

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; Т.А.СЕМЕНЕНКО, д.м.н., проф.;
Р.И.СЕПИАШВИЛИ, д.м.н., проф., член-корр. РАН; В.П.СЕРГИЕВ, д.м.н., проф.,
академик РАН; Арег А.ТОТОЛЯН, 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.

5

сентябрь—октябрь

МОСКВА 2019

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,
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

Внимание!

**Изменились правила оформления статей.
См. сайт ЖМЭИ: microbiol.elpub.ru**

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

Формат 70x108 1/16. Печать офсетная.

Отпечатано в типографии 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

Ю.К.Гаврилова, С.В.Генералов, М.Н.Киреев, Н.А.Шарапова¹, Е.Г.Абрамова, Л.В.Савицкая, М.В.Овчинникова, Т.Ю.Кириллова, А.П.Семакова

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ К РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНУ АТТЕНУИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Цель. Выделение рибонуклеопротеина (РНП) аттенуированного вируса бешенства с последующей разработкой схем иммунизации животных препаратами на его основе и установлением наиболее эффективной схемы, позволяющей получить сыворотку с высоким титром антител к РНП. *Материалы и методы.* В работе использовали перевиваемую клеточную линию Vero, штамм вируса бешенства «Москва 3253_{vero}», адаптированный к репродукции на клетках Vero, кроликов породы шиншилла. С целью получения сывороток, содержащих антитела к РНП вируса бешенства, предложены экспериментальные схемы иммунизации животных РНП, в том числе и с адъювантами: полиоксидонием и коллоидным золотом. Динамика накопления антител к РНП вируса бешенства в сыворотке крови подопытных животных исследована методом дот-иммуноанализа. *Результаты.* Целевой компонент (РНП вируса бешенства) выделяли непосредственно из цитоплазмы инфицированной вирусом бешенства клеточной культуры Vero по модифицированному методу M. Dastkhosh (2014), лиофильно высушивали и использовали при разработке препаратов для иммунизации животных-продуцентов. При исследовании динамики образования антител к РНП вируса бешенства методом дот-иммуноанализа установлена эффективность действия адъюванта — наночастиц коллоидного золота размером от 15 до 17 нм, применение которого позволяет увеличить титр антител в 2 раза. *Заключение.* Полученные результаты представляют интерес для дальнейших исследований, связанных с конструированием диагностических препаратов и разработкой методических приемов с использованием подобных препаратов.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 3—8

Ключевые слова: бешенство, вирус бешенства, рибонуклеопротеин, схема иммунизации, иммунные сыворотки, антитела к рибонуклеопротеину, антирабический иммуноглобулин

Yu.K.Gavrilova, S.V.Generalov, M.N.Kireev, N.A.Sharapova, E.G.Abramova, L.V.Savitskaya, M.V.Ovchinnikova, T.Yu.Kirillova, A.P.Semakova

DEVELOPMENT OF THE SCHEME OF OBTAINING ANTIBODIES TO THE RIBONUCLEOPROTEIN OF ATTENUATED RABIES VIRUS

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

Aim. Isolation of ribonucleoprotein (RNP) of an attenuated rabies virus, develop schemes for immunizing animals with RNP-based preparations and determine the most effective scheme that allows obtaining serum with a high antibody titer to the RNP. *Materials and methods.* We used the transplantable cell line Vero, the strain rabies virus «Moscow 3253_{vero}», adapted for reproduction on Vero, rabbits of the chinchilla breed. In order to obtain serums containing antibodies to the RNP of the rabies virus, experimental schemes have been proposed for immunizing animals with RNP, including with adjuvants: polyoxidonium and colloidal gold. The dynamics of the accumulation of antibodies to the RNP of the rabies virus in the blood serum of experimental animals was studied by dot-immunoassay. *Results.* The target component (RNP of

the rabies virus) was isolated directly from the cytoplasm of the Vero cell culture infected with the rabies virus according to the modified M. Dastkhosh (2014) method, lyophilized and used in the development of preparations for immunizing experimental animals. In the study of the dynamics of the formation of antibodies to RNP of the rabies virus by the method of dot-immunoassay, the effectiveness of an adjuvant is established — colloidal gold nanoparticles ranging in size from 15 to 17 nm, the use of which makes it possible to increase the antibody titer by 2 times. *Conclusion.* The results obtained are of interest for further research related to the design of diagnostic products and the development of methodological techniques using such preparations.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 3—8

Key words: rabies, rabies virus, ribonucleoprotein, immunization schedule, immune sera, antibodies to ribonucleoprotein, anti-rabies immunoglobulin

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство, характеризующееся безрезультативностью лечения инфекции при появлении первых клинических симптомов и, как следствие, абсолютной летальностью, в настоящее время представляет проблему для многих государств мира [15]. Важную роль в предупреждении развития данного заболевания играет своевременное принятие мер экстренной профилактики, а также выявление случаев инфицирования вирусом бешенства с помощью современных лабораторных методов. Для оценки титра антител к вирусу бешенства в сыворотке крови иммунизированных животных, а также для выявления самого вируса, применяют методы, основанные на иммунофлуоресценции [7].

Среди рекомендованных экспертами ВОЗ методов определения титра антител к вирусу бешенства в материале особое место занимает реакция нейтрализации вируса бешенства на клеточной культуре с применением флуоресцирующих антител, которая также известна, как FAVN тест (fluorescent antibody virus neutralization test) [15]. Многочисленные исследования свидетельствуют об успешном использовании различных модификаций данного теста при оценке содержания специфических антител в материале. Основные отличия существующих модификаций состоят в применении различных клеточных линий и штаммов вируса бешенства [7, 10]. Для использования в производстве антирабического иммуноглобулина предложена модификация FAVN теста с применением перевиваемой клеточной линии Vero и штамма вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» [3].

При постановке реакции нейтрализации на клеточной культуре окрашивание проводят с применением флуоресцирующих конъюгатов на основе антител, полученных к вирусу бешенства [7, 10]. На наш взгляд, более эффективным является выявление не цельного вируса, а его компонента — рибонуклеопротеина (РНП), содержащегося в цитоплазме инфицированной клетки на этапе сборки вирусной частицы. Такой подход позволит сократить время проведения анализа. Более того, применение антител к РНП вируса бешенства оправдано и при конструировании других диагностических наборов, например, для иммуноферментного анализа [6].

Целью данного исследования явилась разработка эффективной схемы получения сыворотки, содержащей специфические антитела к РНП штамма вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартышки (*Vero*), используемая в работе, была получена из коллекции ООО «Биолот» (Россия) и про-

верена на отсутствие микоплазм. Клетки Vero культивировали в течение трёх суток стационарным методом на культуральных флаконах с площадью рабочей поверхности 75 см² («Orange Scientific», Бельгия) с применением питательной среды Игла MEM с 10 % сыворотки КРС (ООО «Биолот», Россия) в CO₂ инкубаторе MCO-15AC (Sanyo, Япония).

В работе использовали аттенуированный штамм вируса бешенства «Москва 3253_{vero}» (получен из НЦЭСМП, Москва, Россия), адаптированный к росту на клеточной культуре Vero [1]. РНП из инфицированной вирусом бешенства клеточной культуры Vero выделяли по модифицированному методу M. Dastkhosh [12]. В основу метода положен принцип извлечения РНП непосредственно из содержимого инфицированной клетки на ранних этапах репродукции вируса. В суспензию клеток Vero вносили вирусосодержащую жидкость в дозе 0,1-1,0 ИД₅₀ на клетку. Выращивание вируса бешенства на культуре Vero осуществляли в условиях, аналогичных условиям для культивирования неинфицированной клеточной линии. Культуру клеток собирали и инкубировали в течение 30 мин при 56⁰С на водяной бане для инактивации вируса бешенства, затем клетки осаждали центрифугированием при ускорении 900 g в течение 10 минут и двукратно промывали 0,9% раствором хлорида натрия. Для осуществления клеточного лизиса полученный осадок суспендировали в ледяной деионизованной воде с 0,2 мМ фенолметилсульфонилфлуорида (AppliChem), инкубировали в холодильнике в ёмкости со льдом в течение 1 ч, после чего клетки и клеточный детрит осаждали на центрифуге Sigma 2K15 (Германия) в течение 20 минут при ускорении 1000 g и температуре 4⁰С. Процедуру лизиса клеток с последующим центрифугированием проводили двукратно. Полученную надосадочную жидкость, содержащую РНП, собирали и высушивали на лиофильной установке Alpha-1-5 (Германия) в течение 8 часов. Полученный лиофилизат РНП использовали для иммунизации кроликов породы шиншилла обоего пола, массой от 1,5 до 2,5 кг.

С целью получения материала для иммунизации РНП вируса бешенства растворяли в деионизованной воде до концентрации 400 мкг/мл, при необходимости добавляли адъювант, а затем внутримышечно вводили подопытным животным на 0, 43 и 57 сут от начала иммунизации. Материал для иммунизации готовили за 1,5-2 ч до введения и хранили при температуре 5-8⁰С, за 30 мин до введения животным выдерживали при комнатной температуре. В качестве адъювантов использовали полиоксидоний (лиофилизат, ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия) и раствор коллоидного золота с размером частиц от 15 до 17 нм, который получали по стандартной методике [14].

Процедуры взятия образцов крови из краевой ушной вены, а также тотального обескровливания экспериментальных животных осуществляли с соблюдением принципов биоэтики [5]. При выполнении тотального обескровливания применяли препараты ксила (Interchemie werken «De Adelaar» B.V. Нидерланды) и золетил (Virbac, Франция).

Собранную от различных экспериментальных групп сыворотку крови выдерживали в течение месяца при 4-8 °С, после чего проводили исследование показателя активности сывороток in vitro в дот-иммуноанализе [8]. При хранении в качестве консерванта использовали раствор хинозола в концентрации 0,5 мл на 100 мл сыворотки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы являлась задача получения РНП вируса бешенства. Особенностью РНП является сложность его выделения непосредственно из вирусных частиц. Более эффективным подходом является его выделение из цитоплазмы

клеток, в которых происходит репродукция вируса бешенства. Выбранный способ получения РНП является простым в исполнении и в наименьшей степени влияет на его структурную целостность, от которой зависят биологические и иммунологические функции указанной субъединицы [12]. Следует отметить, что оптимальное время культивирования используемого в работе штамма вируса бешенства на клетках Vero с целью получения РНП составило (72 ± 4) ч. Изменение сроков выращивания инфицированной вирусом культуры клеток приводило к уменьшению выхода РНП. Выход РНП с монослойной клеточной культуры, содержащей $(2,8 \pm 0,4) \times 10^6$ клеток, составил $0,18 \pm 0,02$ мг/мл. Лиофильно высушенный РНП представлял собой белый порошок, хорошо растворимый в воде. Образцы РНП являлись электрофоретически однородными, примеси отсутствовали. Молекулярная масса соответствовала 55 кДа.

На следующем этапе работы выполняли иммунизацию кроликов раствором РНП с целью получения антител к нему. Выбор схем иммунизации животных обусловлен опытом отечественных и зарубежных исследователей [6, 11]. С целью повышения активности сывороток к РНП в качестве адъювантов использовали полиоксидоний и наночастицы коллоидного золота.

Иммуноадъювантное действие полиоксидония ранее было доказано при его совместном введении с антирабической вакциной, проявляющееся в усилении ее протективных свойств и увеличении выживаемости животных при их инфицировании [2]. Отмечено также усиление антителообразования в ответ на введение кроликам инактивированного аттенуированного вируса бешенства вместе с полиоксидонием [4].

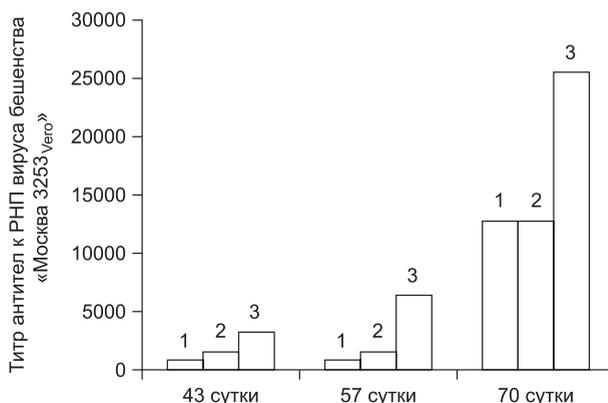
Применение металлов, в том числе золота, в виде наноразмерных частиц в качестве адъювантов противовирусных вакцин также обосновано результатами отечественных и зарубежных исследователей [9, 13]. При этом рекомендуемый средний размер золотых наночастиц составляет 15 либо 50 нм [13]. В настоящей работе использовали раствор коллоидного золота с размером частиц от 15 до 17 нм.

Исследование антителообразования проводили на трех группах, каждая из которых включала 3 животных. Первую группу иммунизировали раствором РНП без добавления адъювантов (дозировка — 400 мкг РНП), вторую и третью — с адъювантами: полиоксидоний (дозировка — 1 мг полиоксидония, 400 мкг РНП) и раствор коллоидного золота соответственно (дозировка — 0,5 мл раствора наночастиц коллоидного золота, 400 мкг РНП). Конечный объем материала, вводимого подопытным животным, составлял 1 мл.

Для исследования динамики накопления антител в крови экспериментальных животных на 43 и 57 дни эксперимента у животных каждой экспериментальной группы брали образцы крови из краевой вены уха.

На 70 день эксперимента осуществляли процедуру тотального обескровливания подопытных животных с применением лекарственных препаратов ксила и золетил. Оба препарата принадлежат к 3 классу опасности по ГОСТ 12.1.007-76. Препарат ксила оказывает миорелаксационный, седативный и анальгезирующий эффект. Данный препарат вводили подопытным животным в концентрации 0,15 мл/кг. Золетил представляет собой комплексный анестетик, оказывает анксиолитическое, седативное действие, расслабление скелетной мускулатуры. Введение препарата подопытным животным осуществляли в концентрации 0,1 мл/кг. Комплекс препаратов ксила и золетил, взятых в соответствии с массой подопытного животного, доводили 0,9% физиологическим раствором до объема 1,5 мл и вводили животным в краевую вену уха. Эффект от введения препаратов наблюдали через 10-20 с после инъекции.

Титр антител к РНП в собранных сыворотках устанавливали в дот-иммуноанализе с применением антигенного диагностикума с наночастицами коллоидного золота. При исследовании образцов крови животных из всех экспериментальных групп был подтвержден факт образования антител к РНП. Наибольший титр установлен в группе животных, иммунизированных РНП в сочетании с золотыми наночастицами. К 43 дню исследования титр антител к РНП составлял 1:3200, что превышало значения титра антител в сыворотках, полученных от животных 1 и 2 групп, в 4 и 2 раза соответственно. Аналогичная тенденция сохранялась до конца эксперимента. К 70 дню исследования титр антител в сыворотках,



Титр антител к РНП вируса бешенства в образцах сыворотки крови животных трех экспериментальных групп на 43, 57 и 70 сутки от начала иммунизации.

полученных от животных, иммунизированных РНП с наночастицами золота, составил 1:25 600 и являлся наибольшим по сравнению с титрами антител сывороток, полученных от животных остальных экспериментальных групп (рис.).

1 — группа животных, иммунизированных РНП вируса бешенства штамма «Москва 3253_{vero}»; 2 — группа животных, иммунизированных РНП вируса бешенства штамма «Москва 3253_{vero}» в комплексе с адьювантом (полиоксидоний); 3 — группа животных, иммунизированных РНП вируса бешенства штамма «Москва 3253_{vero}» в комплексе с адьювантом (наночастицы коллоидного золота 0,1 моль/л)

Таким образом, в результате исследования предложена эффективная схема получения антител к РНП вируса бешенства, включающая этапы получения антигена, приготовления на его основе препаратов для иммунизации животных-продуктов с последующим проведением иммунизационных мероприятий и выявления эффективной схемы иммунизации, позволяющей получить наибольший титр антител к РНП в сыворотках крови животных. Особенностью этапа получения антигена является культивирование вируса бешенства на клеточной культуре Vero в течение 72 ч в условиях CO₂ инкубатора (37 °C и 5% CO₂), непосредственное выделение нативного РНП из инфицированной клеточной культуры и его лиофильное высушивание. В ходе эксперимента было установлено, что наиболее эффективной является схема иммунизации животных РНП в сочетании с наночастицами коллоидного золота размером от 15 до 17 нм. При этом следует отметить и положительный эффект использования в качестве адьюванта полиоксидония на образование антител к РНП.

Полученные результаты представляют интерес для дальнейших исследований, связанных с конструированием диагностических препаратов для исследования биологического материала на содержание вируса бешенства и антител к нему.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В. и др. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 2: 95-101.
2. Авдеева Ж.И., Алпатов Н.А., Акользина С.Е. и др. Иммуноадьювантный эффект цитокинов. Тихоокеанский мед. журнал. 2009, 3: 19-22.

3. Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Абрамова Е.Г. и др. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции. Биотехнология. 2018, 4 (34): 83-88.
4. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В. и др. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 2 (112): 78-81.
5. Германчук В.Г., Семакова А.П., Шавина Н.Ю. Этические принципы при обращении с лабораторными животными в эксперименте с патогенными биологическими агентами I-II групп. Проблемы особо опасных инфекций. 2018, 4: 33-38.
6. Сухарьков А.Ю., Назаров Н.А., Метлин А.Е. Диагностика бешенства животных методом иммуноферментного анализа, сравнение прямого и непрямого сэндвич-варианта. Ветеринария Кубани. 2011, 6: 12-14.
7. Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Шуралев Э.А. и др. Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1). Гены и клетки. 2014, 3 (9): 276-280.
8. Шарапова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К. и др. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе. Проблемы особо опасных инфекций. 2010, 103(1): 63-66.
9. Asgary V., Shoari A., Baghbani-Arani F. et al. Green synthesis and evaluation of silver nanoparticles as adjuvant in rabies veterinary vaccine. Int. J. Nanomedicine. 2016, 11: 3597-3605.
10. Bedekovic T., Lemo N., Lojic I. et al. Modification of the fluorescent antibody virus neutralization test — Elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. Journal of Virological Methods. 2013, 189: 204-208.
11. Caporale G.M.M., Silva A. de C.R., Peixoto Z.M.P. et al. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil. Journal of clinical laboratory analysis. 2009, 23: 7-13.
12. Dastkhosh M., Rahimi P., Haghighat S. et al. Cell culture extraction and purification of rabies virus nucleoprotein. Jundishapur journal of microbiology. 2014, 7(9): 1-4.
13. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Immunological properties of gold nanoparticles. Chem. Sci. 2017, (8): 1719-1735.
14. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in minodisperse gold suspension. Nat. Phys. Sci. 1973, 241(105): 20-21.
15. WHO Expert Consultation on Rabies: third report. WHO technical report series 1012. Geneva, Switzerland. 2018.

