные средства, дезинфектанты) [33, 49].

За последние десятилетия некультивируемые формы были обнаружены более чем у 100 видов бактерий, относящихся к 40 родам, из них свыше 50 видов являются патогенными или условно патогенными для человека и животных. Эти клеточные формы бактерий упоминались в научной литературе под различными альтернативными названиями: некультивируемые клетки, условно жизнеспособ-

ные экологические клетки (conditionally viable environmental cells, CVEC), активные, но некультивируемые клетки (active but nonculturable cells, ABNC), спящие (дремлющие) клетки [38].

Клиническое значение некультивируемых форм было подтверждено в многочисленных исследованиях [49]. Патогенные бактерии, находящиеся в состоянии VBNC, не высеваются из биоматериала на лабораторных диагностических питательных средах и, следовательно, не могут быть идентифицированы в качестве этиологического агента. Отрицательный микробиологический ответ может повлечь за собой отмену антибиотикотерапии и в дальнейшем вызвать рецидив инфекции. В исследовании М.М. Лео et al. [28] было показано, что в 14–27% случаев инфицирования патогены оказались нераспознанными традиционными микробиологическими методами, а их наличие удалось выявить только с помощью ПЦР. Этим же методом было обнаружено количественное увеличение субпопуляции некультивируемых форм бактериальных клеток в биопленках. Это повышает их значимость в патогенезе бактериальных инфекций человека и стимулирует активные исследования для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе феномена персистенции и его регуляции [37].

К настоящему времени накоплено достаточно много убедительных доказательств, что VBNC, как и персистенция, являются эффективными клеточными стратегиями выживания бактерий в неблагоприятных условиях роста. За десятилетия исследований этих устойчивых (дормантных) форм были собраны многочисленные сведения о регуляторной, морфологической и функциональной близости феноменов персистенции и состояния VBNC, и это сходство подробно обсуждалось в литературе [20].

На основании схожести условий возникновения, морфологических признаков и молекулярно-генетических механизмов этих устойчивых форм некоторые авторы ставят между ними знак равенства [20]. Впрочем, большинство исследователей указывает и на различия, которые были многократно подтверждены экспериментально. Основное отличие VBNC связано с их неспособностью быстро восстанавливать параметры роста после прекращения действия стрессоров (требуется до 24 ч и более), в то время как персистеры сразу после прекращения действия антибиотиков рекультивируются *in vivo* на твердых питательных средах. В отсутствие морфологических отличий, время начала роста после нормализации условий является основным патогномичным признаком, позволяющим отличить VBNC от клеток-персистеров [9]. Важно отметить, что после рекультивации восстанавливается и вирулентность бактерий.

В работе М. Ауратян et al. [9] на основании единого молекулярно-генетического механизма регуляции обе устойчивые формы на различных физиологических уровнях были объединены в модель «континуума покоя».

Механизм появления устойчивых форм в популяции бактериальных клеток большинством авторов соотносился со стохастической изменчивостью их свойств, определяемых генами, окружающей средой и случайным шумом, который неизбежно присутствует на всех уровнях биологической организации, начиная с молекулярного [37]. Однако в конце прошлого века у прокариот были выявлены генетические локусы токсин-антитоксиновых систем (ТАС) и раскрыта их основная роль в клеточной физиологии, которая заключается в снижении метаболизма в стрессовых условиях [29, 45]. Как показано ниже, в формировании персистентности бактерий эти локусы играют решающую роль, для понимания которой необходимо более детально остановиться на структуре и функции ТАС.

Токсин-антитоксиновая система (ТАС). Современные достижения в области геномного секвенирования и биоинформатики нового поколения выявили высокую распространенность бактериальных токсин-антитоксиновых систем (ТАС), что пос-

лужило мощным стимулом для активизации глубоких исследований этих уникальных белковых структур [43]. Генетические модули ТАС содержат два гена, кодирующие стабильный токсин и нестабильный антитоксин, чувствительный к деградации клеточными протеазами.

В нормальных условиях токсин и антитоксин находятся в связанном состоянии, образуя плотный, нетоксичный комплекс. Однако при стрессе, связанном с появлением неблагоприятных условий окружающей среды, антитоксины деградируются при участии АТФ-зависимой Lon-протеазы либо сериновых бактериальных протеазных систем ClpXP, ClpCP и ClpAP. Это приводит к резкому снижению как скорости трансляции, так и репликации, а также и прекращению роста клеток вследствие цитотоксического эффекта токсина [43].

Дальнейшие исследования показали, что модули ТАС широко распространены и среди бактериальных хромосом, но их функция долгое время оставалась неизвестной [43]. Установлено, что эти системы принимают активное участие в образовании биопленок, а также участвуют в формировании у патогенных бактерий вирулентности и множественной устойчивости [11, 45, 46].

По типу генетической организации, характера антитоксина и механизма его взаимодействия с токсином в настоящее время выделены шесть типов модулей ТАС [35]. Во всех типах ТАС токсины представлены белками, тогда как антитоксины могут быть либо нетранслируемой антисмысловой РНК (I и III типы), либо лабильным белком (II, IV—VI типы) [29, 30, 25]. Наиболее охарактеризованными являются модули I и II типов.

Токсины I типа — это небольшие гидрофобные пептиды, которые вызывают потерю клеткой электрического мембранного потенциала и прекращение роста бактерий. Антитоксин подавляет активность белка токсина путем связывания мРНК [41].

Самыми распространенными и хорошо исследованными являются модули ТАС II типа. Токсины этого типа ингибируют репликацию клетки, подавляя активность ДНК-гиразы (ДНК-топоизомеразы II), но большинство из них функционируют как ингибиторы трансляции, обладая активностью эндорибонуклеазы (катализируют деградацию РНК) или инактивируя глутамил-тРНК-синтетазу (GltX) [17, 35, 41]. Антитоксины этого типа, являющиеся белками, блокируют токсин путем прямого связывания [17].

На ведущую роль ТАС II типа в формировании феномена персистенции указывает тот факт, что первый открытый ген устойчивости бактерий *hipA* впоследствии оказался ответственным за кодирование одноименного токсина в локусе *hipVA* ТАС II типа [22]. Кроме того, в клетках-персистерах модельных диких штаммов *E. coli* выявлена индукция сверхэкспрессии некоторых токсинов II типа: *relE* (генетический локус *relBE*) [41], *mazF* (локус *mazEF*) [17, 41], *dinJ* (локус *dinJ-yafQ*) и *mqsR* (локус *mqsQR*) [17].

В более поздних исследованиях на тех же моделях при антибиотикотерапии была выявлена аналогичная сверхэкспрессия токсинов ТАС I типа *tisB* (локус *tisB-istR*) и *hokB* (локус *hokB-sokB*), которая была связана с высокими уровнями гуанозин пентафосфата (ppGpp) — регулятора контроля скорости роста бактерий [15]. Эти токсины вызывали деполяризацию клеточной мембраны и резкое снижение метаболической активности, индукцию образования устойчивых клеток-персистеров [15, 30, 44].

Установлено, что в микробной клетке под действием токсинов подавляются ключевые клеточные процессы, такие как репликация ДНК и трансляция белка. Это ингибирование приводит к быстрой остановке роста и резкому снижению метаболической активности, формированию частичной или полной резистентности бактерий к антибиотикам, делает их устойчивыми к большинству антибактериальных средств [44].

Изучение функционирования комплексов ТАС позволило подтвердить гипотезу о физиологической неоднородности фракции клеток-персистеров в популяции и природу разной степени антибиотикорезистентности, а также помогло в выяснении механизмов формирования бактериальных покоящихся форм [8, 12, 24].

Возрастающее медицинское и эпидемиологическое значение сапронозных инфекций подтверждает актуальность изучения стратегий сохранения патогенного потенциала их возбудителей, а также способов их выживания в природных экосистемах в межэпидемический период.

Достижения современной клеточной биологии позволили существенно продвигаться в изучении молекулярно-генетических механизмов регуляции выживаемости бактерий и сохранения ими патогенного потенциала в нестабильных условиях природных экосистем в периоды сапрофитической и паразитической фаз их существования.