Поступила 07.05.19

Контактная информация: Гаврилова Юлия Кирилловна,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452) 26-21-31

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

О.С.Бондарева, Г.А.Ткаченко, М.Л.Леденева, А.А.Батулин, Л.В.Лемасова, И.М.Шпак, А.А.Будченко

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ САПА НА ОСНОВЕ МУЛЬТИЛОКУСНОГО АНАЛИЗА ЧИСЛА ВАРИАБЕЛЬНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Разработка сокращенной схемы MLVA-типирования возбудителя сапа и оценка возможности ее применения для дифференциации штаммов *B. mallei* и изучения их генетического полиморфизма. *Материалы и методы.* Объектами исследования служили 14 штаммов *Burkholderia mallei* из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и 12

полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов возбудителя сапа, представленных в GenBank NCBI. При выборе VNTR-локусов для типирования возбудителя сапа использовали набор из 32 локусов, предложенных для дифференциации возбудителя мелиоидоза. Для определения размера VNTR-фрагментов использовали электрофорез в полиакриламидном геле, секвенирование и фрагментный анализ. *Результаты.* Выбраны наиболее вариабельные у возбудителя сапа VNTR-локусы (993, 3145, 3652, 20, 2862 и 1217), которые включены в итоговую схему MLVA-типирования. Оптимизированы условия проведения и учета результатов MLVA-типирования. *Заключение.* Анализ результатов типирования 26 штаммов *B. mallei* показал высокую дискриминирующую силу разработанного способа внутривидовой дифференциации возбудителя сапа на основе 6-локусной MLVA-схемы и перспективность его использования при эпидемиологическом расследовании для установления источника вспышки сапа.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 8—16

Ключевые слова: *Burkholderia mallei*, сап, MLVA, VNTR, генотипирование

O.S.Bondareva, G.A.Tkachenko, M.L.Ledeneva, A.A.Baturin, L.V.Lemasova, I.M.Shpak, A.A.Budchenko

DEVELOPMENT OF GENOTYPING METHOD OF THE GLANDERS CAUSATIVE AGENT BASED ON MULTIPLE LOCUS VARIABLE-NUMBER TANDEM REPEAT ANALYSIS

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

The aim was to develop a short MLVA-typing scheme of the causative agent of glanders and to assess the possibility of its use for differentiation of *Burkholderia mallei* strains and study their genetic polymorphism. *Materials and methods.* The study was carried out on 14 *B. mallei* strains from the collection of the Volgograd Research Institute for Plague Control and 12 whole genome sequences of the *B. mallei* strains presented in GenBank NCBI. A set of 32 loci proposed for differentiation of the melioidosis pathogen was used to select VNTR-loci for typing the causative agent of glanders. Polyacrylamide gel electrophoresis, sequencing, and fragment analysis were applied to detect the size of the VNTR fragments. *Results.* VNTR loci 993, 3145, 3652, 20, 2862, and 1217, which were selected as the most variable among the causative agent of glanders, were included in the final MLVA typing scheme. The parameters of setting and detecting the results of MLVA typing have been optimized. *Conclusion.* Analysis of the typing results of 26 *B. mallei* strains showed a high discriminating power of the developed method of intraspecies differentiation of glanders pathogen based on 6-loci MLVA-scheme and the prospects of its use for epidemiological investigation to determine the source of the glanders outbreak.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 8—16

Key words: *Burkholderia mallei*, glanders, MLVA, VNTR, genotyping

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель сапа *Burkholderia mallei* относится к патогенным представителям рода *Burkholderia*, вызывает тяжелое инфекционное заболевание у человека и довольно широкого круга животных, протекающее как в хронической, так и в острой форме с развитием сепсиса, образованием специфических гранулем и абсцессов в органах и тканях. Данная инфекция в естественных условиях встречается преимущественно у непарнокопытных животных, таких как лошади, ослы, мулы, а также у представителей семейств кошачьих и верблюдовых [6]. Заражение людей происходит при контакте с больными животными и обычно заболевание имеет спорадический характер. Однако возбудитель сапа крайне опасен в лабораторных условиях, описаны случаи заболевания исследователей из США и России [5; Van Zandt K.E. et al., 2013].

Тяжелое течение сапа в сочетании со стертой клинической картиной приводят к высокой смертности, достигающей 95% в случае развития сепсиса. Возбудитель сапа включен в список потенциальных агентов биотерроризма как в Российской Федерации, так и за рубежом, и относится ко второй группе патогенности в соответствии с СП 1.3.3118-13 [6; Van Zandt K.E. et al., 2013].

В последнее время случаи сапа регистрируют не только в эндемичных регионах Южной Азии, Африки, Бразилии, но и в странах, где его ранее не выявляли, например, в Объединенных Арабских Эмиратах, Бахрейне, или на территориях, где его считали ликвидированным, например, в Германии, Индии [9; Scholz H.C. et al., 2014]. Несмотря на отсутствие официально зарегистрированных случаев сапа в Российской Федерации, существует опасность заноса инфекции из-за рубежа, с территории близлежащих стран (Монголия, Турция, Иран и др.).

Для контроля над данной инфекцией необходимо совершенствовать методы идентификации и типирования *B. mallei*, что позволит своевременно диагностировать сап, исследовать выделенную культуру и установить источник заражения. При выборе метода генотипирования учитывают дискриминирующую силу, воспроизводимость, возможность сравнения данных полученных в разных лабораториях и корреляцию с географическим регионом происхождения штаммов. Данным параметрам соответствует мультилокусный VNTR-анализ, который с успехом применен для многих микроорганизмов, в том числе возбудителей особо опасных инфекций. При этом для типирования разработаны схемы с различным количеством VNTR-локусов: от 4 до 42 [3, 4, 10]. Повышение числа тестируемых локусов придает большую достоверность филогенетическому и эпидемиологическому анализу, однако сопровождается возрастанием продолжительности, трудоемкости и стоимости исследования.

В зарубежной литературе описано применение для анализа штаммов возбудителя сапа 32 и 23 VNTR-локусов, выбранных для возбудителя мелиоидоза, однако оптимизацию и проверку эффективности данного набора локусов для типирования *B. mallei* не проводили [8; Scholz H.C. et al., 2014]. В связи с этим, актуальной задачей является выбор локусов, наиболее перспективных для внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя сапа.

Цель работы — разработка сокращенной схемы MLVA-типирования возбудителя сапа и оценка возможности ее применения для дифференциации штаммов *B. mallei* и изучения их генетического полиморфизма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования было использовано 14 штаммов возбудителя сапа из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Подготовку проб и обеззараживание материала для молекулярно-генетических исследований проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13, МУ 1.3.2569-09 и МУ 4.2.2831-11. Штаммы возбудителя сапа выращивали на агаре с гидролизатом казеина, содержащем 5% глицерина, при 37°C в течение 2 суток.

Для анализа нуклеотидных последовательностей геномов штаммов *B. mallei* ATCC 23344, *B. mallei* NCTC 10229, *B. mallei* NCTC 10247, *B. mallei* SAVP1 на наличие и вариабельность фрагментов, содержащих тандемные повторы, использовали алгоритм BLASTn и базу данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

ДНК выделяли из суспензий клеток чистых культур штаммов *B. mallei* из разведения в концентрации 1×10^8 м.к./мл с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). ПЦР

проводили на термоциклере «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия). В состав реакционных смесей входили праймеры (синтезировали в ООО «Синтол», Россия), дНТФ (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), ПЦР-смесь-2 blue (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), ДНК исследуемого штамма *B. mallei*.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 3% агарозном геле при напряженности 5 В/см в течение 60 мин. Электрофорез в полиакриламидном геле осуществляли в камере для вертикального электрофореза PROTEAN II xi Cell 20 (BioRad», США). Результаты фиксировали в фоторегистрирующей системе «GelDoc» (BioRad, США). Для обработки ДНК-профилей, полученных после электрофореза в ПААГ, использовали программу RFLPscan 3.12 (CSP Inc., USA).

Секвенирование и фрагментный анализ проводили в капиллярном массиве длиной 50 см с полимерной матрицей POP-7 на автоматическом генетическом анализаторе «ABI 3130 Genetic Analyzer» («Applied Biosystems», США). Для секвенирования использовали набор реактивов «Big-Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems», США). В качестве размерного стандарта при проведении фрагментного анализа использовали S450 (ООО «Синтол», Россия). Для калибровки генетического анализатора применяли «Спектральный калибратор для ABI Prizm Any5Dye — FAM, R6G, TAMRA, ROX, LIZ» (ООО «Синтол», Россия). Обработку полученных на генетическом анализаторе данных проводили с помощью программного обеспечения «Applied Biosystems» (США).

Анализ уровня генетического родства и построение дендрограмм проводили в программе TreeCon for Windows v.1.3b с использованием метода объединения ближайших соседей (Neighbor joining) с коэффициентом генетической дистанции М. Nei и W.H. Li. Для оценки дискриминирующей способности использовали индекс Хантера-Гастона (HGDI) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки схемы типирования возбудителя сапа на основе мультилокусного анализа числа тандемных повторов мы использовали набор из 32 VNTR локусов, предложенных U'Ren J. M. et al. для генотипирования штаммов близкородственного *B. pseudomallei* [1]. Анализировали наличие и количество повторов в данных локусах в геноме четырех штаммов *B. mallei* (ATCC 23344, NCTC 10229, NCTC 10247, SAVP1). Установлено, что только 4 VNTR-локуса характеризовались различным числом повторов у каждого из штаммов возбудителя сапа, половина последовательностей полностью отсутствовала во всех полных геномах возбудителя сапа. Четыре VNTR-локуса не обнаружены у 1-3 штаммов возбудителя сапа. Из VNTR-фрагментов, присутствующих у всех проанализированных штаммов возбудителя сапа, в качестве мишеней для генотипирования отобрали локусы, представленные в трех и более аллельных вариантах. Данным критериям соответствовали локусы 993, 2065, 3145, 3652, 20, 1367, 1764, 1217, 2862, 2356, вариабельность которых в дальнейшем исследовали на штаммах возбудителя сапа из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

На следующем этапе работы подбирали оптимальные условия ПЦР выбранных 10 VNTR-локусов и определяли успешность их амплификации. Постановку ПЦР проводили в следующем температурном режиме: 5 мин денатурация при 95°C; затем 40 циклов: 10 с денатурация — 95°C, 10 с отжиг праймеров с оптимальной для каждого локуса температурой, 40 с элонгация цепи при 72°C; в конце в течение 2 мин финальная полимеризация. После проведения электрофореза в агарозном ге-

ле оценивали результаты амплификации. Большинство локусов характеризовались наличием специфичных ампликонов у каждого штамма. Однако у всех штаммов *B. mallei* отсутствовали ампликоны локуса 2356, а VNTR-локус 2065 характеризовался наличием двойных аллелей у части исследованных штаммов, затрудняющих анализ данных, в связи с этим они были исключены из работы.

Далее определили аллельные варианты локусов 993, 3145, 3652, 20, 1367, 1764, 1217 и 2862 у исследуемых штаммов, для чего провели электрофорез в полиакриламидном геле и относительно маркера установили размер ампликонов. При выборе оптимальных условий проведения электрофореза изменяли следующие параметры: процентный состав полиакриламидного геля (6 и 8%), количество исследуемого ПЦР продукта, напряженность электрического поля (4-7 В/см) и длительность электрофореза (4-24 ч). При высоком напряжении наблюдали смещение полос ДНК в крайних дорожках геля, что препятствовало точности анализа. В дальнейшем использовали электрофорез в 8% ПААГ при напряженности 5 В/см более 20 ч, при котором регистрировали наиболее четкие полосы на электрофореграммах (рис. 1).

С помощью обработки изображений в программе RFLPscan 3.12 установили размер всех анализируемых ампликонов. Затем подсчитали количество аллельных вариантов и оценили число повторов в исследуемых VNTR-локусах.

Подсчет количества тандемных повторов у анализируемых штаммов *B. mallei* показал высокую вариабельность и стабильность амплификации локусов 993, 3145, 3652, 20, 2862. VNTR-локус 1217 амплифицировался у 57% штаммов *B. mallei*, при этом выявлено четыре аллеля, что свидетельствовало о достаточной полиморфности. Ампликоны VNTR-фрагмента 1367 зарегистрированы у половины штаммов и были представлены только в двух аллельных вариантах. Локус 1764 имел одинаковую длину и был обнаружен у 78% исследуемых штаммов. Наиболее вариабельные и перспективные для типирования штаммов *B. mallei* локусы 993, 3145, 3652, 20, 2862 и 1217 включили в сокращенную MLVA-схему.

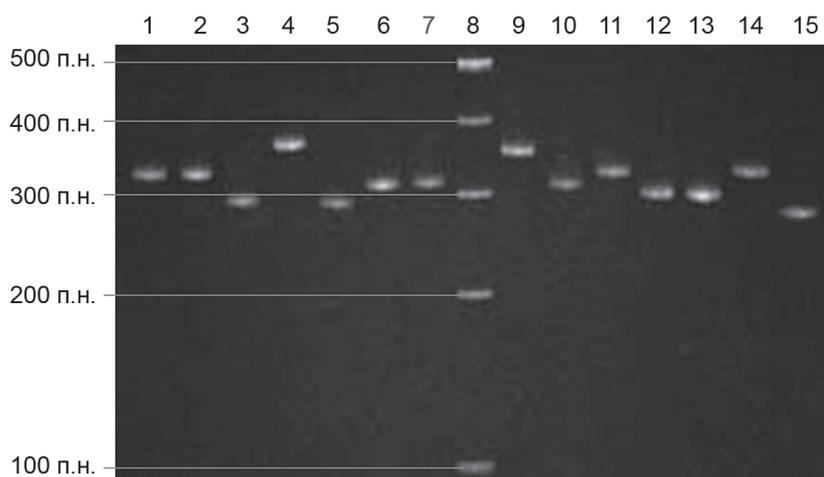


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации VNTR-локуса 2862 коллекционных штаммов возбудителя сапа.

1 — *B. mallei* Ц-4, 2 — *B. mallei* Ц-5, 3 — *B. mallei* 11, 4 — *B. mallei* Muksuwar-11, 5 — *B. mallei* 8, 6 — *B. mallei* В-120, 7 — *B. mallei* Zagreb, 8 — маркер молекулярных размеров 100-1000 п.н., 9 — *B. mallei* Bogor-37, 10 — *B. mallei* P-1, 11 — *B. mallei* 10230, 12 — *B. mallei* Иванович, 13 — *B. mallei* 5584, 14 — *B. mallei* Z-12, 15 — *B. mallei* Будапешт.

Для уточнения количества повторов определили нуклеотидные последовательности продуктов амплификации выбранных VNTR-локусов, соответствующих разным аллельным вариантам. В большинстве случаев количество повторов совпало с определенным на основе электрофореза, однако в локусе 20, который характеризуется самым маленьким размером повтора, зарегистрированы отличия на один повтор у отдельных штаммов. Поэтому учитывая вероятность ошибки и большую трудоемкость при проведении электрофореза в полиакриламидном геле, а также высокую себестоимость секвенирования всех локусов каждого штамма, в дальнейшем для оптимизации метода детекции размера ампликонов использовали фрагментный анализ ампликонов.

Для фрагментного анализа одновременно трех локусов синтезировали праймеры 933f, 20f, меченные флуорофором FAM, праймеры 1217f и 3145f, меченные флуорофором HEX, а флуорофор ROX использования для праймеров 2862f и 3652f. Данный подход обеспечил точное определение размеров всех ампликонов, при этом для каждого штамма параллельно анализировали размер VNTR-локусов 993, 3145 и 3652 в одной смеси и локусов 20, 1217, 2862 в другой смеси.

Далее проверяли различные комбинации праймеров для исследования возможности коампликации трех фрагментов в одной пробирке. При постановке мультиплексной ПЦР отжиг праймеров проводили при 70°C в течение 10 сек, остальные параметры оставили без изменений. В ходе экспериментов была установлена совместимость в одной реакционной смеси VNTR-локусов 993, 3145 и 3652, в другой смеси амплифицировали локусы 20 и 1217. В серии опытов определили необходимое количество праймеров в мультиплексной ПЦР: по 0,2 пмоль прямого и обратного праймеров для амплификации локуса 933, по 0,12 пмоль праймеров для локуса 3145. Вторая смесь содержала по 0,15 пмоль праймеров 20f/20r по 0,1 пмоль праймеров 1217f/1217r. После оптимизации условий ПЦР достигнута эффективная амплификация данных локусов и на электрофореграммах регистрировали только специфичные полосы.

Установлено, что размер ампликонов локуса 2862 практически совпадал с размером продуктов амплификации VNTR-локуса 20 у штаммов *B. mallei* P1, *B. mallei* 11, *B. mallei* Ц-4, *B. mallei* Ц-5. Поскольку перед запуском фрагментного анализа проверку успешности амплификации и концентрацию фрагментов проводили путем электрофореза в 3% агарозном геле, то близкие размеры данных VNTR-фрагментов затрудняли оценку результатов, в связи с этим амплификацию локуса 2862 решено проводить в отдельной пробирке. После окончания ПЦР и проведения электрофореза ампликоны локуса 2862 смешивали с ампликонами локусов 20 и 1217.

Продукты реакции в зависимости от интенсивности свечения на электрофореграмме разводили в 400-500 раз и смешивали с формамидом и внутренним стандартом S450 в соотношении 1:8:1. Для денатурации фрагментов ДНК смеси выдерживали при 95°C в течение 3 мин и при 4°C — 10 мин, затем переносили в плашку и помещали в генетический анализатор для осуществления фрагментного анализа.

Длина фрагментов ДНК, определенная с помощью фрагментного анализа не много отличалась от их реальной длины. Поэтому для расчета длины фрагментов без повторов использовали штамм *B. mallei* B120, количество повторов в локусах которого определено с помощью секвенирования, это позволило корректно определить размеры всех VNTR-фрагментов у всех штаммов возбудителя сапа, а также обеспечило возможность сопоставления полученных нами данных с результатами других исследователей.

После определения длин ампликонов исследуемых локусов рассчитано количество повторов в них у штаммов *B. mallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. На основании полученных результатов для каждого штамма определен индивидуальный MLVA-профиль, содержащий комбинацию количества повторов по исследуемым локусам. Установлено, что типирование возбудителя сапа на основе анализа выбранного набора VNTR-локусов позволяет разделить 14 штаммов *B. mallei* на 13 MLVA-типов.

Далее для оценки эффективности предлагаемой нами схемы в анализ включили 12 полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов возбудителя сапа, представленных в базе данных GenBank NCBI. Помимо четырех геномов *B. mallei*, на основе которых проводили выбор VNTR-локусов, отобрали 8 штаммов возбудителя сапа с различными сведениями об источнике их происхождения. MLVA-профили штаммов определили *in silico*. При сопоставлении результатов типирования всех штаммов *B. mallei* установлено, что разработанная схема генотипирования на основе анализа числа tandemных повторов шести локусов позволяет разделить 26 проанализированных штаммов на 24 MLVA-типа. Индекс Хантера-Гастона (HGDI) сокращенной схемы MLVA-типирования равен 0,99, что свидетельствует о высокой дискриминирующей силе. Также мы оценили вариабельность каждого локуса в отдельности, индекс дискриминации HGDI варьировал от 0,78 у локуса 1217 до 0,89 у локуса 2862. Наибольшее количество аллелей выявлено у локусов 993 и 3652. Сравнительная характеристика 6 VNTR-локусов по результатам генотипирования 26 штаммов возбудителя сапа представлена в табл.

На основании MLVA-профилей исследованных штаммов возбудителя сапа построили дендрограмму методом Neighbor-Joining и провели кластерный анализ (рис. 2).

Штаммы возбудителя сапа из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора распределились по различным ветвям дендрограммы, что согласуется с разнообразием источников их происхождения. Единый MLVA-тип характерен для штаммов *B. mallei* Ц-4 и *B. mallei* Ц-5 из Монголии, также одинаковым профилем обладают штаммы *B. mallei* ATCC 23344 и *B. mallei* FMH, выделенный после заражения сапом сотрудника лаборатории, работавшего со штаммом *B. mallei* ATCC 23344. В отдельный кластер объединены часть штаммов Восточно-Европейского происхождения: *B. mallei* Иванович и *B. mallei* P-1 из Югославии, *B. mallei* 5584 из России, *B. mallei* Будапешт из Венгрии, *B. mallei* 8 и *B. mallei* 11 из Польши. Штаммы из Индии *B. mallei* Muksuwar-11 и Индонезии *B. mallei* Bogor-37 расположены в одной группе со штаммом из Югославии *B. mallei* Zagreb. Штамм *B. mallei* B-120 находится на значительном генетическом расстоянии от остальных штаммов на одной ветви со штаммом из Бахрейна. Последнюю группу формируют штаммы *B. mallei* NCTC 10229 и *B. mallei* 2002734299, выделенные в Венгрии, и штамм *B. mallei* 10230 из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-иссле-

Характеристика VNTR-локусов в геноме *B. mallei*

VNTR-локус	Последовательность повтора	Длина повтора, п.н.	Количество аллелей	Индекс HGDI
993	CGGCGAGGGAAA	12	9	0.88
3145	CCTTCCTCG	9	7	0.81
3652	CCGTAGTC	8	9	0.88
20	CGCCTCA	7	8	0.84
1217	CGGACCTAGG	10	6	0.78
2862	CTCGCCTTTG	10	8	0.89

довательский противочумный институт Роспотребнадзора, информация о котором утеряна, но который, вероятно, имеет тот же регион происхождения.

Штаммы из Югославии представлены в нескольких кластерах, генетически удаленных друг от друга, но аналогичное распределение было получено после типирования данной коллекции штаммов возбудителя сапа методом DFR-анализа [2]. При анализе дендрограммы в целом можно проследить корреляцию между образованными группами и источниками происхождения штаммов, однако, как и в работе U'Ren et al., 2007, наибольшую достоверность наблюдали на уровне формирования конечных кластеров.

Анализ публикаций зарубежных исследователей показал, что за последние годы метод MLVA-типирования был применен для генетической характеристики штаммов возбудителя сапа из коллекций Медицинского научно-исследовательского института инфекционных болезней армии США, института микробиологии Бундесвера, исследования 15 штаммов из Пакистана, эпизоотологического расследования вспышек в Бахрейне, Объединенных Арабских Эмиратах [8, 11]. В работе Scholz H.C. et al., 2014, опубликованы генетические профили 75 штаммов возбудителя сапа, в том числе и штаммов *B. mallei* Zagreb, *B. mallei* Bogor-1, *B. mallei* BogorInnsbruck и *B. mallei* Mukteswar. Данные штаммы аналогично штаммам из нашей коллекции выделены в Югославии, Индонезии и Индии соответственно. Анализ количества повторов в VNTR-локусах 993, 3145, 3652, 20 данных штаммов показал полное совпадение генетических профилей штаммов возбудителя сапа из коллекции института микробиологии Бундесвера и штаммов из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, что свидетельствует о достоверности данных, полученных в ходе работы, и возможности сопоставления результатов типирования, проводимых в различных лабораториях.