Дормантные формы существования бактериальных клеток — жизнеспособные, но не культивируемые, L-формы, персистенция и недавно открытое контакт-зависимое ингибирование роста (contact-dependent growth inhibition, CDI) [39] — определяют многообразие адаптационных стратегий микроорганизмов и арсенал сложных молекулярно-генетических регуляторных механизмов. В то же время, устойчивые формы бактерий могут представлять серьезную эпидемиологическую угрозу, связанную с переоценкой полноты дезинфекции. При наступлении благоприятных условий дормантные формы бактерий способны вновь перейти в активное вегетативное состояние и дать начало новой популяции [16, 31, 47].

Определение ведущей роли ТАС в формировании устойчивых клеточных форм и развитии антибиотикорезистентности бактерий имеет не только фундаментальное значение, но и открывает широкие перспективы для разработки новых антимикробных технологий. Высокая скорость приобретения патогенными бактериями множественной лекарственной устойчивости определяет актуальность и необходимость этого направления исследований.

Учитывая отсутствие генетических модулей ТАС у млекопитающих, и в том числе у человека, новые технологические стратегии могут быть направлены на создание эффективных и высокоспецифических биохимических модуляторов токсин-анти-токсिनных взаимодействий. Тем не менее, одним из возможных недостатков эффективности этих антимикробных стратегий является высокая распространенность ТАС и в геноме нормальной микробиоты, находящейся в симбиозе с человеческим организмом, что потребует разработки препаратов, нацеленных на несколько систем, в том числе пробиотического действия.

Другая особенность этой терапевтической стратегии заключается в том, что недостаточно просто ингибировать антитоксины для активации токсинов, действие последних необходимо будет в дальнейшем блокировать другими препаратами [19, 31]. Однако стимулирование дальнейших фундаментальных исследований ТАС в патогенных бактериях может дать ценную информацию для создания будущих антибактериальных альтернатив.

Ряд перспективных антибактериальных стратегий связаны с АТФ-зависимой казеин-литической протеазой ClpP, важнейшим компонентом комплексов ClpXP и ClpAP бактерий [25, 50]. Одна из этих стратегий связана с активацией ClpP циклическим ацилдепептидом (ADEP-4, одной из шести конфигураций этого природного антибиотика) и вызывает неконтролируемую деградацию белка, ингибирование деления бактериальных клеток и последующую гибель как активно делящихся, так и клеток-персистеров грамположительной флоры. Эффективность ADEP-4 возрастает в сочетании с различными антибиотиками, такими как ципрофлоксацин, линезолид, ванкомицин или рифампицин [25, 50]. Другие исследователи предла-

гают иные пути, связанные с инактивацией C₁pP [48, 50]. Эти стратегии являются перспективными для разработки на их основе новых форм лекарств.

Другие микробиологические биотехнологические подходы борьбы с устойчивыми клеточными формами связаны с механизмами «persister awakening» (пробуждение клеток-персистеров) [25, 26, 40]. В этих подходах используются соединения, для поступления в клетку которых не требуется активного транспорта, а процесс киллинга клеток-мишеней — каких-либо клеточных механизмов. Примерами таких биотехнологий, активных при сочетанных инфекциях, ассоциированных с *E. coli*, *S. aureus* и *P. aeruginosa*, являются использование ДНК-сшивающих противоопухолевых цитостатических препаратов, митомицина С [23] и цисплатина [14].