Таким образом, разработана схема генотипирования из шести VNTR-локусов, которая позволила провести внутривидовую дифференциацию штаммов возбудителя сапа с высокой дискриминирующей силой, разделив 26 штаммов *B. mallei* на 24 MLVA-типа. Сравнение профилей исследуемых штаммов показало генетическую гетерогенность штаммов возбудителя сапа из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. При обнаружении случаев сапа и выделении культуры возбудителя MLVA-типирование *B. mallei* по шести VNTR-локусам может быть рекомендовано для применения с целью эпидемиологического расследования и установления источника вспышки.

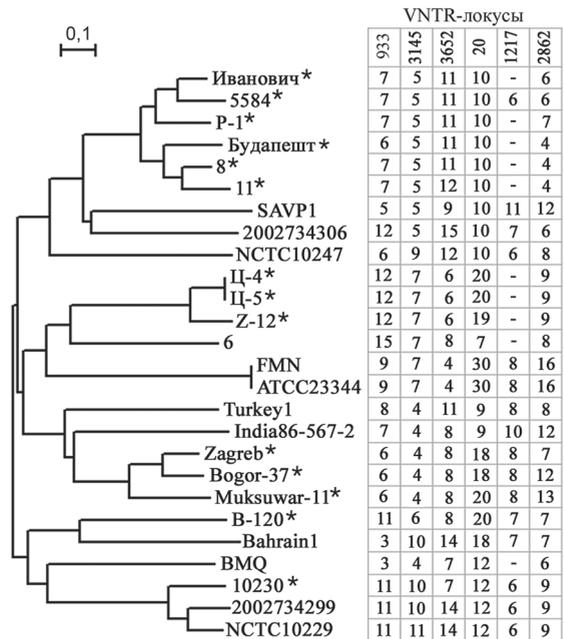


Рис. 2. NJ-Дендрограмма, построенная по результатам MLVA-типирования штаммов возбудителя сапа, и количество полных повторов в VNTR-локусах.

* Штаммы *B. mallei* из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.А., Алтухова В.В., Савченко С.С., Замараев В.С., Илюхин В.И., Алексеев В.В. Использование мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) и амплификации с произвольными праймерами (RAPD) для дифференциации штаммов возбудителя сапа. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2007, 3: 3-9.
2. Бондарева О.С., Савченко С.С., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Лемасова Л.В., Антонов В.А. Генотипирование штаммов *Burkholderia mallei* на основе метода амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2016, 1(34): 33-37.
3. Водопьянов А.С., Мишанькин Б.Н., Павлович Н.В., Пичурина Н.Л. Генотипическая гетерогенность и географическое разнообразие коллекционных штаммов *Francisella tularensis* по данным VNTR-анализа их ДНК. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2007, 2: 33-40.
4. Евсеева В.В., Платонов М.Е., Говорунов И.Г., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Дентовская С.В., Куличенко А.Н., Анисимов А.П. Сравнительный анализ MLVA25- и MLVA7-типирования по способности определять очаговую принадлежность штаммов *Yersinia pestis* на примере изолятов из центральнокавказского высокогорного очага чумы. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2016, 1(34): 37-40.
5. Никифоров В.В., Мельникова Л.И., Зарьков К.А., Кузовлев О.П., Лактионова Л.В., Зиновьев Г.А., Жданов А.С. Сап: случай из практики. Инфекционные болезни. 2005, 3(1): 89-92.
6. А. В. Топорков и др. Мелиоидоз и сап: коллективная монография (под ред. А.В. Топоркова). Волгогр. науч.-исслед. противочум. ин-т. Волгоград, «Волга-Пресс», 2016.
7. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin Microbiol. 1988, 26(11): 2465-2466.
8. Hornstra H., Pearson T., Georgia S. et al. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. Emerg. Infect. Dis. 2009, 15(12): 2036-2039.
9. Kettle A.N., Wernery U. Glanders and the risk for its introduction through the international movement of horses. Equine Vet. J. 2016, 48(5): 654-658.
10. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M. et al. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. J. Clin. Microbiol. 2001, 39(9): 3179-3185.
11. Wernery U., Wernery R., Joseph M. et al. Natural *Burkholderia mallei* infection in Dromedary, Bahrain. Emerg. Infect. Dis. 2011, 17(7): 1277-1279.

Поступила 29.05.19

Контактная информация: Бондарева Ольга Сергеевна,
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)39-33-48

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

С.Б.Чекнёв, Е.И.Вострова, М.А.Сарычева, А.В.Востров

ИНГИБИРОВАНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ STREPTOCOCCUS PYOGENES В МЕХАНИЗМАХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ КАТИОНОВ ЦИНКА

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

Цель. Оценка гемолитической активности в культуре *S.pyogenes*, претерпевающей торможение роста вследствие воздействия миллимолярных концентраций катионов цинка. *Материалы и методы.* Суспензию бактерий *S.pyogenes*, содержащую 10^8 КОЕ/мл, заседали газоном на чашки Петри с кровавым питательным агаром. Спустя 30 мин на поверхность газона с помощью 36-канального штампа-репликатора каплями объемом по 5 мкл наносили водные растворы солей

цинка и меди с концентрацией по катионам металлов от 5×10^{-3} М до 5×10^{-1} М. Затем чашки с культурой бактерий инкубировали в течение суток при 37°C , после чего определяли диаметр зоны задержки роста и зоны ингибирования гемолиза. Для оценки наличия (отсутствия) в зонах задержки роста жизнеспособных бактерий, а также глубины повреждения клеток на периферии зоны задержки роста опыты сопровождали необходимыми контрольными высевами материала с последующим термостатированием. *Результаты.* В диапазоне концентраций катионов цинка от 50 до 500 мМ на газоне культуры *S.pyogenes* образуется зона задержки роста бактерий, концентрически окруженная зоной ингибирования гемолиза, в пределах которой торможение роста бактерий визуально не регистрируется. Катионы меди не формируют зону ингибирования гемолиза, выходящую за границу зоны задержки роста бактерий. *Заключение.* Ингибирующее действие катионов цинка на гемолитическую активность в культуре *S.pyogenes* реализуется специфически, оказывается обратимым и трактуется в контексте проявления антивирулентных свойств катионов металла.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 16—23

Ключевые слова: *S.pyogenes*, гемолитическая активность, катионы цинка

S.B.Cheknev, E.I.Vostrova, M.A.Sarycheva, A.V.Vostrov

INHIBITION OF HEMOLYTIC ACTIVITY OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* IN MECHANISMS OF ANTIBACTERIAL ACTION OF ZINC IONS

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

Aim. The work was performed with the purpose to study a hemolytic activity in the culture of *S.pyogenes* under the inhibitory action of millimolar concentrations of zinc ions. *Materials and methods.* Suspensions of *S.pyogenes* bacteria which contained 10^8 CFU/ml were sown by the lawns into the standard Petri dishes coated with the supplemented Blood Nutrient Agar. 30 min later the salt solutions of zinc or copper which contained the metals at the concentrations ranged between 5×10^{-3} M to 5×10^{-1} M were added by the 5 μ l drops on the surfaces of the lawns with use of 36-channel stamp replicator. Then the dishes with bacterial cultures were incubated for 24 hrs at 37°C followed by measuring diameter of the area of culture growth inhibition and of the area of inhibition of hemolysis. The study was performed with use of controls towards measuring the state of bacterial cells obtained from different zones of the areas. *Results.* In presence of the zinc ions concentrations ranged between 50 to 500 mM the area of the growth inhibition of *S.pyogenes* was surrounded on the lawn of the bacterial culture by the area of the inhibition of hemolysis where the growth inhibition of *S.pyogenes* was not registered. Copper ions did not form such an area of the hemolysis inhibition. *Conclusion.* Inhibitory action of zinc ions on the hemolytic *S.pyogenes* activity in the culture seems to be specific and reversible, and is discussed in a context of the antivirulent zinc ions properties.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 16—23

Key words: *S.pyogenes*, hemolytic activity, zinc ions

ВВЕДЕНИЕ

Специфичность вовлечения катионов цинка в реализацию механизмов антибактериального действия обеспечивается совокупностью свойств катионов, проявляющихся многофакторно — с позиций получаемого результата, и многоточечно — с позиций определения мишени локализации и топика реакции [1, 2].

Известно, что цинк патоген-специфически снижает экспрессию шига-токсинов и других факторов вирулентности энтеропатогенных эшерихий [7, 8], специфически ингибирует гемолитическую активность спирохет [9], угнетает активность протеаз боррелий [17] и стрептококков [11], ферменты гликолиза, биосинтез кап-

сульной гиалуроновой кислоты [14], в культурах стафилококков и синегнойной палочки реализует бактериостатическое действие, в опытах на патогенных и условно патогенных стрептококках удается описать патоген-специфическое бактерицидное действие катионов цинка [1, 2].

Специфичность действия цинка в отношении *Streptococcus pneumoniae* обеспечивается его избирательным импортом, реализуемым бактериями за счет работы специфических транспортеров [5]. Ингибирование гемолиза, переключение метаболизма на утилизацию галактозы и торможение роста *S.pyogenes* вызываются цинком, примененным в концентрациях, значительно меньших, чем при действии других катионов металлов [14].

Целью работы явилась оценка гемолитической активности в культуре *S.pyogenes*, претерпевающей торможение роста вследствие воздействия миллимолярных концентраций катионов цинка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры бактерий *S.pyogenes* предоставлены из рабочей коллекции лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов заведующим лабораторией, кандидатом медицинских наук В.Г.Жуховицким. В работе использовали три клинических изолята *S.pyogenes*.

Для постановки реакций стандартизованную суспензию бактерий, полученную из суточных культур *S.pyogenes* и содержащую 10^8 КОЕ/мл, засеивали газонем из объема 1.0 мл суспензии в физиологическом растворе на стандартные стерильные чашки Петри диаметром 90 мм с питательным агаром Blood Base Agar (HiMedia Lab.), дополненным 10% дефибринированной бараньей крови (ЭКОлаб) и 1% глюкозы. Спустя 30 мин на поверхность газона с использованием 36-канального штампа-репликатора с диаметром наконечников 2.0 мм каплями объемом по 5 мкл наносили водные растворы сульфата цинка $ZnSO_4 \times 7H_2O$, сульфата меди $CuSO_4 \times 5H_2O$, хлорида цинка $ZnCl_2$ и хлорида меди $CuCl_2 \times 2H_2O$ в 0.15 М NaCl (pH 7.11-7.31) с концентрацией по катионам металлов от 5×10^{-3} М до 5×10^{-1} М.

На препаративном этапе исследования маточные растворы солей стерилизовали методом мембранной фильтрации с использованием насадок для водно-солевых растворов Millex с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore), после чего готовили серии последовательных разведений маточного образца в 0.15 М растворе NaCl, служившим внутренним контролем системы.

После нанесения солевых растворов каплями на газон содержавшие культуры бактерий *S.pyogenes* чашки Петри инкубировали в течение суток при 37°C. По истечении срока инкубации результат реакции учитывали, определяя диаметр зоны задержки роста культуры и зоны ингибирования гемолиза с использованием угловой линейки Partigen (Behringwerke AG).

На каждом газоне реакцию бактерий на серию разведений соли металла воспроизводили трижды. Для каждого клинического изолята бактерий использовали при этом не менее двух параллельных чашек Петри.

Для контрольной проверки наличия (отсутствия) в зонах задержки роста культур жизнеспособных бактерий из центра зоны задержки роста микробиологической петлей диаметром 1.0 мм производили посевы материала в пробирки, содержавшие по 5.0 мл питательного бульона Nutrient Broth (HiMedia Lab.), дополненного 10% нормальной лошадиной сыворотки (Микроген) и 1% глюкозы. Образцы термостатировали в течение срока до пяти суток при 37°C, после чего оценивали прозрачность питательного бульона в сравнении с контрольным — стерильным.

Для оценки глубины повреждения клеток на периферии зоны задержки роста, содержащей единичные сохранившиеся колонии *S. pyogenes*, микробиологической петлей диаметром 1.0 мм производили высевы этих отдельных колоний на кровяной агар указанного выше состава с использованием техники истощающего штриха и термостатировали образцы культур в течение суток при 37°C. По истечении срока инкубации оценивали размер, морфологию образовавшихся колоний, наличие и выраженность зоны гемолиза.

В ходе экспериментов кислотность 0.15 М раствора NaCl контролировали с помощью базового электронного рН-метра Sartorius PB-11, укомплектованного электродом Sartorius PY-P11.

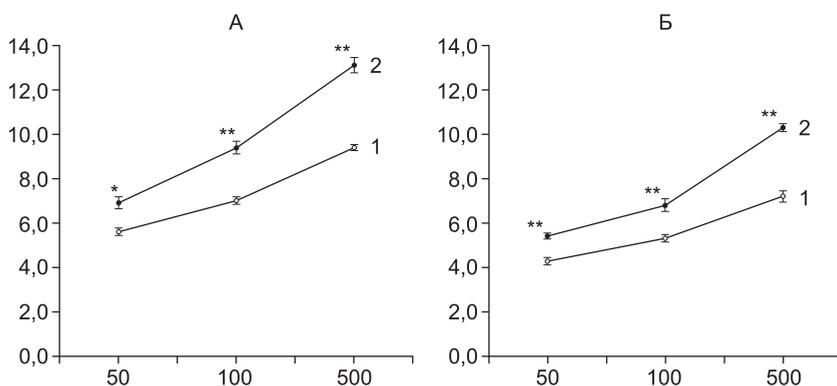
При математической обработке результатов исследования достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показывают результаты, представленные на рисунке, в культуре клеток *S. pyogenes* катионы цинка, примененные в виде сульфата (рис.А) или хлорида (рис.Б) в миллимолярных концентрациях, реализуют выраженное антибактериальное действие, интенсивность которого при 10-кратном (с 50 до 500 мМ) повышении содержания катионов металла в среде культивирования нарастает в среднем в 1.7 раза, диаметр зоны задержки роста бактерий увеличивается на 2.9-3.8 мм ($p < 0.001$).

Одновременно за пределами внешней границы зоны задержки роста катионы цинка ингибируют гемолитическую активность *S. pyogenes*. 10-кратное (с 50 до 500 мМ) повышение содержания катионов металла в среде культивирования увеличивает диаметр зоны ингибирования гемолиза в среднем в 1.9 раза, или на 4.9-6.2 мм ($p < 0.001$).

Представленные на рисунке данные очевидно демонстрируют, что диаметр зоны ингибирования гемолиза, образуемой в присутствии сульфата или хлорида цинка, в 1.2-1.4 раза, или на 1.1-3.7 мм ($p < 0.001-0.01$) превышает таковой зоны задержки роста бактерий. Следовательно, в присутствии в культуральной среде катионов цинка формирующаяся зона задержки роста *S. pyogenes* concentрически окружена зоной



Торможение роста культуры (1) и ингибирование гемолитической активности (2) *S. pyogenes* в присутствии миллимолярных концентраций катионов цинка ($M \pm m$, $n=18$).

По оси абсцисс: концентрация катионов цинка, мМ; по оси ординат: диаметр зоны регистрируемого эффекта, мм. А — водный сульфат цинка, Б — хлорид цинка. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ по сравнению с диаметром зоны задержки роста.

ингибирования гемолиза, в пределах которой торможение роста бактерий визуально не регистрируется.

При оценке глубины повреждения клеток на периферии зоны задержки роста установлено, что в условиях пересева на кровяной агар и последующего термостабирирования в течение суток сохранившиеся мелкие (точечные) колонии *S. pyogenes* в динамике наблюдения формируют колонии стандартного вида, морфологически сходные с интактными, имеющие диаметр 0.5-1.0 мм и окруженные четко просматриваемой зоной гемолиза.

Примененные в виде сульфата или хлорида в миллимолярных концентрациях катионы меди, реализующие, как и катионы цинка, выраженное антибактериальное действие в культуре клеток *S. pyogenes*, не формируют зону ингибирования гемолиза, выходящую за границу зоны задержки роста бактерий.

Аналогично, в независимых исследованиях такая зона не образовывалась в культуре клеток *S. pyogenes* в присутствии сульфатов двухвалентных железа, марганца и никеля, примененных в миллимолярных концентрациях металлов. Катионы кобальта, использованные в виде сульфата, формировали зону ингибирования гемолиза, выходящую за границу зоны задержки роста бактерий. Однако, достоверный результат зарегистрирован только при максимальной из примененных концентрации металла (500 мМ), а разница диаметров образующихся зон составляла по кратности 1.2 раза, или 1.2 мм ($p < 0.001$), что оказывалось более чем в 3 раза меньше определенного в настоящем исследовании действия соответствующей концентрации катионов цинка.

Известно, что экспрессия гемолизинов во многом определяет возможность персистенции патогенных бактерий в организме хозяина, детерминирует выраженность проявления болезнетворных свойств микробов в ходе развития инфекционного процесса и различается у отдельных видов стрептококков, коррелируя с их инфекционным потенциалом [10, 15, 20]. Входящие в состав нормальной микрофлоры кишечника человека бактерии *Streptococcus agalactiae* обладают существенно меньшей гемолитической активностью по сравнению с исследованными в данной работе патогенными *S. pyogenes* [10, 15, 20].

Способность катионов цинка ингибировать гемолитическую активность прямым воздействием на патогенные бактерии описана в культурах спирохет [9], синегнойной палочки [12], пиогенного стрептококка [14]. Воздействуя на клетки *Serpulina hyodysenteriae*, катионы цинка вызывают снижение процессов биосинтеза белка, группирование рибосом и осветление цитоплазмы, определяются в связанном клетками состоянии и полностью ингибируют гемолиз [9]. В культурах *Pseudomonas aeruginosa* катионы цинка, повышая гидрофильность наружной мембраны клеточной стенки бактерий, ингибируют гемолитическую активность и образование биопленок, не оказывая влияния на рост планктонных клеточных форм [12]. Ингибирование гемолиза *S. pyogenes* реализуется катионами цинка, примененными в концентрациях, значительно меньших, чем при действии других исследованных катионов металлов [14].

Наряду с прямым воздействием цинка на патогенные бактерии реализация антигемолитических эффектов катионов металла может достигаться за счет изменения ими физико-химических и структурно-функциональных свойств мембраны эритроцитов [3, 4, 13, 19]. Обратимо связываясь с поверхностью эритроцита и изменяя состояние липидного бислоя мембраны, катионы цинка могут динамически блокировать специфические сайты связывания лизинов, изменять конформацию эпитопов и характеристики взаимодействия лизинов с фосфолипидами поверхности клетки,

вплоть до полного исключения возможности связывания литических агентов с мембраной эритроцита [3, 4, 19].

Этот механизм реализуется в условиях ингибирования катионами цинка гемолиза эритроцитов кролика, вызываемого стафилококковыми альфа и бета токсинами, а также стрептолизинами O и S [4], он задействован в блокировании цинком гемолиза эритроцитов кролика, индуцированного присутствием бактериального аэролизина [3], а также препятствует реализации гемолиза эритроцитов человека в присутствии стрептолизина O [19]. Гемолиз эритроцитов кролика, вызываемый цитотоксином *Vibrio metschnikovii*, ингибируется катионами цинка за счет разрушения тетрамеров цитотоксина или предотвращения их образования на мембране эритроцита [13].

Недавними исследованиями описан не известный ранее механизм гемолитического воздействия лейкоцидинов LukED и HIgAB *Staphylococcus aureus* на эритроциты человека, способствующий обретению клетками бактерий достаточных количеств железа для поддержания режима персистенции в организме хозяина [16, 18]. Указанные лейкоцидины распознают и связывают на эритроцитах человека хемокиновый рецептор DARC, служащий для закоривания токсических агентов в клеточной мембране с последующей реализацией цитолиза [16, 18]. Понятно, что в таком случае топика реакции формирует возможность мишень-направленного блокирования DARC рецептора или его структурных аналогов, как и самого взаимодействия гемолизинов с рецепторами, экспрессированными на эритроцитах, в логистике отмены гемолитического воздействия патогенных бактерий [16, 18].

Могут ли катионы цинка в процессе ингибирования гемолиза реализовать свое протективное действие за счет блокирования DARC рецептора и его аналогов, закоривающих в мембране эритроцита стафилолейкоцидины или гемолитические стрептолизины — вопрос, ответ на который можно давать лишь вероятно. По всей видимости, могут, так, как уже отмечали, эффекты стафилотоксинов, стрептолизинов, аэролизина и вибриоцитотоксина в отношении эритроцитов человека и кролика отменяются катионами цинка, в том числе за счет динамического блокирования специфических сайтов связывания лизинов [3, 4, 13, 19].

Сказанное означает, что в древнейшей системе утилизации бактериями железа гема, необходимого для обеспечения их персистенции в организме хозяина, а в более широком плане — обеспечения их жизнедеятельности, в целом, появляется естественный, природный фактор ограничения. Это катионы цинка, постоянно циркулирующие даже в не связанной белками и аминокислотами (ионной) форме в нормальной плазме крови, активно высвобождаемые из внутриклеточных депо в условиях любого тканевого повреждения или воспаления и препятствующие развитию массивного гемолиза в динамике инфекционного процесса, вызываемого или осложняемого бактериями, экспрессирующими в качестве одного из факторов патогенности гемолитически активные соединения.

Тем самым в организме хозяина реализуется механизм ограничения гемолиза, способный предотвращать тяжелые проявления гемолитико-уремического синдрома, как это происходит в условиях ингибирования цинком экспрессии шига-токсинов у патогенных *Escherichia coli* [8], поддерживать менее измененными тканевой обмен и метаболические процессы, замкнутые на физиологическую гемодинамику [8]. Одновременно, этот механизм оказывается протективным и для бактерий — с позиций поддержания определенных режимов их персистенции, поскольку, как установлено в опытах на *Bacillus subtilis*, связывание цинка с регуляторным белком PerR приводит к депрессии hemA оперона биосинтеза гема и угнетению экспрес-

сии гена *katA*, кодирующего синтез содержащей гем каталазы [6]. В результате клетка накапливает токсические количества гема, идет отравление клетки гемом [6]. Не случайно, в отличие от других химически близких металлов, содержание цинка в клетках разных видов бактерий поддерживается на одном и том же уровне, в достаточно узком диапазоне варибельности [6].

В нашей работе обнаружено, что зона задержки роста *S.pyogenes* в присутствии миллимолярных концентраций катионов цинка концентрически окружена на газоне зоной ингибирования гемолиза, в пределах которой торможение роста бактерий визуально не регистрируется. Рассматривая диффузию катионов цинка в агаре как процесс снижения концентрации металла от центра зоны реакции на ее периферию и далее, можно заключить, что в условиях нарастания концентрации цинка в культуральной среде (с периферии зоны реакции к ее центру) системы продукции гемолизинов *S.pyogenes* реагируют на присутствие катионов раньше и, следовательно, оказываются более чувствительными к токсическому действию металла, чем системы собственно роста и жизнеобеспечения. Аналогично, специфическое действие цинка на энтеропатогенные эшерихии реализуется в концентрациях металла, не ингибирующих рост бактерий [7].

Полученные нами данные позволяют трактовать ингибирование цинком экспрессии гемолизинов *S.pyogenes* в контексте специфического воздействия катионов, поскольку понятно, что неспецифические, общетоксические эффекты, реализация которых проявлялась бы ослаблением гемолиза вследствие торможения роста бактерий или их форсированной гибели в результате отравления токсическими концентрациями катионов, не позволяли бы обнаружить зону ингибирования гемолиза, в которой задержка роста *S.pyogenes* визуально не регистрируется.

Как и в работах по ингибированию цинком гемолиза эритроцитов, индуцированного воздействием аэролизина [3], вибриоцитоллизина [13] и стрептолизина О [19], описанные в нашем исследовании эффекты катионов металла реализуются обратимо. На периферии зоны задержки роста *S.pyogenes* формируются мелкие (точечные) колонии персистеров, которые при высеве на кровяной агар и термостатировании в благоприятных условиях образуют колонии стандартного вида с полностью восстановленной гемолитической активностью клеток.

Результаты работы обнаруживают реализацию в отношении *S.pyogenes* антивирулентных свойств катионов цинка, что согласуется с данными, полученными на биопленках *P.aeruginosa* [12]. Обретающая сегодня все большую практическую значимость концепция антивирулентности биологически активных соединений, как раз, полагает возможность нахождения и использования в контексте стратегии борьбы с патогенами механизмов, реализация которых позволяла бы избирательно выключать определенные сигнальные пути бактериальной клетки вне общего токсического воздействия на процессы жизнеобеспечения бактерий [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Кисиль С.В., Анисимов В.В., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus agalactiae* в присутствии катионов меди и цинка. Журн. микробиол. 2017, 3:26-35.
2. Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Кисиль С.В., Сарычева М.А., Востров А.В. Механизмы бактерицидного действия в реализации общих антибактериальных эффектов катионов металлов в культуре *Streptococcus pyogenes*. Журн. микробиол. 2018, 2:3-9.
3. Avigad L.S., Bernheimer A.W. Inhibition by zinc of hemolysis induced by bacterial and other cytolytic agents. Infect. Immunity. 1976, 13(5):1378-1381.

4. Avigad L.S., Bernheimer A.W. Inhibition of hemolysis by zinc and its reversal by L-histidine. *Infect. Immunity*. 1978, 19(3):1101-1103.
5. Bayle L., Chimalapati S., Schoehn G. et al. Zinc uptake by *Streptococcus pneumoniae* depends on both AdcA and AdcAII and is essential for normal bacterial morphology and virulence. *Molec. Microbiol.* 2011, 82(4):904-916.
6. Chandrangu P., Rensing C., Helmann J.D. Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nature Reviews Microbiol.* 2017, 15:338-350.
7. Crane J.K., Naeher T.M., Shulgina I. et al. Effect of zinc on enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immunity*. 2007, 75(12):5974-5984.
8. Crane J.K., Byrd I.W., Boedeker E.C. Virulence inhibition by zinc of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immunity*. 2011, 79(4):1696-1705.
9. Dupont D.P., Duhamel G.E., Carlson M.P., Mathiesen M.R. Effect of divalent cations on hemolysin synthesis by *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae*: inhibition induced by zinc and copper. *Vet. Microbiol.* 1994, 41:63-73.
10. Joseph E.A. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin). *Pharmac. Ther.* 1980, 11:661-717.
11. Krishnan K.C., Mukundan S., Figueroa J.A.L. et al. Metal-mediated modulation of streptococcal cysteine protease activity and its biological implications. *Infect. Immunity*. 2014, 82(7):2992-3001.
12. Lee J.-H., Kim Y.-G. et al. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiol. Research*. 2014, 169:888-896.
13. Miyake M., Honda T., Miwatani T. Effects of divalent cations and saccharides on *Vibrio metschnikovii* cytolysin-induced hemolysis of rabbit erythrocytes. *Infect. Immunity*. 1989, 57(1):158-163.
14. Ong C.-I.Y., Walker M.J., McEwan A.G. Zinc disrupts central carbon metabolism and capsule biosynthesis in *Streptococcus pyogenes*. *Scientific Reports*. 2015, 5:10.
15. Rajagopal L. Understanding the regulation of group B streptococcal virulence factors. *Future Microbiol.* 2009, 4(2):201-221.
16. Ratner A.J. *S.aureus* toxins join the DARC side. *Cell Host and Microbe*. 2015, 18:272-274.
17. Russell T.M., Tang X., Goldstein J.M. et al. The salt-sensitive structure and zinc inhibition of *Borrelia burgdorferi* protease BbHtrA. *Molecular Microbiol.* 2016, 99(3):586-596.
18. Spaan A.N., Reyes-Robles T., Badiou C. et al. *Staphylococcus aureus* targets the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) to lyse erythrocytes. *Cell Host and Microbe*. 2015, 18:363-370.
19. Takeda Y., Ogiso Y., Miwatani T. Effect of zinc ion on the hemolytic activity of thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*, streptolysin O, and triton X-100. *Infect. Immunity*. 1977, 17(2):239-243.
20. Whidbey C., Vornhagen J. A streptococcal lipid toxin induces membrane permeabilization and pyroptosis leading to fetal injury. *EMBO Mol. Med.* 2015, 7:488-505.

Поступила 07.03.19

Контактная информация: Чекнёв Сергей Борисович, д.м.н.,
123098, Москва, ул.Гамалеи, 18, р.т. (499)190-43-88

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СЕЗОННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОДГОТОВКИ ШТАММОВ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

Цель. Оценка эффективности метода подготовки реассортантных штаммов для живой гриппозной вакцины и пути его оптимизации, учитывающие различия актуальных эпидемических вирусов гриппа по ключевым для процесса селекции биологическим характеристикам. *Материалы и методы.* Вирусы гриппа — кандидаты в сезонные ЖГВ, доноры аттенуации для отечественной реассортантной ЖГВ А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69. Получение штаммов ЖГВ в развивающихся куриных эмбрионах включало реассортацию, селективные пассажи при пониженной температуре и в присутствии гипериммунной сыворотки к донору аттенуации, несколько этапов клонирования реассортантов, их вирусологическую и молекулярно-генетическую характеристику. Эпидемические вирусы гриппа и штаммы живых гриппозных вакцин оценивали по способности к репродукции при температуре за пределами оптимальных значений, по чувствительности к ингибиторам сыворотки крови. *Результаты.* Проведена оценка природных свойств используемых в скрещивании эпидемических вирусов. Представлены данные об эффективности получения реассортантных штаммов ЖГВ в зависимости от биологических свойств эпидемических вирусов гриппа: их температуроустойчивого, холодоустойчивого фенотипа, ингибитороустойчивости и рецепторной специфичности. *Заключение.* На основе оценки влияния биологических особенностей эпидемических вирусов на успех реассортации подобраны наиболее рациональные методические приемы для максимально эффективного получения штаммов живых гриппозных аттенуированных вакцин.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 24—34

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина (ЖГВ), доноры аттенуации для ЖГВ, температурочувствительный фенотип, холодоустойчивый фенотип, аттенуация, чувствительность/устойчивость к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови лошади

N.V.Larionova, I.V.Kiseleva, E.A.Bazhenova, E.P.Grigorieva, L.G.Rudenko

THE INFLUENCE OF SEASONAL INFLUENZA VIRUSES BIOLOGICAL FEATURES ON THE EFFECTIVENESS OF DEVELOPMENT STRAINS FOR LIVE INFLUENZA VACCINE

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Aim. Evaluation of the efficiency of the method of reassortant strains for live influenza vaccine development and ways to optimize it, taking into account the differences in the current epidemic influenza viruses by key biological characteristics. *Materials and methods.* Influenza viruses — candidates for seasonal LAIVs, MDVs for Russian LAIVs A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and B/USSR/60/69. The vaccine strains development in developing chicken embryos included reassortment, selective passages at low temperature in the presence of hyperimmune serum to the MDV, several stages of reassortants cloning, their virological and molecular genetic characteristics. Epidemic influenza viruses and LAIVs strains were evaluated by their ability to reproduction at temperatures beyond optimal values, by sensitivity to serum inhibitors. *Results.* The assessment of phenotypic properties used in reassortment epidemic viruses is carried out. Presented the data on the efficiency of development reassortant strains for LAIV depending on the biological properties of circulating epidemic influenza viruses: their temperature-resistant, cold-sensitive phenotype, inhibitor resistance, and receptor specificity. *Conclusion.* Based on the assessment of the influence of the biologi-

cal characteristics of the epidemic viruses, the rational methodological techniques for the most effective development of reassortants for LAIV are selected.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 24–34

Key words: live attenuated influenza vaccine (LAIV), master donor viruses (MDV) for LAIV, temperature-sensitive phenotype, cold-adapted phenotype, attenuation, sensitivity/resistance to non-specific horse blood serum inhibitors

ВВЕДЕНИЕ

Вакцинация является эффективным средством профилактики заболеваемости гриппом. Однако успех вакцинации осложнен непрерывной изменчивостью антигенных свойств вирусов гриппа, что приводит к необходимости регулярного обновления состава вакцинного В препарата.

Живые гриппозные аттенуированные вакцины (ЖГВ) стабильно демонстрируют безвредность, иммуногенность, высокие защитные свойства для всех возрастных групп населения и способность к формированию коллективного иммунитета [6, 7]. Эти несомненные достоинства, наряду с перекрестной защитой против дрейфовых вариантов вируса гриппа, долговременностью иммунного ответа, неинвазивным способом введения [1, 6, 7], позволили Всемирной организации здравоохранения рекомендовать ЖГВ в качестве эффективного препарата для контроля заболеваемости гриппом.

Мировой приоритет в разработке реассортантных ЖГВ принадлежит коллективу отдела вирусологии Института экспериментальной медицины, где проводится регулярная подготовка реассортантных вакцинных штаммов для ЖГВ на основе отечественных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69.

Штаммы ЖГВ являются продуктом реассортации актуальных эпидемических вирусов гриппа с генетически стабильными температурочувствительными (ts), холодоустойчивыми (ca) и аттенуированными (att) для человека донорами аттенуации [1].

Антигенная актуальность вакцинного реассортанта обеспечивается наследованием от эпидемического вируса двух генов, кодирующих белки оболочки — HA и NA, а безвредность гарантируется наследованием от донора аттенуации 6 генов, кодирующих внутренние белки (вакцинная формула генома 6:2). Аттенуация обусловлена ограничением распространения температурочувствительного вакцинного вируса за входные ворота инфекции из-за более высокой температуры в нижних отделах респираторного тракта [1, 7].

В метод получения вакцинных реассортантов заложены различия биологических свойств созданных в лаборатории ts/ca/att доноров аттенуации и естественно циркулирующих эпидемических вирусов гриппа. Ко времени разработки метода, в 1970-х годах, циркулирующие вирусы гриппа характеризовались способностью к репродукции при превышающей физиологический оптимум температуре и отсутствием репродукции при пониженной температуре инкубации (non-ts/non-ca фенотип). Эти характеристики считались неотъемлемым признаком патогенных штаммов [14].

На основе принятых за аксиому различий в характеристиках доноров и эпидемических вирусов были подобраны селективные факторы, которые обеспечивают направленный отбор реассортантов с заданными характеристиками. Такими се-

лективными факторами являются пониженная до 25-26°C температура инкубации и культивирование в присутствии гипериммунной сыворотки против донора аттенуации. Температура 25-26°C создает условия приоритетного отбора реассортантов с генами, кодирующими внутренние белки холодоустойчивого донора, а гипериммунная сыворотка против донора способствует отбору реассортантов, наследующих антигены HA и NA от эпидемического родителя [1]. За этапом скрещивания в развивающихся куриных эмбрионах следуют селективные пассажи и несколько этапов клонирования реассортантов.

Успех получения вакцинных препаратов напрямую зависит от свойств вступающих в реассортацию вирусов. Донор аттенуации характеризуется стабильностью генетических признаков [2], тогда как, вопреки существовавшим ранее представлениям, биологические свойства эпидемических вирусов могут существенно различаться. Нередко выделяются штаммы с нехарактерными для высоковирулентных вирусов признаками — ts или/и sa фенотипом [3, 5, 9, 13]. Это касается не только ряда случайных изолятов, но и эталонных вирусов, рекомендуемых ВОЗ для разработки актуальных вакцинных штаммов.

Помимо non-ts/non-sa фенотипа, для успеха получения реассортантных штаммов ЖГВ благоприятным фактором является соответствие рецепторной специфичности эпидемического вируса рецепторам клеток хозяина, в котором проводится скрещивание.

Для получения вакцинных штаммов вируса гриппа законодательно разрешено использовать актуальные эпидемические вирусы, выделяемые и культивируемые исключительно в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Маркером рецепторной специфичности вирусов может служить показатель чувствительности (is) либо устойчивости (ir) вирусного гемагглютинина к неспецифическим ингибиторам, присутствующим в неиммунной сыворотке крови лошади. Гемагглютинином вирусов гриппа человека в качестве рецепторов на чувствительной клетке распознаются гликаны с сиалил α -2,6 галактозной специфичностью. Вирусы гриппа птиц для рецепторного взаимодействия используют гликаны с сиалил α -2,3 галактозной специфичностью [12]. Сыворотка крови лошади содержит большое количество α_2 -макроглобулинов с углеводными компонентами, включающими сиалил α -2,6 галактозные остатки, которые имитируют клеточные рецепторы для вирусов гриппа человека и за счет этого способны ингибировать вирус. Поэтому фактор чувствительности либо устойчивости к термостабильным ингибиторам сыворотки крови лошади служит маркером α -2,6 либо α -2,3 рецепторной специфичности вирусов.

При подготовке реассортантов ЖГВ ингибитороустойчивость дает эпидемическому компоненту скрещивания равные с ir донором аттенуации репродуктивные возможности в клетках РКЭ. Ингибиторочувствительность эпидемического родителя ставит его в менее благоприятные условия для репродукции в сравнении с донором аттенуации. Кроме того, чувствительность к сывороточным ингибиторам может приводить к неспецифическому связыванию гемагглютининов эпидемического вируса с применяемой в методике сывороткой против донора аттенуации, что затрудняет селекцию вариантов с вакцинной формулой генома.

Отклонения фенотипических свойств эпидемического родителя от принятых за стандарт в методике получения штаммов для ЖГВ становятся дестабилизирующим фактором при проведении селективных пассажей. Чтобы преодолеть возникающие сложности, необходимо вносить определенные коррективы в процесс подготовки реассортантных штаммов для ЖГВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рекомендованные ВОЗ актуальные эпидемические вирусы гриппа получены из CDC (США), NIBSC (Великобритания), ВОЗ (Швейцария). Доноры аттенуации для отечественной ЖГВ А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 получены из музея отдела вирусологии ИЭМ.

Для накопления вирусы инкубировали в 10-11-дневных РКЭ при 32-33°C. В зависимости от задач исследования инфицированные эмбрионы инкубировали также при пониженной температуре 25°C (6 суток) и повышенной температуре 37, 38, 39 и 40°C (2 суток — вирусы гриппа А, 3 суток — вирусы гриппа В).

Температурочувствительность вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров (признак RCT) при оптимальной (32-33°C) и повышенной до 37, 38, 39 или 40°C температуре инкубации. Вирусы считали температурочувствительными при RCT не менее 4,5 lg ЭИД₅₀/мл, температуроустойчивыми — при RCT не более 3,5 lg ЭИД₅₀/мл. Вирусы оценивали как $\pm ts$ при RCT в пределах 3,5—4,5 lg ЭИД₅₀/мл.

Холодоустойчивость вирусов гриппа оценивали в РКЭ по разности инфекционных титров при оптимальной (32-33°C) и пониженной до 25°C температуре инкубации. Вирусы считали холодоустойчивыми при RCT₂₅ не менее 4,5 lg ЭИД₅₀/мл, холодоустойчивыми — при RCT₂₅ не более 3,5 lg ЭИД₅₀/мл. Вирусы оценивали как $\pm ca$ при RCT₂₅ в пределах 3,5—4,5 lg ЭИД₅₀/мл.

Получение реассортантных штаммов ЖГВ проводили в РКЭ на основе ежегодных рекомендаций ВОЗ по стандартной методике [1].

Реакцию торможения геагглютинации, в соответствии с [18], проводили для определения антигенной принадлежности НА штаммов вируса гриппа со специфическими иммунными крысиными сыворотками, используя 1% взвесь эритроцитов кур или человека.

Чувствительность вирусов гриппа к неспецифическим термостабильным ингибиторам неиммунной сыворотки крови оценивали в РТГА, используя в качестве источника ингибиторов прогретую 10 мин при 80°C неиммунную сыворотку крови лошади (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург). Вирусы считали устойчивым к термостабильным ингибиторам сыворотки крови, если обратная величина титра сыворотки, нейтрализующей вирус в РТГА, не превышала 40 единиц. При титре выше 40 единиц вирусы оценивали как ингибиторочувствительные.

Определение состава генома реассортантных штаммов вируса гриппа А и В проводили методом мультиплекс-ПЦР [4] и секвенированием ДНК-копий генов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика сезонных эпидемических вирусов гриппа, применявшихся для получения реассортантных ЖГВ.