Таким образом, изучение механизмов и закономерностей регуляции образования устойчивых клеточных форм с целью предотвращения формирования персистенции и (или) выявление факторов, модулирующих скорость реверсии клеток от вегетативного активного состояния до некультивируемых клеточных форм, предполагает возможность повышения эффективности антибиотикотерапии, выявления молекулярных мишеней для создания новых антибактериальных препаратов и стратегий.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Белов А.Б., Кузин А.А. Сапронозные инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи: проблемные вопросы теории. Пермский медицин. журнал. 2017, 34(4): 94-102.
2. Белов А.Б., Куликалова Е.С. Сапронозы: экология возбудителей, эпидемиология, терминология и систематика. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 86(1): 5-16.
3. Брусина Е.Б. Эпидемиология инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванных возбудителями группы сапронозов. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015, 81(2): 50-56.
4. Бухарин О.В. Инфекционная симбиология. Журн. микробиол. 2015, 4: 4-9.
5. Литвин В.Ю., Сомов Г.П., Пушкарева В.И. Сапронозы как природно-очаговые болезни. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 50(1): 10-16.
6. Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток: ОАО «Полиграфкомбинат», 2004.
7. Allison K.R., Brynildsen M.P., Collins J.J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. Nature. 2011, 473: 216-220.
8. Amato S.M., Brynildsen M.P. Persister Heterogeneity Arising from a Single Metabolic Stress. Curr. Biol. 2015, 25(16): 2090-2098.
9. Ayrapetyan M., Williams T.C., Baxter R. et al. Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum. Infect. Immun. 2015, 83(11): 4194-4203.
10. Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. Appl. Environ. Microbiol. 2014, 80(8): 2478-2483.
11. Bamford R.A., Smith A., Metz J. et al. Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy. BMC Biol. 2017, 15(1): 121.
12. Barth V.C., Rodrigues B.B., Bonatto G.D. et al. Heterogeneous persister cells formation in *Acinetobacter baumannii*. PLoS One. 2013, 8(12): e84361.
13. Chen S., Thompson K.M., Francis M.S. Environmental Regulation of *Yersinia* Pathophysiology. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2016, 6: 25.
14. Chowdhury N., Wood T.L., Martinez-Vázquez M. et al. DNA-crosslinker cisplatin eradicates bacterial persister cells. Biotechnol. Bioeng. 2016, 113(9): 1984-1992.
15. Dörr T., Vulić M., Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. PLoS Biol. 2010, 8(2): e1000317.
16. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. Nat. Rev. Microbiol. 2017, 15(8): 453-464.

17. Ghafourian S., Raftari M., Sadeghifard N. et al. Toxin-antitoxin systems: classification, biological function and application in biotechnology. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2014, 16(1): 9-14.
18. Hubálek Z., Rudolf I. *Microbial Zoonoses and Sapronoses*. USA: Springer Science & Business Media B.V. 2011.
19. Jaén-Luchoro D., Aliaga-Lozano F., Gomila R.M. et al. First insights into a type II toxin-antitoxin system from the clinical isolate *Mycobacterium* sp. MHSD3, similar to epsilon/zeta systems. *PLoS One*. 2017, 12(12): e0189459.
20. Kim J.-S., Chowdhury N., Yamasaki R. et al. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state. *Environmental Microbiology*. 2018, 20(6): 2038-2048.