Исследованные характеристики ряда эпидемических вирусов, на основе которых в разные годы были подготовлены штаммы ЖГВ, демонстрируют неоднородность их биологических свойств (табл.). Лишь незначительное количество эталонных вирусов, которые выбирались кандидатами в вакцины с 1994 года по настоящее время, обладают типичными характеристиками высоковирулентных штаммов: способностью к репродукции при 39-40°C (38°C для вирусов гриппа В) и слабой репродуктивной активностью при пониженной температуре (non-ts/non-ca фенотип). Среди эталонных вирусов гриппа А, представленных в табл., такие характеристики демонстрируют возбудитель пандемии 2009 года А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm,

Биологические характеристики эпидемических вирусов гриппа А и В, кандидатов в вакцинные штаммы разных лет, в сравнении со свойствами доноров аттенуации для живой гриппозной вакцины

Вирусы	Питр вируса при 33°С	RСТ _{50%} *			Фенотип при t(°С)		Чувствительность к термостабильным ингибиторам
		RСТ _{50%} *	RСТ _{50%} *	RСТ ₃₅	39°(37)	40°(38)	
Эпидемические вирусы А (H1N1)							
А/Соломоновы острова/03/06	9,2±0,3	2,5	>8,0	5,0	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>ir</i> <10
А/Гонконг/2652/06	9,3±0,1	2,8	>8,1	5,8	<i>pop-ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>ir</i> <10
А/Брисбен/59/07	9,7±0,2	8,0	>8,5	6,0	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>ir</i> <10
А/Калифорния/07/09 (H1N1)rdm	8,7±0,2	0,0	0,8	6,0	<i>pop-ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>ir</i> <10
А/Боливия/559/2013(H1N1)rdm	9,7±0,1	0,2	0,7	7,5	<i>pop-ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>ir</i> <10
Эпидемические вирусы А (H3N2)							
А/Иоганнесбург/33/94	7,7±0,4	>6,5	>6,5	5,5	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>ir</i> <10
А/Нанчанг/933/95	7,7±0,4	3,0	>6,5	>6,5	<i>pop-ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>is</i> 320
А/Вайоминг/3/03	8,5±0,3	н.и.	>7,3	5,3	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>ir</i> 20
А/Брисбен/10/07	7,2±0,2	н.и.	>6,0	>6,0	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>is</i> 320
А/Виктория/361/11	8,2±0,2	-0,9	2,0	6,2	<i>pop-ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>ir</i> <10
А/Техас/50/12	8,2±0,2	1,0	6,0	6,0	<i>pop-ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>ir</i> 40
Эпидемические вирусы гриппа В							
В/Петербург/92/95	7,7±0,2	5,0	>6,5	>6,5	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>is</i> 2560
В/Иоганнесбург/05/99	8,0±0,3	н.и.	6,0	5,0	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>is</i> 320
В/Шанхай/361/02 ^{1,2}	7,0±0,2	>5,8	>5,8	5,3	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>is</i> 320
В/Джиллин/20/03	8,7±0,5	5,5	>7,5	6,0	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>is</i> 2560
В/Малайзия /06/04	9,2±0,3	1,8	>8,0	2,7	<i>pop-ts</i>	<i>ca</i>	<i>ir</i> 20
В/Флорида/07/04	10,2±0,1	8,5	8,5	5,0	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>is</i> 320
В/Брисбен/60/08	8,7±0,4	>7,5	>7,5	6,5	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>ir</i> 10
В/Висконсин/1/10	6,9±0,4	>5,2	>5,2	5,2	<i>ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>is</i> 640
В/Техас/06/11	7,0±0,5	5,0	>5,8	2,5	<i>ts</i>	<i>ca</i>	<i>is</i> 2560
В/Массачусетс/2/12	8,2±0,3	0,9	6,0	4,9	<i>pop-ts</i>	<i>pop-ca</i>	<i>is</i> 320
Донор аттенуации							
А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)	9,2±0,2	7,5	8,0	2,5	<i>ts</i>	<i>ca</i>	<i>ir</i> <10
В/СССР/60/69	9,7±0,3	1,5	8,0	2,0	<i>pop-ts</i>	<i>ca</i>	<i>ir</i> <10

П р и м е ч а н и я. *В скобках указана температура репродукции вирусов гриппа В; н.и. — не исследовали.

его дрейфовый вариант А/Боливия/559/2013(Н1N1)pdm, А/Виктория/361/2011 (Н3N2), А/Соломоновы острова/03/06 (Н1N1) и антигенно близкородственный ему А/Гонконг/2652/06 (Н1N1).

Все современные эталонные вирусы гриппа В при 38°C проявляют ts фенотип, более того, для большинства ограничительной температурой репродукции является уже 37°C. Следует отметить при этом, что для донора аттенуации В/СССР/60/69, полученного из эпидемического вируса, который был выделен в период циркуляции высокотемператууроустойчивых штаммов, ts фенотип при 38°C уже является показателем аттенуации, а к температуре 37°C донор аттенуации более устойчив, чем современные эпидемические вирусы ($RCT_{37}=1,5 \lg ЭИД_{50}/мл$).

Некоторые вирусы, помимо температурочувствительности, характеризуются способностью к достаточно активной репродукции при 25°C, как, например, штамм В/Техас/06/11, который считался потенциальным кандидатом в эталонные вирусы в 2012 году. Возможно, из-за таких биологических особенностей В/Техас/06/11 так и не приобрел эпидемического значения. Примером холодоустойчивости ($RCT_{25}=2,7 \lg ЭИД_{50}/мл$) является также эталонный вирус В/Малайзия/06/04, который при этом характеризуется non-ts₃₇/ts₃₈ фенотипом.

Еще один показатель, имеющий значение при подборе оптимальных условий селекции вакцинных реассортантов — взаимоотношение эпидемических вирусов гриппа с неспецифическими термостабильными ингибиторами неиммунной сыворотки крови лошади. Исследованные вирусы гриппа сероподтипа А(Н1N1) и вирусы гриппа В линии Виктория были устойчивы к ингибиторам сыворотки крови лошади, тогда как вирусы гриппа В линии Ямагата и ряд вирусов гриппа А(Н3N2) характеризовались ингибиторочувствительностью.

Учитывая разнообразие эпидемических вирусов по ключевым для реассортации биологическим характеристикам, для стабильно быстрого и успешного получения вакцинных штаммов следует индивидуально подбирать методические приемы.

Особенности подготовки реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе холодоустойчивых вирусов гриппа. При подготовке штаммов ЖГВ на основе природно-холодоустойчивых вирусов гриппа нивелируется значение такого мощного селективного фактора, как пониженная температура инкубации. Однако, обычно холодоустойчивость эпидемических вирусов ниже, в сравнении с донорами аттенуации (табл.), и пониженная до 25°C температура как селективный фактор сохраняет свою эффективность. Если же эпидемический вирус высоко холодоустойчив, пассажи реассортантов при пониженной температуре теряют селективное значение. В этом случае остается полагаться на единственный селективный фактор — сыворотку против донора аттенуации и проводить селективные пассажи при оптимальной температуре. Молекулярно-генетический отбор вакцинного 6:2 реассортанта потребует более значительных временных затрат из-за разнообразия формирующихся реассортантов в отсутствие одного из селективных ограничителей.

Особенности подготовки реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе температурочувствительных эпидемических вирусов гриппа. При реассортации с донором аттенуации температурочувствительных эпидемических вирусов условия функционирования их полимеразного комплекса приближаются к условиям активности полимеразного комплекса донора, что не дает преимуществ в селекции генов, кодирующих внутренние белки донора аттенуации. Для оптимизации процесса реассортации в ряде случаев существует возможность подбирать в качестве эпидемических родительских вирусов штаммы, антигенно идентичные рекомендованным ВОЗ, но обладающие большей устойчивостью репродукции при превышающей оп-

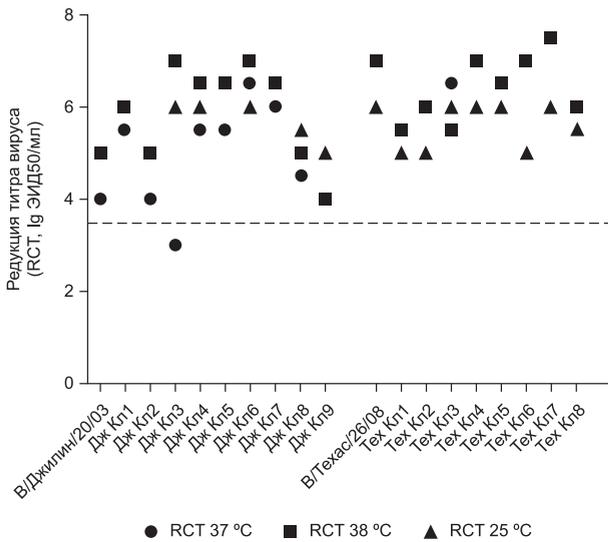


Рис.1. Характеристика репродуктивной активности клонов из популяции эпидемических вирусов гриппа В в развивающихся куриных эмбрионах.

характеризовались *ts* фенотипом, как исходный вирус ($RCT_{37} = 5,2 \pm 0,2 \lg \text{ЭИД}_{50}$), тогда как клон 3 оказался значительно более термостойчивым ($RCT_{37} = 3,2 \pm 0,2 \lg \text{ЭИД}_{50}$). Однако отличающийся по термостойкости клон удается изолировать не всегда. Так, все 8 исследованных клонов термостойчивого вируса В/Техас/26/08 также характеризовались *ts* фенотипом уже при 37°C $RCT_{37} = 5,6 \pm 0,4 \lg \text{ЭИД}_{50}$. В случае успешного отбора *non-ts* клона, как произошло при клонировании вируса В/Джилин/20/03, в скрещивание целесообразно взять именно его.

Особенности подготовки реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе эпидемических вирусов гриппа, чувствительных к неспецифическим ингибиторам неиммунной сыворотки крови. Антисыворотка к донору аттенуации, используемая в селективных пассажах, обрабатывается прогреванием и разрушающим неспецифическим ферментом RDE (Receptor destroying enzyme, Denka Seiken, UK). Однако остаточный уровень термостабильных ингибиторов может сохраняться. Это искажает значения титра сыворотки и может осложнять получение вакцинных реассортантов на основе ингибиторочувствительных эпидемических вирусов.

Поскольку эпидемический вирус, как и донор *att*, адаптированы к размножению в куриных эмбрионах, они приобретают специфичные для куриных эмбрионов мутации еще до скрещивания, это может происходить уже при единственном накоплении [16]. На клетках хориоаллантоисной оболочки (ХАО) куриного эмбриона преобладают α -2,3 рецепторы, поэтому культивирование вирусов человека в РКЭ приводит к перенастраиванию рецепторспецифичного сайта HA с α -2,6 на α -2,3 рецепторное взаимодействие. Выявляться это может снижением ингибирования вируса макроглобулинами сыворотки крови лошади [10]. Если путь приспособления вирусов человека к новому хозяину происходит за счет появления мутаций, обеспечивающих способность использовать рецепторы обоих типов — α -2,6 и α -2,3, либо за счет полной перенастройки на α -2,3 тип связи, то вирус не будет ингибироваться лектинами сыворотки крови лошади. Если же вирусы сохраняют чувствительность к ингибиторам, следовательно, они сохраняют α -2,6 тип взаимодействия. Вероятно, от

тимальные значения температуры. Примером таких антигенных аналогов могут быть *ts*₄₀ вирус А/Техас/50/12 и *non-ts*₄₀ вирус А/Виктория/361/11 (H3N2) (табл.).

В некоторых случаях существует возможность отбора термостойчивого клона из популяции исходно термостойчивого вируса. На рис.1 представлены результаты попытки выделить термостойчивые клоны из популяции двух термостойчивых вирусов гриппа В/Техас/26/08 (линия Виктория) и В/Джилин/20/03 (линия Ямагата). Среди 9 изолированных клонов термостойчивого при 37°C вируса В/Джилин/20/03 восемь клонов

таких вирусов нельзя ожидать высокой репродуктивности в РКЭ. Следует отметить, что мы не наблюдали снижения чувствительности к ингибиторам сыворотки крови лошади у ингибиторочувствительных 6:2 реассортантов, культивируемых в РКЭ. Их ингибиторочувствительный фенотип всегда был идентичен фенотипу исходного, выделенного в РКЭ и адаптированного к РКЭ эпидемического родителя. Вероятно, адаптация к клеткам ХАО, имеющим α -2,3-рецепторную специфичность, происходит у эпидемического вируса при культивировании в РКЭ сразу после выделения от человека. Возможно, подобная адаптация сопровождается дополнительными мутациями, не затрагивающими α -2,6-рецепторный сайт, что не меняет взаимодействие вируса с лошадиной сывороткой.

Оценка роли чувствительности/устойчивости вирусов к ингибиторам сыворотки крови может быть рассмотрена в двух аспектах: (1) влияние на успех подготовки штаммов ЖГВ и (2) влияние на качество вакцинного препарата, что имеет определяющее значение.

(1) При разработке штаммов ЖГВ на основе современных вирусов гриппа А и В часто приходится сталкиваться с ситуацией, когда в геном реассортанта включается нейраминидаза донора аттенуации. Как нами было показано ранее, NA от донора аттенуации в подавляющем большинстве наследовали характеризующиеся ингибиторочувствительностью вирусы гриппа А(Н3N2) и В линии Ямагата [11]. Только 19,5% от общего числа клонов на основе ингибиторочувствительных эпидемических вирусов наследовали NA «дикого» типа, тогда как среди реассортантов на основе природно-устойчивых к термостабильным сывороточным ингибиторам вирусов А(Н1N1), А(Н3N2) и В линии Виктория их количество возрастало до 92,2%. Описанные результаты обобщены на рис.2.

Оценка эпидемических вирусов по признаку чувствительности к термостабильным ингибиторам позволяет подобрать наиболее рациональные мероприятия для успешного получения вакцинных реассортантов на основе актуального *is* вируса. Поскольку куриные эмбрионы на хориоаллантоисной оболочке преимущественно содержат α -2,3 рецепторы, то при реассортации эпидемического ингибиторочувствительного родителя, имеющего сродство к α -2,6 рецепторам, с донором аттену-

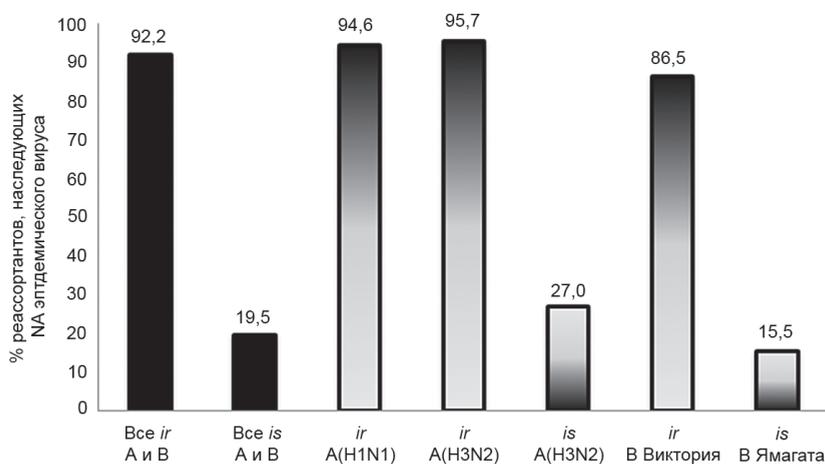


Рис.2. Наследование реассортантами нейраминидазы от эпидемического родителя при скрещивании с донорами аттенуации 118 ингибиторочувствительных (*is*) и 283 ингибиторочувствительных (*ir*) вирусов гриппа А и В (в % от общего количества реассортантов).

ации преимущество будет иметь хорошо адаптированный к репродукции в РКЭ *ir* донор аттенуации. Поэтому для обеспечения равных возможностей обоих родительских вирусов на этапе скрещивания следует давать множественное преимущество эпидемическому вирусу.

Требуется также обеспечить подбор оптимальной рабочей концентрации антител к донору, которая не должна превышать установленную экспериментально концентрацию 50 ГАЕ. В этой ситуации особенно важно использование максимально высокотитражной сыворотки, что позволяет снизить концентрацию неспецифических ингибиторов в рабочем разведении сыворотки и минимизировать неспецифическое ингибирование НА *is* родителя.

Существует опасение, что ингибиторочувствительные штаммы как обладающие сродством к α -2,6 рецепторам могут приобретать адаптивные мутации в НА в процессе накопления вируса в РКЭ. Кроме того, рецепторсвязывающий карман в структуре гемагглютинаина расположен рядом с антигенным сайтом, и подобные мутации могут привести к изменению антигенных свойств вируса. Такая ситуация, в частности, произошла с вирусом А/Виктория/361/11(Н3N2), рекомендованным ВОЗ для получения вакцины на 2012/2013 эпидемический сезон. Через год этот штамм был заменен на антигенно родственный А/Техас/50/12 (Н3N2), поскольку при культивировании в РКЭ вирус А/Виктория/361/11 приобрел мутацию, влияющую на его антигенную характеристику [18].

(2) Поскольку вирусы с α -2,6 сиалилгалактозной рецепторной специфичностью имеют сродство к клеткам респираторного тракта человека, следует ожидать, что вакцинный штамм на основе ингибиторочувствительных вирусов будет репродуцироваться в них лучше, чем на основе ингибитороустойчивых вирусов с α -2,3 рецепторной специфичностью, что, в конечном счете, должно положительно сказаться на иммуногенности вакцинного препарата. Важно, чтобы штаммы ЖГВ также успешно преодолевали богатый ингибиторами муциновый барьер в межклеточных секретах носовых ходов. Есть данные, что слизистые секреты человека содержат α -2,3-терминированные гликаны [8], что также свидетельствует в пользу вакцинных препаратов на основе ингибиторочувствительных вирусов с α -2,6 типом рецепторного взаимодействия. Однако в какой степени неспецифические ингибиторы человека влияют на вакцинный штамм в организме судить сложно. Количество ингибиторов в крови и секретах варьирует в зависимости от сезона года и индивидуальных особенностей людей.

В литературных источниках нет единого мнения о том, какой штамм *is* или *ir* предпочтительнее для ЖГВ, однако допускается, что ингибитороустойчивые штаммы могут иметь преимущества при подготовке вакцины для людей [15], что коррелирует с нашими выводами.

Из ранних клинических исследований с выделением вирусов от заболевших было сделано заключение, что устойчивые к ингибиторам сыворотки лошади вирусы вызывают меньше реакций, чем чувствительные к ингибиторам [17]. Скорее всего, меньше реакций потому, что *ir* вирусы могут хуже репродуцироваться в клетках человека.

Таким образом, существует противоречие: для эффективного получения вакцинных реассортантов в РКЭ предпочтительны ингибитороустойчивые вирусы гриппа, тогда как на основе ингибиторочувствительных вирусов препарат ЖГВ, вероятно, может проявлять большую эффективность. Поскольку при работе в системе РКЭ не представляется возможным влиять на появление адаптивных к новому хозяину мутаций, необходим обязательный молекулярно-генетический контроль отбора ре-

ассортантов с неизменной антигенной и рецепторной специфичностью. Для серологического подтверждения полного соответствия иммуногенности вакцинного реассортанта эпидемическому вирусу необходим антиген на основе исходного эпидемического изолята, накопленного в культуре клеток млекопитающих, и сыворотка к нему. Об обеспечении такими диагностическими наборами необходимо ставить вопрос перед ВОЗ. Обязателен также контроль *ts/ca* фенотипа реассортантов, поскольку теоретической возможности возникновения супрессорных мутаций исключать нельзя, хотя многолетние исследования ЖГВ таких мутаций никогда не выявляли.

Температурочувствительные, а иногда и холодоустойчивые вирусы гриппа продолжают оставаться этиологическими агентами эпидемического процесса. Случается, что возбудителями сезонной заболеваемости становятся вирусы, обладающие *ts/non-ca*, *non-ts/ca* и даже *ts/ca* фенотипом. Большая доля вирусов гриппа А(Н3N2) и В/Ямагата-подобные вирусы характеризуются чувствительностью к неспецифическим ингибиторам неиммунной сыворотки крови, а в последнее время *is* вирусы стали выделяться и среди представителей линии В/Виктория. Вопрос о патогенности *ts* и *ca* возбудителей требует отдельного изучения, однако в связи с тем, что они приобретают массовое распространение в популяции и являются причиной вспышек и эпидемий, требованием ВОЗ является подготовка противогриппозных вакцин на их основе. В подобных ситуациях при получении реассортантов для живой гриппозной вакцины возникают определенные сложности.

Характеристика эпидемических вирусов по фенотипическим особенностям позволила предложить наиболее рациональные методические приемы для успешного получения вакцинных реассортантов. Такие приемы важно использовать в работе при получении штаммов ЖГВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. СПб, Наука, 1994.
2. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Voeten J.T.M., Teley L.C.P., Drieszen-van der Cruijisen S.K.M., Heldens J.G.M., Van den Bosch J.F., Руденко Л.Г. Ведущая роль генов полимеразного комплекса в аттенуации отечественной живой гриппозной вакцины А и В. ЖМЭИ. 2010, 6: 41-47.
3. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Литвинова О.М., Иванова В.В., Исакова И.Н., Медведева Т.Е., Александрова Г.И., Руденко Л.Г. Изменение признака температурочувствительности как отражение эволюционной изменчивости эпидемических штаммов вирусов гриппа. Медицинский академический журнал. 2002, 2 (3): 49-57.
4. Киселева И.В., Voeten J.T.M., Teley L.C.P., Ларионова Н.В., Дубровина И.А., Бердыгулова Ж.А., Баженова Е.А., van den Bosch H., Heldens J.G.M., Руденко Л.Г. Анализ состава генома штаммов сезонной и пандемической живой гриппозной вакцины. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011, 4: 29-36.
5. Полежаев Ф.И., Александрова Г.И. Выделение температурочувствительных штаммов вируса гриппа в эпидемию, вызванную вирусом А/Виктория в 1975-1976 гг. Вopr. вирусол. 1979, 4: 430.
6. Руденко Л.Г., Ларионова Н.В., Киселева И.В., Исакова-Сивак И.Н. Живая гриппозная вакцина, итоги разработок и перспективы применения. Медицинский академический журнал. 2010, 10 (4): 235-239.
7. Ambrose C.S., Luke C., Coelingh K. Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza. Resp Virus. 2008, 2 (6): 193-202.
8. Couceiro J.N., Paulson J.C., Baum L.G. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. Virus Res. 1993, 29 (2): 155-165.
9. Chu C.M., Tian S.F., Ren G.F. et al. Occurrence of temperature-sensitive influenza A viruses in nature. J. Virol. 1982, 41 (2): 353-359.

10. Gambaryan A.S., Robertson J.S., Matrosovich M.N. Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology*. 1999, 258 (2): 232-239.
11. Kiseleva I.V., Larionova N.V. Bazhenova E.A., Fedorova E.A., Dubrovina I.A., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G. Contribution of neuraminidase of influenza viruses to the sensitivity to serum inhibitors and reassortment efficiency. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2014, 29 (3): 130-138.
12. Matrosovich M., Gao P., Kawaoka Y. Molecular mechanisms of serum resistance of human influenza H3N2 virus and their involvement in virus adaptation in a new host. *J. Virol.* 1998, 72 (8): 6373-6380.
13. Oxford J.S., Corcoran T., Schild G.C. Naturally occurring temperature-sensitive influenza A viruses of the H1N1 and H3N2 subtypes. *J. Gen. Virol.* 1980, 48 (2): 383-389.
14. Oxford J.S., Öberg Bo. Conquest of viral disease: a topical review of drug and vaccines. Netherlands, Elsevier, 1985.
15. Peetermans J. Live influenza virus vaccines and preparation thereof. US patent. 1976, #3953592.
16. Robertson J.S., Nicolson C., Bootman J.S. et al. Sequence analysis of the haemagglutinin (HA) of influenza A (H1N1) viruses present in clinical material and comparison with the HA of laboratory-derived virus. *J. Gen. Virol.* 1991, 72 (11): 2671-2677.
17. Smorodintsev A.A., Alexandrova G.A., Chalkina O.M., Selivanov A.A. *Applied Virology*. Ed. M. Saunders, E.H. Lennette. 1-st Annual Symposium. Boca Raton, Florida, 1964, Sheboygan, Wisconsin, Ellis, 1965: 142.
18. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013-2014 northern hemisphere influenza season. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2013, 88: 101-114.

Поступила 20.11.18

Контактная информация: Ларионова Наталья Валентиновна, д.б.н.,
197376, Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, 12, р.т. (812)234-4292

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.В.Сорокина^{1,2}, Н.Г.Сивакова¹, Э.А.Ахматова¹, Н.Н.Митрофанова³, С.А.Сходова¹, Н.К.Ахматова¹

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИВАЛЕНТНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИЗАТА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ²Академия постдипломного образования ФНКЦ ФМБА России, Москва; ³Медицинский институт Пензенского государственного университета

Цель. Изучение триггерных факторов при хронической крапивнице, особенностей в экспрессии Толл-подобных рецепторов, клинико-иммунологической эффективности применения микробных антигенов у больных хронической крапивницей. *Материалы и методы.* Были обследованы больные хронической крапивницей (134 пациента 18 — 60 лет). Изучение экспрессии TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 на клетках крови проводили с помощью проточной цитометрии; 62 больных получали поливалентный бактериальный лизат (ПБЛ) per os на фоне базисной терапии, 72 больных — монотерапию базисными препаратами. *Результаты.* У больных с бактериальной инфекцией выявили высокий уровень экспрессии TLR2, TLR4. При наличии вирусных инфекций наблюдали высокие значения экспрессии TLR3. Применение ПБЛ способствовало повышению числа больных с клинической ремиссией, снизило степень активности крапивницы, привело к коррекции показателей TLR2 и TLR4, снизило уровень общего IgE. *Заключение.* Включение в комплекс терапевтических и профилактических мероприятий у больных крапивницей хронической препарата на основе микробных антигенов (поливалентного бактериального лизата) способствует повышению клинической эффективности и активации звеньев врожденного иммунитета.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 34—39

Ключевые слова: крапивница хроническая, Толл-подобные рецепторы, поливалентный бактериальный лизат

THE USE OF A POLYVALENT BACTERIAL LYSATE IN A COMPLEX THERAPY OF CHRONIC URTICARIA

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Academy of Postgraduate Education of FMBA, Moscow; ³Medical Institute of Penza State University, Russia

The aim of the study was to study trigger factors in chronic urticaria, peculiarities in the expression of Toll-like receptors, clinical and immunological efficacy of microbial antigens in patients with chronic urticaria. *Materials and methods.* Patients with chronic urticaria (134 patients). A study of the expression of TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 on blood cells using flow cytometry. 62 patients received polyvalent bacterial lysate against baseline therapy per os, 72 patients received monotherapy with basic drugs. *Results.* In patients with bacterial infection, high levels of TLR2, TLR4 expression were detected. In the presence of viral infections, high TLR3 expression values were observed. The use of PBL contributed to an increase in the number of patients with clinical remission, decreased urticaria activity, led to a correction in TLR2 and TLR4, and decreased the level of total IgE. *Conclusion.* Inclusion in the complex of therapeutic and prophylactic measures in patients with urticaria of a chronic drug based on microbial antigens (polyvalent bacterial lysate) contributes to the increase of clinical effectiveness and activation of the links of innate immunity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 34–39

Key words: chronic urticaria, Toll-like receptors, polyvalent bacterial lysate

ВВЕДЕНИЕ

Крапивница, занимая второе по распространенности место в структуре аллергических заболеваний и составляя 0,5% популяционной статистики, является одной из сложнейших проблем клинической медицины [8, 12]. Социальная значимость патологии обусловлена длительным и упорным течением заболевания, а также заметным ростом распространенности хронических форм заболевания. Невысокая эффективность диагностических, лечебных и профилактических мероприятий диктует необходимость дальнейших исследований в этом направлении [15]. Острая крапивница приобретает хроническое рецидивирующее течение у 30% больных [2]. При этом от 35% до 80% случаев хронической крапивницы представляют собой идиопатические формы. В патогенезе хронической крапивницы роль триггеров играют инфекционные агенты [5,12]. Рецидивирование крапивницы наблюдается на фоне продолжительной сенсибилизации организма, обусловленной наличием очагов хронической инфекции [4,9,12,14] Многочисленные данные отечественных и зарубежных исследований свидетельствуют о высокой степени носительства *Staphylococcus aureus* в виде назального инфицирования у пациентов с хронической спонтанной крапивницей, накапливаются данные о роли вирусов в развитии хронических форм [6, 8, 10, 13]. Пики инфицирования вирусом гриппа, аденовирусами, респираторно-синцитиальными вирусами, риновирусами, различными типами вируса Коксаки обуславливают сезонные колебания коэффициента заболеваемости крапивницей [2, 8]. Инфицирование некоторыми вирусами (в том числе герпесвирусами), обладающими эволюционно сложившимся тропизмом к иммунокомпетентным клеткам и эпителию слизистой оболочки респираторного тракта, на фоне иммунодефицитных состояний существенно углубляет депрессию иммунокомпетентных клеток, местной иммунной защиты дыхательных путей и способствует увеличению частоты рецидивов хронической крапивницы. Изменения иммунологической реактивности создают благоприятные условия для развития реакций гиперчувствительности [1,7,11].

Торпидность к проводимой антимикробной и симптоматической терапии у больных хронической крапивницей указывает на необходимость разработки новых более эффективных методов комбинированных методов лечения с позиций иммунопатологии. С этой точки зрения большой опыт эффективного применения препаратов из условно патогенных микроорганизмов в терапии аллергопатологии указывает на целесообразность включения этих препаратов в схему терапии больных хронической крапивницей [1-3]. В ходе применения препаратов из микробных антигенов формируется протективный иммунитет против патогенов, входящих в состав препарата и являющихся пусковым фактором при аллергопатологии, с одной стороны, и достигается коррекция вторичных иммунодефицитных состояний, ассоциированных с аллергическим процессом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были обследованы 134 больных ХИК в возрасте 18-60 лет, лица мужского пола составили — 61,2%/82 больных. Иммунологические исследования включали определение экспрессии TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 на МЛПК с помощью моноклональных антител (Caltag Laboratories, США) на проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку результатов проводили с помощью параметрической и непараметрической статистики (W-критерий Shapiro-Wilk, U-критерий Mann-Whitney, критерий Wilcoxon, критерий Pearson и Spearman, метод Хи-квадрат), используя стандартный пакет статистических программ Windows 7 (StatSoft 7.0). Исследуемый препарат — поливалентный бактериальный лизат (ПБЛ), содержащий лизаты *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. viridans*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *H. influenzae b*, *M. catarrhalis*. Схема применения: сублингвально по 7 мг в сутки 20 дней.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Длительность ХИК у большинства больных составила до 2 лет (82 больных), от 2 до 5 лет отмечена у 37,9%/47 больных, более 5 лет только у 3,7%/5 больных. Рецидивирующее течение крапивницы отмечалось у 69 (51,5%) пациентов. Более 5 рецидивов в год отмечали 5,9%/8 больных. Персистирующее течение отмечалось у 47 (34,8%) больных. При оценке степени активности крапивницы у 44,8%/60 больных была отмечена низкая активность ХИК, средний балл среди этих больных составил $1,5 \pm 0,3$. Средняя степень активности наблюдалась у 50%/67 человек ($3,2 \pm 0,4$ балла). Тяжелая степень активности наблюдалась у 3,7%/5 больных ($4,7 \pm 1,6$ баллов). Рецидивы ХИК были ассоциированы с обострениями хронических воспалительных заболеваний ЛОР-органов (17,8%/24 больных), вспышками ОРВИ и гриппа (20%/27 больных).

В отделяемом органов дыхания выявлена колонизация *Staphylococcus aureus* носоглотки у 37%/50 больных, *Klebsiella pneumoniae* — у 75,4%/26 больных, *Proteus vulgaris* — у 15,6%/21 больного, реже *Streptococcus spp.* — у 11,9%/16 больных, *Moraxella catarrhalis* — у 7,46%/10 больных, *P. aeruginosa* — у 3,7%/5 больных и грибы *Candida* — у 6,7%/9 больных.

При проведении вирусологических исследований выявлено 15,93%/29 положительных результатов в отношении ДНК ВПГ1 и 2,20%/4 в отношении ДНК ВПГ2, ВЭБ идентифицирован у 19,23%/35 больных, ВГЧ-6 — у 15,6%/21 больных, у 9,7%/13 больных — ВГЧ-7 типа, аденовирус выявлен у 14,9%/20 больных. Признаки реактивации вирусов, включающие идентификацию вирусов в биологических жидкостях и

положительные титры противовирусных антител в сочетании с клиническими признаками вирусных инфекций выявлены у 34,3%/46 больных.

Результаты изучения экспрессии Toll-подобных рецепторов показали наличие высокого уровня TLR2,3,4,9 на МЛПК, превышающего значения в группе здоровых лиц в 2-3,5 раза, ($p < 0,05$). В зависимости от длительности заболевания выявлены некоторые различия. Длительность от 2 до 6 месяцев характеризовалась снижением экспрессии TLR2 и TLR4 ($3,7 \pm 0,9$ и $1,8 \pm 0,1$)% ниже нормальных значений ($4,8 \pm 0,6$ и $4,2 \pm 0,3$)% соответственно. С повышением длительности заболевания отмечается рост уровня экспрессии TLR2 и TLR4 ($28,7 \pm 4,9$ и $17,3 \pm 3,4$)%.

В зависимости от получаемого лечения были выделены 2 равнозначные группы: 62 больных первой группы получали терапию поливалентным бактериальным лизатом (ПБЛ) на фоне базисной терапии; 72 больных второй группы — базисную терапию, которая включала назначение антигистаминных препаратов, противовирусных препаратов, антибиотиков по стандартным схемам. При оценке отдаленных результатов терапии через 12 месяцев у больных крапивницей выявлено снижение количества рецидивов (с $2,9 \pm 1,1$ до $1,1 \pm 0,2$) в год и активности процесса (с $2,9 \pm 1,1$ до $1,6 \pm 0,6$) баллов. Наиболее выраженная динамика снижения частоты рецидивов отмечена в группе после иммунотерапии (до $0,5 \pm 0,1$ в год), в этой же группе отмечается снижение тяжести процесса ($p < 0,05$) (табл. 1). Стойкая клиническая ремиссия в результате иммунотерапии была достигнута у 33,8%/21 больного (2 года наблюдения); в результате базисной терапии — у 19,4%/14 больных. Значительное клиническое улучшение было достигнуто у 35,5%/22 больных 1 группы, у 23,6%/17 больных 2 группы (табл. 2).

Комбинированная терапия с применением поливалентного бактериального лизата способствовала увеличению числа клеток, экспрессирующих Толл-подобные рецепторы. Уровень экспрессии TLR3 клеток повысился (с $25,4 \pm 8,8$ до $47,2 \pm 9,3$ %), TLR4 (с $9,6 \pm 1,2$ до $22,6 \pm 3,6$ %), TLR9 (с $20,6 \pm 5,2$ до $37,8 \pm 6,4$ %).

В случаях крапивницы, ассоциированной с рецидивирующими вирусными инфекциями, терапия индуцировала нарастание численности TLR4-экспрессирующих клеток (с $10,5 \pm 3,8$ до $19,4 \pm 2,2$)%, не влияя на исходно высокий уровень экспрессии TLR3,9 позитивных клеток. В подгруппе больных, где коморбидный фон был представлен ассоциацией часто рецидивирующих вирусных инфекций и очагами бактериальной инфекции, исходно низкий уровень содержания TLR3 в МЛПК в результате терапии достоверно повышался (с $4,1 \pm 0,1$ до $23,8 \pm 4,7$)%, увеличивалось число

Таблица 1. Влияние терапии на частоту рецидивов и активность крапивницы (12 месяцев после терапии)

Показатель	В целом по группе, n=134				Группа 1		Группа 2	
	До лечения		После лечения		ПБЛ, n=62		Базисная терапия, n=72	
	M±σ	Me (LQ-UQ)	M±σ	Me (LQ-UQ)	M±σ	Me (LQ-UQ)	M±σ	Me (LQ-UQ)
Балл на больного	$2,9 \pm 1,1$	3 (3-4)*	$1,6 \pm 0,6$	2 (2-3)*	$1,3 \pm 0,4$	1 (1-1,6)#	$2,0 \pm 0,8$	2 (2-2,8)#
Количество рецидивов в год	$2,9 \pm 1,1$ *	2,3 (2-3)	$1,1 \pm 0,2$ *	1 (1-1)	$0,5 \pm 0,1$ * #	0,5 (0,5-0,5)	$1,6 \pm 0,4$ #	1,6 (1,5-1,7)
Длительность рецидивов	$19,1 \pm 6,1$	19,8 (15-23) *	$15,9 \pm 3,1$	16 (15-17)*	$16,1 \pm 3,9$	15,5 (14-16)	$17,3 \pm 5,2$	17 (15-18)

Примечание. * $p < 0,05$ — достоверность различий показателей в группах до и группах после лечения (Wilcoxon Matched Pairs Test). # $p < 0,05$ — достоверность различий показателей в группах после лечения (Mann-Whitney U-test), σ — стандартное отклонение, LQ-UQ -25-75 перцентили.

Таблица 2. Клиническая эффективность терапии у больных хронической спонтанной крапивницей (24 месяца после терапии)

Методы терапии	n	Ремиссия		Значительное улучшение		Улучшение		Без эффекта		Ухудшение	
		абс	%±m	абс	%±m	абс	%±m	абс	%±m	абс	%±m
ПБЛ	62	21*	33,8±2,5	22*	35,5± 6,4	16*	25,8± 3,1	2	9,7± 2,1	1	1,6±1,1
Базисная терапия	72	14*	19,4±4,56	17*	23,6± 4,5	35*	48,6± 5,1	4	5,6± 2,1	2	2,8±1,4

Примечание. * p<0,05 — достоверность различий между группами по χ^2 .

клеток с экспрессией TLR4 (с 8,4±2,5 до 13,7±2,2)%, TLR9 (с 6,8±2,9 до 19,6±2,0)%. При отсутствии признаков инфекционной патологии исходно низкие значения экспрессии Толл-подобных рецепторов в результате терапии имели выраженную тенденцию к повышению численности TLR2 и TLR4 экспонирующих клеток (с 8,2±1,6 и 5,2±1,4 до 16,1±2,4 и 12,6±3,1)% соответственно.

Уровень общего IgE достоверно снижался в результате всех видов терапии в группе 1 до (36,0±16,2) кЕ/л (p<0,05), в группе 2 до (58,1±22,1) кЕ/л (p<0,05).

Таким образом, исследование показало, что применение ПБЛ способствовало повышению количества экспрессирующих TLR3 и TLR9 клеток. Повышение числа клеток с TLR9, распознающих CpG мотивы бактериальной ДНК и CpGDNA (метилованные) гликопротеины оболочки вирусов, указывает на активацию антибактериального и противовирусного иммунного ответа. У больных с признаками активации бактериальных и вирусных инфекций наблюдали повышение исходно сниженного в 15 раз уровня TLR3-экспрессирующих клеток. Бактериальная инфекция, сопровождающая течение хронической спонтанной крапивницы, сопровождалась высоким уровнем клеток с TLR2, TLR4, которые в ходе всех видов терапии нормализовались. Усиленная активация TLR2 и TLR4 позитивных клеток может стать причиной гиперпродукции провоспалительных цитокинов и, как следствие, приводить к инициации развития хронического воспаления и аутоиммунных заболеваний. В этом аспекте корригирующее действие терапии на эти показатели оказывает противовоспалительный эффект при хронической крапивнице. Надо отметить, что длительное часто рецидивирующее течение крапивницы характеризуется низким уровнем содержания TLR2,4, поэтому повышение этих показателей в несколько раз в ходе применения ПБЛ показало, что иммунотерапия указанным препаратом вызывает повышение этих показателей в несколько раз и, следовательно, способствует активации механизмов врожденного иммунитета против этиологически значимых микробов. TLR2 ответственны за распознавание продуктов грамм-отрицательных бактерий, микобактерий, дрожжей, в том числе различных компонентов золотистого стафилококка, включая пептидогликан и липопептиды. TLR4 является рецептором для распознавания липополисахарида. Дисфункция в сигналах, генерируемых TLR2, является причиной персистенции стафилококковой инфекции у пациентов с аллергопатологией, прежде всего в результате нарушения индукции антимикробных пептидов [2,15]. Таким образом, включение в терапию больных ХИК, сопровождающейся высокой степенью колонизации бактериальными агентами, признаками реактивации вирусов, частыми эпизодами ОРВИ, признаками грибковой инфекции, препаратов на основе микробных антигенов, способствует повышению резистентности против этиологически значимых микробов, воздействует на триггерный фактор заболевания. Комбинированная терапия с применением ПБЛ привела также к нормализации показателей гуморального

звена иммунитета в виде повышения уровня IgM и снижения уровня общего IgE. Динамика иммунологических показателей коррелировала с клинической эффективностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противои-
фекционный. М., Практическая медицина, 2008.
2. Гервазиева В.Б., Сверановская В.В., Сибгатуллина Н.А. Патогенетические механизмы хрони-
ческой крапивницы. Вестник РАМН. 2003, 4:49-53.
3. Семенов Б.Ф., Егорова Н.Б., Семенова И.Б., Курбатова Е.А. Терапевтические вакцины. Росс.
мед. вести. 2000, 3:26-32.
4. Antia C., Baquerizo K., Korman A. Urticaria: A comprehensive review: Treatment of chronic urticaria,
special populations, and disease outcomes. J. Am. Acad. Dermatol. 2018 Oct;79(4):617-633. doi:
10.1016/j.jaad.2018.01.023.
5. Deacock S. J. Infection-related urticaria. Clin. Exp. Immunol. 2008, 153(2): 151–161. doi: 10.1111/
j.1365-2249.2008.03693.x.
6. Dreyfus D.H. Serological evidence that activation of ubiquitous human herpesvirus-6 (HHV-6) plays a
role in chronic idiopathic/spontaneous urticaria (CIU). Clin. Exp. Immunol. 2016 Feb;183(2):230-238.
doi: 10.1111/cei.12704.
7. Futata E., Azor M., Dos Santos J. et al. Impaired IFN- α secretion by plasmacytoid dendritic cells
induced by TLR9 activation in chronic idiopathic urticaria. Br. J. Dermatol. 2011, 164(6):1271-1279.
doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10198.x.
8. Imbalzano E., Casciaro M., Quartuccio S. et al. Association between urticaria and virus infections: A
systematic review. Allergy Asthma Proc. 2016 Jan-Feb;37(1):18-22. doi: 10.2500/aap.2016.37.3915.
9. Kanani A., Betschel S.D., Warrington R. Urticaria and angioedema. Allergy Asthma Clin Immunol.
2018 Sep 12;14(Suppl 2):59. doi: 10.1186/s13223-018-0288-z.
10. Sharma A.D. Role of Nasal Carriage of Staphylococcus aureus in Chronic Urticaria.. Indian J. Dermatol.
2012 May;57(3):233-236. doi: 10.4103/0019-5154.96211.
11. Ucmak D., Akkurt M., Toprak G. et al. Determination of dermatology life quality index, and serum
C-reactive protein and plasma interleukin-6 levels in patients with chronic urticaria. Postepy Dermatol.
Alergol. 2013, 30(3):146-151. doi: 10.5114/pdia.2013.35615.
12. Wedi B., Raap U., Kapp A. Chronic urticaria and infections. Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol. 2004,
4:387-396.
13. Ye Y.M., Hur G.Y., Park H.J. et al. Association of specific IgE to staphylococcal superantigens
with the phenotype of chronic urticaria. J. Korean Med. Sci. 2008, 23:845-851. doi: 10.3346/
jkms.2008.23.5.845.
14. Zavar V., Pawar M., Kumavat S. Malassezia infection associated with chronic spontaneous urticaria
without angioedema: a report on five cases. Acta Dermatovenerol Alp. Pannonica Adriat. 2018, Jun;
27(2):65-69. DOI: <http://dx.doi.org/10.15570/actaapa.2018.15>.
15. Zuberbier T., Bindslev-Jensen C., Canonica W. et al. EAACI/ GA2LEN/EDF guideline: management
of urticaria. Allergy. 2006, 61:321-331.