21. Kint C.I., Verstraeten N., Fauvart M. et al. New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol.* 2012, 20(12): 577-585.
22. Korch S.B., Hill T.M. Ectopic overexpression of wild-type and mutant *hipA* genes in *Escherichia coli*: effects on macromolecular synthesis and persister formation. *J. Bacteriol.* 2006, 188(11): 3826-3836.
23. Kwan B.W., Chowdhury N., Wood T.K. Combatting bacterial infections by killing persister cells with mitomycin C. *Environ. Microbiol.* 2015, 17(11): 4406-4414.
24. Levin B.R., Concepcion-Acevedo J., Udekwi K.I. Persistence: a copacetic and parsimonious hypothesis for the existence of non-inherited resistance to antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 2014, 21: 18-21.
25. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013, 12(5): 371-387.
26. Lewis K., Shan Y. Persister Awakening, *Mol. Cell.* 2016, 63(1): 3-4.
27. Li L., Mendis N., Trigui H. et al. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 2014, 5: 258.
28. Lleo M.M., Ghidini V., Tafi M.C. et al. Detecting the presence of bacterial DNA by PCR can be useful in diagnosing culture-negative cases of infection, especially in patients with suspected infection and antibiotic therapy. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014, 354(2): 153-160.
29. Maisonneuve E., Castro-Camargo M., Gerdes K. (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. *Cell.* 2013, 154(50): 1140-1150.
30. Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell.* 2014, 157(3): 539-548.
31. Maleki A., Ghafourian S., Pakzad I. et al. *mazE* Antitoxin of Toxin Antitoxin System and *fbpA* as Reliable Targets to Eradication of *Neisseria meningitidis*. *Curr. Pharm. Des.* 2017, 24(11): 1204-1210.
32. Michiels J.E., Van den Bergh B., Verstraeten N. et al. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resist. Updat.* 2016, 29: 76-89.
33. Nowakowska J., Oliver J.D. Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013, 84: 213-222.
34. Orman M.A., Brynildsen M.P. Erratum: Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat. Commun.* 2016, 7: 10756.
35. Page R., Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat. Chem. Biol.* 2016, 12(4): 208-214.
36. Patra P., Klumpp S. Population Dynamics of Bacterial Persistence. *PLoS One*. 2013, 8(5): e62814.
37. Pienaar J.A., Singh A., Barnard T.G. The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: A general review. *Afr. J. Lab. Med.* 2016, 5(1): 368.
38. Potgieter M., Bester J., Kell D.B. et al. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015, 39(4): 567-591.
39. Ruhe Z.C., Low D.A., Hayes C.S. Bacterial contact-dependent growth inhibition. *Trends Microbiol.* 2013, 21(5): 230-237.
40. Schottroff F., Fröhling A., Zunabovic-Pichler M. et al. Sublethal Injury and Viable but Non-culturable (VBNC) State in Microorganisms During Preservation of Food and Biological Materials by Non-Thermal Processes. *Front. Microbiol.* 2018, 9: 2773.
41. Thakur Z., Dharra R., Saini V. et al. Insights from the protein-protein interaction network analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems. *Bioinformation*. 2017, 13(11): 380-387.
42. Van den Bergh B., Michiels J.E., Fauvart M. et al. Should we develop screens for multi-drug antibiotic tolerance? *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2016, 14(7): 613-616.
43. Van Melderen L. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Curr. Opin. Microbiol.* 2010, 13(6): 781-785.