Поступила 05.04.19

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

Ю.В.Захарова¹, Л.А.Леванова¹, В.И.Иванов², А.С.Быков³, С.С.Афанасьев⁴, М.С.Афанасьев³,
А.В.Караулов³

ЭНТЕРОБАКТЕРИИ В КИШЕЧНОМ МИКРОБИОЦЕНОЗЕ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

¹Кемеровский государственный медицинский университет, ²Кемеровский государственный университет, ³Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, ⁴Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского

Цель. Оценка видового состава, факторов вирулентности и характера взаимодействия энтеробактерий с кишечными микросимбионтами у детей с ВИЧ-инфекцией. *Материалы и методы.* Изучен состав кишечного микробиоценоза 89 ВИЧ-инфицированных детей (основная группа) и 74 детей без ВИЧ-статуса (группа сравнения). Выделены и идентифицированы до вида 273 штамма энтеробактерий. Изучены частота и уровень экспрессии факторов адгезии, инвазии, токсинообразования и антагонизма. *Результаты.* У ВИЧ-позитивных детей частота колонизации слизистой кишечника *E.coli lac*- была в 5 раз выше, *E.coli hly+* в 1,5 раза выше, чем в группе сравнения. Количественный уровень условно патогенных энтеробактерий нарастает при усугублении микроэкологических нарушений; 98% энтеробактерий формирует многокомпонентные ассоциации. Из них 86,8% проявляет нейтраллизм по отношению к другим симбионтам. Частота и уровень продукции факторов адгезии, инвазии и токсинообразования в сравниваемых группах не отличались. *Заключение.* У ВИЧ-инфицированных детей формируется энтеробактериальный тип микробиоценоза. Биологические свойства энтеробактерий не зависят от наличия у детей ВИЧ-статуса.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 40—46

Ключевые слова: энтеробактерии, ВИЧ-инфекция, микробиоценоз, свойства, ассоциации

Yu.V.Zakharova¹, L.A.Levanova¹, V.I.Ivanov², A.C.Bykov³, S.S.Afanasyev⁴, M.S.Afanasyev³, A.V.Karaulov³

ENTEROBACTERIA IN THE INTESTINAL MICROBIOCENOSIS OF HIV-INFECTED CHILDREN

¹Kemerovo State Medical University, ²Kemerovo State University, ³Sechenov First Moscow State Medical University, ⁴Gabrichesky Moscow State Institute for Epidemiology and Microbiology, Russia

Aim. The purpose was to assess the species composition, virulence factors and the nature of the interaction of *Enterobacteria* with intestinal microsymbionts in HIV-positive children. *Material and methods.* The composition of intestinal microbiocenosis of 89 HIV-infected children (main group) and 74 children without HIV status (comparison group) was studied. 273 strains of *Enterobacteria* were isolated and identified to the species. The frequency and level of expression of adhesion, invasion, toxin formation and antagonism factors were studied. *Results.* In HIV-positive children colonization rate of intestinal mucosa *E. coli lac* — was 5 times higher, *E. coli hly+* 1.5 times higher than in the comparison group. The quantitative level of opportunistic enterobacteria increases with the aggravation of microecological disorders, 98% of enterobacteria forms a many-to-many association. Of these, 86.8% are neutral towards other symbionts. The frequency and level of production of adhesion, invasion and toxin formation factors did not differ in the compared groups. *Conclusion.* In HIV-infected children is formed enterobacteriales type microbiota. Biological properties of enterobacteria did not depend on the presence of HIV status in children.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 40—46

Key words: enterobacteria, HIV infection, microbiocenosis, properties, associations

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы все больше внимания уделяется кишечной микрофлоре ВИЧ-инфицированных пациентов. Связано это с тем, что ВИЧ-ассоциированные изменения кишечного микробиоценоза оказывают влияние на характер течения инфекции и прогрессирование заболевания [1, 2, 3]. Установлено, что *E.coli* индуцирует увеличение репликации ВИЧ [7], также у энтеробактерий повышается активность генов, ответственных за синтез липополисахарида (ЛПС) клеточной стенки [4]. Данный полимер, вследствие повышенной проницаемости кишечной стенки, попадает в кровоток и обуславливает хроническую иммунную активацию, что коррелирует со снижением уровня Т-лимфоцитов, развитием гипертонии [4, 8], ростом смертности пациентов [5, 6, 10]. В связи с этим, у пациентов с ВИЧ-статусом уровень ЛПС в кровотоке используется как показатель системной микробной транслокации. Увеличение соотношения представителей типа *Proteobacteria* к представителям рода *Bacteroides* используют как маркер прогрессирования ВИЧ-инфекции [5]. Данные о роли кишечных микросимбионтов в прогрессировании процесса, полученные на когортах взрослых пациентов, не дают представления о биологических свойствах кишечных микроорганизмов и их взаимодействии друг с другом. Это не позволяет оценить механизмы развития микрoэкологических нарушений и транслокации бактерий в кровеносное русло у ВИЧ-инфицированных пациентов с позиций ассоциативного бактериального симбиоза. Вовлечение в эпидемический процесс ВИЧ-инфекции детей, необходимость увеличения качества и продолжительности жизни предопределяет необходимость оценки у них состояния кишечного микробиоценоза, прежде всего состава и частоты колонизации представителями семейства *Enterobacteriaceae*. Актуальность исследования обусловлена также тем, что практически отсутствуют данные о вирулентных свойствах энтеробактерий, что затрудняет процесс коррекции микрoэкологических нарушений кишечника у данной категории пациентов [9]. Цель исследования — оценка видового состава, факторов вирулентности и характера взаимодействия энтеробактерий с кишечными микросимбионтами у детей с ВИЧ-инфекцией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследован качественный и количественный состав кишечного микробиоценоза 89 ВИЧ-инфицированных детей (основная группа) и 74 детей без ВИЧ-статуса (группа сравнения). Средний возраст детей основной группы составил 24 ± 2 месяца, из них 49 (55%) лиц мужского и 40 (45%) лиц женского пола. Средний возраст детей группы сравнения был 26 ± 4 месяца, из них лиц мужского пола — 39 (53%), женского — 35 (47%) человек. Сравнимые группы имели сходный социальный статус и пищевой характер. Исследование вели в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта исследования» (1975 г. с поправками от 2013 г). Оценку состояния кишечного микробиоценоза проводили согласно ОСТ «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (2003 г).

Выделены и идентифицированы до вида 273 штамма энтеробактерий, из них 150 — индигенных представителей кишечного микробиоценоза и 123 условно патогенных. Выделение энтеробактерий проводили с помощью количественного бактериологического метода на среде Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Идентификацию осуществляли на основании комплекса фенотипических свойств:

морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических. Способность утилизировать различные субстраты изучали с использованием коммерческих тест-систем ENTEROtest 24 (Lachema diagnostica s.r.o, Чехия), ПБДЭ (НПО «Диагностические системы», Россия) и СИБ для энтеробактерий набор № 2 (НПО «Микроген», Россия). У энтеробактерий изучены следующие факторы вирулентности: факторы адгезии (специфические и гидрофобность), колонизации, продукция ДНКазы, липазы, цитотоксина (гемолизина).

Изучение показателей специфической адгезии проводили по В.И. Брилису (1986). Исследование способности энтеробактерий продуцировать липазу и ДНКазу определяли на Tributyrin Agar Base (HIMEDIA, Индия) и DNA Base Agar (HIMEDIA, Индия) соответственно. Определение гемолитической активности микроорганизмов проводили на МПА с добавлением 5% взвеси эритроцитов человека.

Для статистического анализа использован программно-методический комплекс анализа данных IBM SPSS Statistics / PS IMAGO. Описательная статистика представлена относительными данными, выраженными в % и средними значениями признаков, выраженными в виде медианы с 25 и 75 перцентилями Me (LQ; UQ). Статистическая обработка информации строилась с учетом характера распределения данных, которое определяли с помощью построения гистограмм. Так как закон распределения исследуемых числовых показателей отличался от нормального, достоверность различий в парных независимых совокупностях определяли с помощью непараметрических критериев оценки достоверности (критерия U — Манна-Уитни, критерия χ^2). Для анализа связей между количественным уровнем энтеробактерий и степенью микрoэкологических нарушений кишечника применяли коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота обнаружения типичной кишечной палочки в кишечном микробиоценозе у детей сравниваемых групп не отличалась и составила 81% у ВИЧ-положительных пациентов и 97,3% у ВИЧ-негативных детей ($\chi^2=0,2$, $df=1$, $p=0,65$). Хотя у детей с ВИЧ-статусом регистрировали более высокий количественный уровень *E.coli lac+*, чем у здоровых детей — 8 (6; 8) lg КОЕ/г против 7 (6; 8) lg КОЕ/г, тем не менее полученная разница была статистически не значима ($U=1,22$; $p=0,22$). Однако, у ВИЧ-инфицированных детей регистрировали высокую частоту колонизации слизистой кишечника другими представителями семейства *Enterobacteriaceae*. В 20,2% случаев в кишечном микросимбиозе ВИЧ-положительных детей обнаруживали кишечные палочки со слабыми ферментативными свойствами, в 30,3% случаев гемолизин-продуцирующие эшерихии. У ВИЧ-негативных детей *E.coli lac-* колонизировали слизистую в 4,1% случаев ($\chi^2=148$, $df=1$, $p=0,001$), *E.coli hly+* в 22,9% ($\chi^2=0,7$, $df=1$, $p=0,8$). Количественные уровни кишечных палочек с измененными свойствами в основной группе составили 8 (6; 8) lg КОЕ/г и 7 (6; 8) lg КОЕ/г соответственно, а у ВИЧ-негативных детей количественные уровни были на один lg ниже и составили 7 (6; 7) lg КОЕ/г и 6 (5; 7) lg КОЕ/г соответственно ($U=2,21$; $p=0,03$). У 33,7% детей с ВИЧ-инфекцией в кишечнике вегетировали микроорганизмы рода *Klebsiella* со средней геометрической концентрацией 8 (7; 9) lg КОЕ/г. Однако, практически такие же показатели регистрировали и в группе сравнения. Частота колонизации клебсиеллами слизистой у них составила 37,8%, а средняя геометрическая концентрация — 8 (7; 8) lg КОЕ/г ($U=0,16$; $p=0,88$). В 90% случаев клебсиеллы у ВИЧ-инфицированных были представлены *K. pneumoniae* подвид *pneumoniae*, в 6,7% случаев *K. oxytoca* и в 3,3% случаев — *K. pneumoniae* подвид *ozaenae*. У детей группы сравне-

ния преобладающим видом также была *K. pneumoniae* подвид *pneumoniae* (71,4%), но доля *K. ozaenae* достигала 25%. В сравниваемых группах отмечали различия в плотности колонизации кишечника *K. pneumoniae* подвид *pneumoniae*. Количественный уровень *K. pneumoniae* подвид *pneumoniae* у детей с ВИЧ-статусом был в 10 раз выше, чем у ВИЧ-негативных детей — 9 (8; 10) lg КОЕ/г, против 8 (7; 8) lg КОЕ/г. Таким образом, полученные данные выявили отсутствие статистических различий по количественному содержанию типичных кишечных палочек в кишечнике детей с ВИЧ-инфекцией, но отмечается рост частоты и уровней колонизации слизистой условно патогенными энтеробактериями.

Кишечный микробиоценоз представляет собой систему, которая способна к саморегуляции путем изменения количественного содержания и активности индигенных бактерий, а также снижения уровня условно патогенных микросимбионтов. Для оценки способности микроэкологической системы кишечника при ВИЧ-инфекции к саморегуляции исследовали изменения титров энтеробактерий, в зависимости от степени микроэкологических нарушений. С увеличением глубины дисбактериоза в сравниваемых группах происходит разнонаправленное изменение содержания данных кишечных микросимбионтов. У ВИЧ-инфицированных детей средняя геометрическая концентрация типичных эшерихий падает с 8 (7; 9) lg КОЕ/г при I степени до 6 (4; 8) lg КОЕ/г при III степени микроэкологических нарушений ($r = -0,21$; $p=0,04$). У ВИЧ-негативных детей имеется тенденция к сохранению количественных уровней кишечных палочек, так как титры при I и III степени микроэкологических нарушений были сходными и составили 7 (6; 8) lg КОЕ/г ($r = 0,33$; $p = 0,06$). Установлено, что с увеличением степени микроэкологических нарушений независимо от ВИЧ-статуса имеется однонаправленная тенденция в отношении клебсиелл — их количественный уровень растет. При ВИЧ-инфекции содержание клебсиелл в кишечном содержимом при I степени дисбактериоза составило 6 (6; 7) lg КОЕ/г, при III увеличилось до 8 (7; 8) lg КОЕ/г ($r = 0,25$, $p=0,01$). У детей группы сравнения — 4 (4; 5) lg и 8 (8; 9) lg КОЕ/г соответственно, корреляционная связь между уровнем клебсиелл и степенью микроэкологических нарушений была статистически значима ($r = 0,45$, $p=0,0001$).

В кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных в 98,1% случае энтеробактерии формировали ассоциации с другими кишечными микросимбионтами. Ассоциации условно патогенных микросимбионтов у детей сравниваемых групп регистрировали при II и III степенях микроэкологических нарушений. Распространенность ассоциативных сожительств бактерий в группе детей с ВИЧ-статусом составила 91,6 на 100 ВИЧ-инфицированных детей [95% ДИ 86,5-92,2], в группе сравнения показатель был ниже — 82,4 на 100 здоровых детей [95% ДИ 80,2-84,4] ($\chi^2=0,81$, $df=1$, $p=0,77$).

У ВИЧ-инфицированных детей регистрировали высокую распространенность трехкомпонентных микробных ассоциаций — 44,6 на 100 ВИЧ-инфицированных детей [95 % ДИ 43,2-45,3]. Обращает на себя внимание, что у детей с ВИЧ-статусом регистрировали десять разновидностей трехкомпонентных микробных ассоциаций, причем в шесть из них входят представители семейства *Enterobacteriaceae*. Доминирующей была ассоциация *Enterobacteriaceae+Candida spp.+Staphylococcus spp.* (27%). Ассоциация *Staphylococcus spp.+Enterobacteriaceae+Enterobacteriaceae* занимала третье место в структуре трехкомпонентных сожительств микроорганизмов (10,8%) при ВИЧ-инфекции. У детей с ВИЧ-инфекцией также довольно часто микробные консорциумы включали четыре (22,9 на 100 ВИЧ-инфицированных детей [95% ДИ 19,2-23,1]) и пять (9,6 на 100 ВИЧ-инфицированных

[95% ДИ 8,8-10,1]) условно патогенных микросимбионтов. В состав шести из 7 разновидностей четырехкомпонентных микробных ассоциаций входили представители семейства *Enterobacteriaceae*. Чаще всего в 21% случаев у ВИЧ-инфицированных детей выделяли *Candida spp.*+*Staphylococcus spp.*+*Enterobacteriaceae*+*Enterobacteriaceae*. Только в группе ВИЧ-инфицированных детей в составе кишечного микробиоценоза были обнаружены пятикомпонентные ассоциации УПМ трех разновидностей. По 37,5% приходилось на ассоциацию *Candida*+*Enterobacteriaceae*+*Staphylococcus spp.*+*S. aureus*+*Enterococcus Hly+* и на *Enterobacteriaceae*+ *Enterobacteriaceae*+*Staphylococcus spp.*+*S.aureus*+*Enterococcus Hly+*. Третья разновидность пятикомпонентной ассоциации у ВИЧ-инфицированных детей включала *Candida*+*Enterobacteriaceae*+*Staphylococcus spp.*+*S.aureus*+*Actinomyces spp.*

В группе ВИЧ-негативных чаще обнаруживали двухкомпонентные микробные сожительства — 20,2 на 100 здоровых детей [95% ДИ 17,5-22,2]. Доминировала ассоциация *Candida*+*Staphylococcus* (40%). Распространенность трехкомпонентных ассоциативных сожительства составила 18,8 на 100 детей [95% ДИ 16,7-25,1]. Трехкомпонентные ассоциации, как и у ВИЧ-позитивных детей, были представлены 10 разновидностями микробных сожительства. Доминирующей была ассоциация *Candida spp.*+*Staphylococcus spp.*+*Enterobacteriaceae* (24,1%). Распространенность четырехкомпонентных микробных ассоциаций у детей группы сравнения практически не отличалась от ВИЧ-инфицированных и составила 18,9 на 100 здоровых детей [95% ДИ 17,4-19,1] ($p=0,83$), тогда как пятикомпонентные сожительства УПМ регистрировали только у 2,7 из 100 здоровых детей [95% ДИ 1,1-2,9] ($p=0,03$). Среди четырехкомпонентных ассоциаций доминировала *Candida spp.*+*Staphylococcus spp.*+*S. aureus*+*Enterobacteriaceae* (42,9%). Таким образом, у ВИЧ-инфицированных детей отмечается высокая распространенность многокомпонентных микробных ассоциаций (трехкомпонентных и пятикомпонентных). В 68% случаев в состав ассоциаций входят условно патогенные представители семейства *Enterobacteriaceae*.

Установлено, что в 86,8% случаев условно патогенные представители энтеробактерий проявляли нейтралισμό к микробам из ассоциаций. Распространенность антагонизма энтеробактерий в группе ВИЧ-инфицированных находилась на уровне 13,2 на 100 культур [95% ДИ 11,4-14,2]. В группе детей без ВИЧ-статуса данный показатель был схожим и составил 14,6 на 100 культур [95% ДИ 13,5-15,4] ($\chi^2=0,78$, $df=1$, $p=0,82$). Чаще всего энтеробактерии-оппортунисты вступали в антагонистические отношения с кокковой флорой, таковых от ВИЧ-инфицированных детей было 11,3% штаммов, в группе сравнения 12,5%. Сами энтеробактерии испытывали антагонизм со стороны доминирующей бифидофлоры. Распространенность антагонизма бифидобактерий по отношению к *E.coli lac+* в сравниваемых группах была сходной: 60,3 на 100 культур бифидобактерий в группе ВИЧ-инфицированных [95% ДИ 54,5-70,8] и 68,1 на 100 культур в группе ВИЧ-отрицательных детей [95% ДИ 62,4-75,5] ($\chi^2=1,6$, $df=1$, $p=0,7$). Однако у ВИЧ-позитивных детей бифидобактерии с условно патогенными энтеробактериями формировали антагонистические взаимоотношения реже. В группе с ВИЧ-статусом распространенность антагонизма бифидофлоры к энтеробактериям составила 55,2 на 100 культур [95% ДИ 45,6-56,7], у детей группы сравнения 82,9 на 100 культур [95% ДИ 78,3-85,6] ($\chi^2=15,2$, $df=1$, $p=0,01$). Частота антагонизма бифидобактерии к представителям рода *Klebsiella* от ВИЧ-позитивных детей была в 3 раза ниже, чем у детей группы сравнения (5% против 18,4%). Это согласуется с приведенными данными о высокой частоте и уровне колонизации данными микросимбионтами кишечника у ВИЧ-инфицированных детей.