44. Verstraeten N., Knapen W.J., Fauvart M. et al. Membrane depolarization-triggered responsive diversification leads to antibiotic tolerance. *Microb. Cell.* 2015, 2(8): 299-301.
45. Wang X., Wood T.K. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77(16): 5577-5583.
46. Wen Y., Behiels E., Devreese B. Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog. Dis.* 2014, 70(3): 240-249.
47. Wood T.K. Combatting bacterial persister cells. *Biotechnol. Bioeng.* 2016, 113(3): 476-483.
48. Wood T.K. Strategies for combating persister cell and biofilm infections. *Microb. Biotechnol.* 2017, 10(5): 1054-1056.
49. Xiao X.L., Tian C., Yu Y.G. et al. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 using propidium monoazide treatments and qPCR. *Can. J. Microbiol.* 2013, 59: 157-163.
50. Zeiler E., List A., Alte F. et al. Structural and functional insights into caseinolytic proteases reveal an unprecedented regulation principle of their catalytic triad. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013, 110(28): 11302-11307.

Поступила 25.02.19

Контактная информация: Андрюков Борис Георгиевич, д.м.н.,
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1, р.т. (423)244-26-04

СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Солонин С.А., Корабельникова М.И., Баженов А.И., Кудрявцева Е.Н., Кузин С.Н., Годков М.А.* Частота обнаружения маркеров ВИЧ-инфекции у пациентов многопрофильных стационаров как параметр мониторинга системы эпидемиологического надзора 3
- Solonin S.A., Korabelnikova M.I., Bazhenov A.I., Kudryavtseva E.N., Kuzin S.N., Godkov M.A.* The prevalence of HIV infection in patients of general hospitals as a parameter for monitoring the system of epidemiological surveillance
- Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Бердникова Т.В., Евченко А.Ю., Бобрышева О.В., Сирица Ю.В., Писаренко С.В., Жиров А.М., Кузнецова И.В., Варфоломеева Н.Г., Куличенко А.Н.* Масс-спектрометрический анализ белковых экстрактов крови животных при экспериментальном бруцеллезе 11
- Ulshina D.V., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Berdnikova T.V., Evchenko A.Yu., Bobrysheva O.V., Siritsa Yu.V., Pisarenko S.V., Zhiron A.M., Kuznetsova I.V., Varfolomeeva N.G., Kulichenko A.N.* Mass spectrometry analysis of protein blood extracts of animals with experimental brucellos
- Котенева Е.А., Котенев Е.С., Калинин А.В., Царева Н.С., Кот Л.А., Жаринова Н.В., Зайцев А.А., Печковский Г.А.* Протеомное профилирование штаммов *Yersinia pestis*, циркулирующих на территории природных очагов чумы Северного Кавказа и Закавказья 18
- Koteneva E.A., Kotenev E.S., Kalinin A.V., Tsareva N.S., Kot L.A., Zharinova N.V., Zaitsev A.A., Pechkovsky G.A.* Proteomic profiling of *Yersinia pestis* strains circulating in the area of natural plague foci of North Caucasus and Transcaucasia
- Балахонов С.В., Дубровина В.И., Войткова В.В., Корытов К.М., Баранникова Н.Л., Николаев В.Б., Шкаруба Т.Т.* Иммунофенотипирование клеток крови экспериментальных животных, иммунизированных термоэкстрактами *Brucella abortus* 25
- Balakhonov S.V., Dubrovina V.I., Voitkova V.V., Korytov K.M., Barannikova N.L., Nikolaev V.B., Shkaruba T.T.* Immunophenotyping of blood cells of experimental animals immunized with *Brucella abortus* thermoextracts
- Жарникова И.В., Ефременко В.И., Жарникова Т.В., Курчева С.А., Кальной С.М., Ефременко Д.В., Исакова А.А., Инденбом А.В.* Серологические методы выявления возбудителя туляремии и их оценка 32
- Zharnikova I.V., Efremenko V.I., Zharnikova T.V., Kurcheva S.A., Kalnoy S.M., Efremenko D.V., Isakova A.A., Indenbom A.V.* Serological methods for detection of the causative agent of tularemia and their evaluation
- Игнатьев Г.М., Отрашевская Е.В., Суханова Л.Л., Сидоренко Е.С., Нетесова Н.А.* Молекулярно-генетическое исследование штамма RA-27/3, используемого для производства вакцины против краснухи 38
- Ignatev G.M., Atrashevskaya E.V., Suchanova L.I., Sidorenko E.S., Netesova N.A.* Molecular-genetic study of the RA-27/3 strain used for production of rubella vaccine
- Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Малецкая О.В., Волюнкина А.С., Прислегина Д.А., Семенко О.В., Куличенко А.Н.* Современное состояние природного очага Крымской геморрагической лихорадки в Российской Федерации 46
- Vasilenko N.F., Manin E.A., Maletskaya O.V., Volynkina A.S., Prislegina D.A., Semenko O.V., Kulichenko A.N.* The modern condition of Crimean-Congo haemorrhagic fever natural focus in the Russian Federation
- Тапальский Д.В., Петровская Т.А., Бонда Н.А., Козлова А.И., Осипкина О.В.* Распространенность карбапенемазопroduцирующих *Klebsiella pneumoniae* в Гомельской области 53
- Tapalski D.V., Petrovskaya T.A., Bonda N.A., Kozlova A.I., Osipkina O.V.* Prevalence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Gomel Region
- Святченко С.В., Дурьманов А.Г., Колосова Н.П., Гудымо А.С., Гончарова Н.И., Торжкова П.Ю., Буланович Ю.А., Епанчинцева А.В., Даниленко А.В., Марченко В.Ю., Сысоева А.В., Суслопаров И.М.,*

- Трегубчак Т.В., Рыжиков А.Б., Максюттов Р.А., Ильичева Т.Н.* Тяжелые случаи заболевания гриппом на территории Российской Федерации в эпидемическом сезоне 2017-2018 58
- Svyatchenko S.V., Durymanov A.G., Kolosova N.P., Gudymo A.S., Goncharova N.I., Torzhkova P.Yu., Bulanovich Yu.A., Epanchintseva A.V., Danilenko A.V., Marchenko V.Yu., Sysoeva A.V., Susloparov I.M., Tregubchak T.V., Ryzhikov A.B., Maksyutov R.A., Ilicheva T.N.* Severe cases of seasonal influenza in Russia in 2017-2018
- Контаров Н.А., Погарская И.В., Юминова Н.В.* Изучение влияния полиэлектролитов, обладающих противовирусным действием, на активность нейраминидазы вируса гриппа и процесс окислительного фосфорилирования в митохондриях клеток организма-хозяина 64
- Kontarov N.A., Pogarskaya I.V., Yuminova N.V.* Study of the effect of polyelectrolytes with antiviral effect on the activity of influenza virus neuraminidase and the process of oxidative phosphorylation in mitochondrias of cells host organism
- Смирнова А.О., Барановская С.А., Токарская М.М., Елкина С.И., Ястребова Н.Е.* Модели зависимости количества биомассы *Streptococcus pneumoniae* и его капсульного полисахарида от состава питательной среды 68
- Smirnova A.O., Baranovskaya S.A., Tokarskaya M.M., Elkina S.I., Yastrebova N.E.* Models of dependence of the quantity of the *Streptococcus pneumoniae* biomass and his capsular polysaccharide from the composition of the feeding environment
- Орлова О.А., Семенов Т.А., Акимкин В.Г.* Сравнительный анализ эффективности использования бактериологических и молекулярно-биологических методов для оценки микробной обсемененности объектов внутрибольничной среды 73
- Orlova O.A., Semenenko T.A., Akimkin V.G.* Comparative analysis of efficiency of bacteriological and molecular-biological methods for the assessment of microbial contamination of hospital environment objects

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ (SHORT COMMUNICATION)

- Куклина Г.В., Елагин Г.Д., Печенкин Д.В., Фоменков О.О., Еремкин А.В., Кытманов А.А., Шурупов С.А., Ипатов С.С.* Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к антигенам *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. 78
- Kuklina G.V., Elagin G.D., Pechenkin D.V., Fomenkov O.O., Eremkin A.V., Kytmanov A.A., Shurupov S.A., Ipatov S.S.* Manufacturing of hybridomas, producing monoclonal antibodies against *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* antigens

ОБЗОРЫ (REVIEWS)

- Лавров В.Ф., Свитич О.А., Казанова А.С., Кинкулькина А.Р., Зверев В.В.* Varicella Zoster-вирусная инфекция: иммунитет, диагностика и моделирование *in vivo* 82
- Lavrov V.F., Svitich O.A., Kazanova A.S., Kinkul'kina A.R., Zverev V.V.* Varicella Zoster virus infection: immunity, diagnosis and modelling *in vivo*
- Протасов А.В., Андреева Н.П., Костинова А.М.* Вакцинация пациентов с бронхиальной астмой против гриппа и пневмококковой инфекции 90
- Protasov A.V., Andreeva N.P., Kostinova A.M.* Vaccination of patients with bronchial asthma against influenza and pneumococcal infection
- Бажанова И.Г., Брицина М.В., Мерцалова Н.У., Озерецковская М.Н.* Генетическая изменчивость *Bordetella pertussis* и ее роль в вакцинопрофилактике коклюша 98
- Bazhanova I.G., Britsina M.V., Mertsalova N.U., Ozeretskovskaya M.N.* Genetic variability of *Bordetella pertussis* and its role in vaccine prevention of pertussis
- Шендеров Б.А., Юдин С.М., Загайнова А.В., Шевырева М.П.* Akkermansia muciniphila — новый универсальный пробиотик на основе живых комменсальных бактерий кишечника человека: действительность или легенда? 105
- Shenderov B.A., Yudin S.M., Zagaynova A.V., Shevyreva M.P.* Akkermansia muciniphila is a new universal probiotic on the basis of live human commensal gut bacteria: the reality or legend?
- Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Бынина М.П., Ляпун И.Н.* Молекулярно-генетические механизмы сохранения патогенного потенциала возбудителей природно-очаговых сапронозов . . 115
- Andryukov B.G., Somova L.M., Bynina M.P., Lyapun I.N.* Molecular-genetic mechanisms of conservation of the pathogenic potential of the causative agents environments of natural-focus sapronosis