Установлено отсутствие статистически значимых отличий по адгезивной активности энтеробактерий ($U=0,68$, $p=0,49$). Чаще всего энтеробактерии от ВИЧ-инфицированных детей проявляли среднюю (41,5%) или низкую (35,8%) способность к адгезии, высокоадгезивных штаммов от ВИЧ-позитивных детей было только 22,6%. Индексы адгезии микроорганизмов (ИАМ) составили 3,2 (3,0; 3,81), 2,1 (1,8; 2,5), 5,4 (5,1; 5,7) соответственно. Энтеробактерии от ВИЧ-негативных детей в 52,1% случаев были отнесены к среднеадгезивным культурам. Как и в группе ВИЧ-инфицированных, у здоровых детей низкой способностью к адгезии обладали 35,4% культур энтеробактерий. Высокоадгезивными были только 12,5% штаммов. Показатели индексов адгезии микроорганизме составили 3,5 (3,2; 3,6), 2,1 (2,0; 2,4), 5,1 (4,9; 7,6) соответственно.

Кроме адгезинов, факторы вирулентности энтеробактерий были представлены гемолизинами и липазой. В группе ВИЧ-позитивных детей липазной активностью обладали 13,2% штаммов, тогда как среди штаммов, изолированных от ВИЧ-негативных детей, таковых было 14,6% ($\chi^2=0,76$, $df=1$, $p=0,67$). Уровень экспрессии липазы сравнивали по величине зоны гидролиза трибутирата, образующейся вокруг колоний. В среднем данный показатель у штаммов от ВИЧ-инфицированных детей составил 7,7 (6,8; 8,1) мм, от детей группы сравнения 4,1 (3,6; 4,5) мм ($U=0,26$; $p=0,79$). Гемолитической активностью обладали 49,1% штаммов энтеробактерий от ВИЧ-позитивных детей и 35,4% от детей группы сравнения. При этом количество выделенного гемолизина в сравниваемых группах не различалось, так как величины зон гемолиза вокруг колоний составили 3,6 (2,8; 4,3) мм и 4,1 (3,5; 4,6) мм соответственно ($U=0,31$, $p=0,63$). Таким образом, частота и уровень экспрессии ферментов инвазии и гемолизина у энтеробактерий, изолированных от детей с ВИЧ-инфекцией, не отличается от группы сравнения.

Энтеробактерии по значимости для ВИЧ-инфицированных больных занимают особое место. Ряд исследований свидетельствует, что в кишечном микробиоценозе при ВИЧ-инфекции повышается удельный вес как индигенных энтеробактерий, так и условно патогенных [7]. Наши исследования показали, что частота и уровень колонизации слизистой типичными кишечными палочками у ВИЧ-инфицированных детей не отличались от аналогичных показателей у детей без ВИЧ-статуса. При усугублении степени микрoэкологических нарушений количественное содержание лактозопозитивных эшерихий у ВИЧ-позитивных детей снижается, тогда как у здоровых детей не изменяется. Полученные данные отражают разную адаптивную способность кишечного микробиоценоза в сравниваемых группах детей. *E.coli lac+* является облигатным обитателем кишечного микробиоценоза, поэтому у здоровых детей сохранение их количества направлено на поддержание общего содержания доминантной микрофлоры и предупреждение колонизации слизистой факультативными бактериями. У ВИЧ-инфицированных детей механизмы стабилизации кишечного микрoэкологического равновесия нарушены, поэтому наблюдается снижение титров *E.coli lac+*.

При ВИЧ-инфекции отмечается высокое содержание в кишечном микробиоценозе условно патогенных энтеробактерий — *E.coli lac-* и *E.coli hly+*, при этом частота колонизации эшерихиями со слабыми ферментативными свойствами была в 5 раз выше, чем у ВИЧ-негативных детей ($p=0,001$). При увеличении глубины микрoэкологических нарушений, независимо от ВИЧ-статуса, количественный уровень условно патогенных энтеробактерий нарастает, особенно титры клебсиелл. Это отражает общие закономерности развития дисбиотических нарушений, которые характеризуются снижением количественного содержания индигенных и ростом числа условно

патогенных микроорганизмов, но микроэкологические сдвиги у детей с ВИЧ-статусом они более выражены. Условно патогенные энтеробактерии у них формируют многокомпонентные ассоциации. Установлено, что у ВИЧ-инфицированных детей отмечается высокая распространенность трех и пятикомпонентных микробных ассоциаций, в состав которых входят условно патогенные энтеробактерии. В ассоциациях энтеробактерии в большинстве случаев проявляют нейтралισμό и только 11% вступают в антагонизм по отношению к кокковой флоре. Аналогичные показатели были зарегистрированы в отношении энтеробактерий у детей без ВИЧ-статуса. Рост в кишечнике числа условно патогенных энтеробактерий при ВИЧ-инфекции, вероятно, обусловлен снижением частоты антагонизма доминантной бифидофлоры, так как распространенность данного признака у бифидобактерий ВИЧ-инфицированных детей была в 1,5 раза ниже, чем в группе сравнения.

Несмотря на высокую распространенность вторичных инфекций у ВИЧ-позитивных пациентов, вызванных условно патогенными энтеробактериями, различий в частоте и уровнях продукции факторов адгезии, инвазии и токсинообразования выявлено не было. Вероятнее всего, в основе транслокации микроорганизмов через слизистую лежат иные механизмы, нежели продукция факторов патогенности бактериями, например, иммунологические события, связанные со снижением уровня мукозальных Th 17, или дефекты слизистой вследствие репродукции вируса, тогда как факторы инвазии представителей семейства *Enterobacteriaceae* играют второстепенную роль.

ЛИТЕРАТУРА

1. Керимли Ф.И., Воробьева Ю.И., Козлов А.Е. и др. Микробиота кишечника при ВИЧ-инфекции. Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2017, 6 (7): 10-13.
2. Пузырева Л.В., Родькина Л.А., Мордык А.В. и др. Анализ инфекций нижних дыхательных путей с исследованием микробного пейзажа материала у ВИЧ-инфицированных пациентов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018, (1): 76-84.
3. Boulougoura A., Sereti I. HIV infection and immune activation: the role of coinfections. Current Opinion in HIV and AIDS. 2016, 11(2): 191-200. doi: 10.1097/coh.0000000000000241.
4. Burgener A., McGowan I., Klatt N.R. HIV and mucosal barrier interactions: consequences for transmission and pathogenesis. Current Opinion in Immunology. 2015, 36: 22-30. doi: 10.1016/j.coi.2015.06.004.
5. Dubourg G., Surenaud M., Lévy Y. et al. Microbiome of HIV-infected people. Microbial Pathogenesis. 2017, 106: 85-93. doi: 10.1016/j.micpath.2016.05.015.
6. Goedert J.J. Effects of HIV, immune deficiency, and confounding on the distal gut microbiota. EBioMedicine. 2016, 5: 14-15. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.01.034.
7. Monaco C.L., Gootenberg D.B., Zhao G. et al. Altered virome and bacterial microbiome in Human immunodeficiency virus-associated acquired immunodeficiency syndrome. Cell Host and Microbe. 2016, 19(3): 311-322. doi: 10.1016/j.chom.2016.02.011.
8. Paquin-Proulx D., Ching C., Vujkovic-Cvijin I. et al. *Bacteroides* are associated with GALT iNK T cell function and reduction of microbial translocation in HIV-1 infection. Mucosal Immunology. 2016, 10(1): 69-78. doi: 10.1038/mi.2016.34.
9. Patel A.R., Shaha N.P., Prajapatia J.B. Immunomodulatory effects of probiotics in the treatment of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Biomedicine and Preventive Nutrition. 2014, 4(1): 81-84. doi: 10.1016/j.bionut.2013.04.003.
10. Yilmaz C., Gokmem V. Determination of tryptophan derivatives in kynurenine pathway in fermented foods using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Chemistry. 2018, 243: 420-427. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.004.

Поступила 04.06.19

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

ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК СВЕЖЕВЫДЕЛЕННЫМИ И ВАКЦИННЫМИ ШТАММАМИ *BORDETELLA PERTUSSIS* РАЗНЫХ СЕРОВАРОВ

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

Цель. Изучение формирования биопленок свежeweыделенными и вакцинными штаммами *B. pertussis* разных сероваров. *Материалы и методы.* Интенсивность образования биопленок штаммами *B. pertussis* в круглодонных полистироловых 96-луночных планшетах при использовании трех посевных доз микробных клеток (1,25 МОЕ/мл, 2,5 МОЕ/мл, 5,0 МОЕ/мл) оценивали окрашиванием 0,1% раствором генциан-фиолетового. Результаты интерпретировали после измерения оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя при длине волны 600 нм. *Результаты.* Наибольшей интенсивностью образования биопленок обладали свежeweыделенный штамм № 211 и вакцинный штамм № 475, оба относящиеся к серовару 1.2.3. Культуры этих штаммов формировали плотные биопленки при всех посевных дозах микробных клеток. Определенные различия по интенсивности биопленкообразования выявлены между свежeweыделенными и вакцинными штаммами сероваров 1.2.0 и 1.0.3, особенно выраженные при использовании посевной дозы в 5,0 МОЕ/мл. Свежeweыделенные штаммы при этой посевной дозе формировали плотные биопленки, в то время как два из трех вакцинных штаммов формировали умеренные биопленки, а один штамм — плотные. *Заключение.* Выявленные различия между штаммами *Bordetella pertussis* по интенсивности образования биопленок могут быть связаны с особенностями экспрессии агглютиногенов, а также других поверхностных структур микробных клеток, участвующих в процессе адгезии на субстрате.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 47—50

Ключевые слова: штаммы *B. pertussis*, биопленки, агглютиногены, факторы адгезии

Е.М.Zaytsev, M.V.Britsina, M.N.Ozeretskoykaya, N.U.Mertsalova, I.G.Bazhanova

THE BIOFILM FORMATION OF FRESHLY ISOLATED AND VACCINE STRAINS OF *BORDETELLA PERTUSSIS* OF DIFFERENT SEROTYPES

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. To study the formation of biofilms by freshly isolated and vaccine strains of *Bordetella pertussis* of different serotypes. *Materials and methods.* The intensity of biofilm formation by *B. pertussis* strains in 96-well round-bottom polystyrene plates by using three sowing doses of microbial cells (1,25 IOU/ml, 2,5 IOU/ml and 5,0 IOU/ml) was estimated by staining with 0,1% gentian-violet solution. The results were interpreted after measuring the optical density (OP) of the colored solvent at a wavelength of 600 nm. *Results.* The highest intensity of biofilm formation was found in the newly isolated strain No. 211 and vaccine strain No. 475, both belonging to serotype 1.2.3. Cultures of these strains formed dense biofilms at all sowing doses of microbial cells. Certain differences in the intensity of biofilm formation were found between freshly isolated and vaccine strains of serotypes 1.2.0 and 1.0.3, especially when using a sowing dose of 5,0 IOU/ml. Freshly isolated strains at this dose formed dense biofilms, while two of the three vaccine strains formed moderate biofilms, and one strain was dense. *Conclusion.* The revealed differences between the strains of *B. pertussis* in the intensity of biofilm formation may be associated with the peculiarities of the expression of agglutinogens, as well as other surface structures of microbial cells involved in the adhesion process on the substrate.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 47—50

Key words: *B. pertussis* strains, biofilms, agglutinogens, adhesion factors

ВВЕДЕНИЕ

Коклюшная инфекция продолжает оставаться актуальной проблемой здравоохранения. С начала 1990-х годов во многих странах мира, в том числе в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками, отмечается рост заболеваемости коклюшем [11].

Одной из вероятных причин роста заболеваемости коклюшем являются мутации в генах возбудителя, кодирующих основные факторы вирулентности *B. pertussis*, что привело к появлению циркулирующих штаммов, отличающихся повышенной вирулентностью [3]. Одним из возможных факторов высокой вирулентности циркулирующих штаммов *Bordetella pertussis* может быть их повышенная способность к формированию биопленок. Образование биопленок является результатом сложного координированного взаимодействия микробных клеток с биотическими и абиотическими субстратами. У неподвижных бактерий, к которым относится *B. pertussis*, закрепление микробных клеток на поверхности происходит с помощью адгезинов [5]. К факторам адгезии *B. pertussis* относятся пертактин, филаментозный гемагглютинин, фактор колонизации трахеи и связанные с фимбриями агглютиногены [6]. В доступной литературе имеются отдельные указания на более высокую, по сравнению с вакцинными штаммами, способность циркулирующих штаммов к образованию биопленок [10], однако способность коклюшного микроба формировать биопленки на биотических и абиотических субстратах, значение факторов адгезии и, в частности, агглютиногенов в этом процессе изучены до настоящего времени недостаточно.

Цель работы заключалась в изучении способности образования биопленок вакцинными и свежевыделенными штаммами *B. pertussis* разных сероваров

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали две группы штаммов *B. pertussis*. Первую группу составили вакцинные штаммы, выделенные от больных коклюшем в 50 — 60 годы XX века, используемые в России для изготовления коклюшных вакцин [1]: штамм № 475 (серовар 1.2.3), штамм № 305 (серовар 1.2.0), штамм № 703 (серовар 1.0.3). В эту группу также был включен штамм Tohama 1 (серовар 1.2.0), выделенный в 50-е годы XX века в Японии и широко используемый в ряде стран при проведении генетических исследований и производства коклюшных вакцин [9]. Вторую группу представляли штаммы, выделенные в РФ от больных коклюшем в 2001 — 2010 гг.: штамм № 178 (серовар 1.2.0), штамм № 162 (серовар 1.0.3) и штамм № 211 (серовар 1.2.3). В качестве инокулята для получения биопленок использовали ночные культуры штаммов, выращенных на плотной питательной среде («Бордетелагар», ФБУН ГНЦПМБ, г.Оболенск). Биопленочные формы культивировали в круглодонных 96-луночных пластиковых планшетах в жидкой синтетической питательной среде в соответствии с ранее описанным методом [4]. Интенсивность образования биопленок при использовании трех посевных доз микробных клеток (1,25 МОЕ/мл, 2,5 МОЕ/мл и 5 МОЕ/мл) оценивали после растворения окрашенных 0,1% раствором генциан-фиолетового биопленок. Результаты показателей ОП окрашенного растворителя по отношению к негативному контролю (0,048) оценивали как плотные (>0,192), умеренные (0,096 > ~ < 0,192), слабые (0,048 < ~ < 0,096), отсутствие биопленок.

Для достоверного подсчета результатов использовали 4 лунки на один опытный образец и рассчитывали среднюю величину оптической плотности опытного образца и удвоенную ошибку. Сравнения проводили по критерию Стьюдента [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено сравнительное изучение способности формирования биопленок культурами вакцинных и свежевыделенных штаммов *B. pertussis* с различными наборами агглютиногенов.

Результаты опытов выявили определенные различия между интенсивностью образования биопленок культурами разных штаммов *B. pertussis*.

Вакцинный штамм Tohama 1 (1.2.0) формировал умеренные биопленки при всех использованных посевных дозах. Вакцинный штамм № 703 (1.0.3) формировал слабые биопленки при посевной дозе 1,25 МОЕ/мл и умеренные при дозах 2,5 и 5,0 МОЕ/мл. Вакцинный штамм № 305 (1.2.0) формировал умеренные биопленки при дозах 1,25 МОЕ/мл и 2,5 МОУ/мл и плотные при дозе 5,0 МОЕ/мл. Вакцинный штамм №475 (1.2.3) формировал плотные биопленки при всем диапазоне посевных доз микробных клеток. Свежевыделенные штаммы №178 (1.2.0) и №162 (1.0.3) формировали умеренные биопленки при дозах 1,25 МОЕ/мл и 2,5 МОЕ/мл а при дозе 5,0 МОЕ/мл — плотные биопленки. Свежевыделенный штамм №211 (1.2.3) формировал плотные биопленки в диапазоне посевных доз от 1,25 МОЕ/мл до 5 МОЕ/мл.

Таким образом, наибольшей интенсивностью образования биопленок отличались вакцинный штамм № 475 и свежевыделенный штамм № 211. Культуры этих штаммов формировали плотные биопленки при всех посевных дозах микробных клеток. Необходимо отметить, что эти штаммы относятся к серовару 1.2.3, то есть имеют все три основных агглютиногена. Агглютиногены являются поверхностными белками микробной клетки, антитела к которым вызывают феномен агглютинации. У *B. pertussis* имеется 10 агглютиногенов: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 13, 15 и 16. Агглютиноген 7 является общим для всех представителей рода *Bordetella*, а агглютиноген 1 видовым для *B. pertussis*. Агглютиногены 1, 2 и 3 используются для идентификации разных штаммов и принадлежности их к определенному серовару. Сочетания этих агглютиногенов определяют три основных серовара возбудителя: 1.2.0, 1.2.3 и 1.0.3 [6, 8]. Микробные клетки *B. pertussis* имеют фимбрии, состоящие из двух основных субъединиц — Fim 2 и Fim3, соответствующих агглютиногенам 2 и 3, и малой субъединицы Fim D. Наряду с филаментозным гемагглютинином и другими адгезинами фимбрии принимают участие в процессе адгезии микробных клеток на субстрате [7]. Высокая интенсивность образования биопленок штаммами № 475 и № 211 может быть связана с наличием у них Fim 2 и Fim3, что обеспечивает более эффективное прикрепление микробных клеток к субстрату.

Определенные различия по интенсивности биопленкообразования выявлены между вакцинными и свежевыделенными штаммами сероваров 1.2.0 и 1.0.3, особенно выраженные при использовании посевной дозы в 5 МОЕ/мл. Свежевыделенные штаммы при этой дозе формировали плотные биопленки, в то время как из трех вакцинных штаммов два штамма формировали при этой посевной дозе умеренные биопленки, а один штамм плотные. Различная интенсивность образования биопленок вакцинными и свежевыделенными штаммами может быть связана с особенностями экспрессии других поверхностных структур микробных клеток, участвующих в процессе адгезии на субстрате и межклеточных взаимодействиях (пертактин, филаментозный гемагглютинин, фактор колонизации трахеи). Полученные данные указывают на целесообразность дальнейших исследований особенностей биопленкообразования штаммами *B. pertussis* с различными генотипическими характеристиками, что может способствовать расширению представлений о патогенезе коклюша и совершенствованию вакцинопрофилактики этой инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева И.А., Чупринина Р.П., Борисевич И.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика производственных штаммов коклюшных бактерий. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013, 3(70):63-70.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. В кн.: «Статистические методы в микробиологических исследованиях». Л., 1962.
3. Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С. и др. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016, 4(89): 22-28.
4. Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская Н.У. и др. Культивирование биопленок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. *Журн. микробиол.* 2019, 1:49-53.
5. Романова Ю. М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. *Журн. микробиол.* 2011, 3: 99-109.
6. Ценева Г.Я., Курова Н.Н. Микробиологическая характеристика возбудителя коклюша и лабораторная диагностика коклюша. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2003, 4(5):329-341.
7. Ashworth L.A.E., Irons L.I., Dowsett A.B. Antigenic relationship between serotype specific agglutinin and fimbriae of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 1982, 37:1278-1281.
8. Bronne-Shanbury C.J., Dolby J.M. The stability of the serotypes of *Bordetella pertussis* with particular reference to serotype 1,2,3,4. *J. Hyg. (Lond)*. 1976, 76(2):277-286.
9. Caro V., Bouchez V., Guiso N. Is the Sequenced *Bordetella pertussis* Strain Tohama I Representative of the Species? *J. of Clinical Microbiology*. 2008, 46 (6):2125-2128.
10. Cattelan N., Jennings-Gee J., Dubey P. et al. Hyperbiofilm Formation by *Bordetella pertussis* Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. *Infect Immun.* 2017, 85(12): e00373-17.
11. Kapil P., Merkel T.J. Pertussis vaccines and protective immunity. *Curr Opin Immunol.* 2019, 8 (59):72-78.

Поступила 22.06.19

Контактная информация: Зайцев Евгений Михайлович, д.м.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер, 5а, р.т.(495)916-22-63

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

В.Г.Акимкин¹, Ю.А.Захарова², Е.П.Игонина³, Е.В.Болгарова²

НОЗОКОМИАЛЬНЫЕ РЕСПИРАТОРНЫЕ ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

¹Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; ²Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций;
³Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва

Проведен анализ данных зарубежной литературы из поисковой базы данных PubMed за 10-летний период о распространенности нозокомиальных респираторных вирусных инфекций (НРВИ). Установлена необходимость использования при оценке частоты встречаемости стан-

дартного определения случая и лабораторной панели на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции. В целом, выявлено преобладание в этиологической структуре риновирусов. Обоснована актуальность внедрения в работу неспецифических противоэпидемических мероприятий в отношении широкого спектра других респираторных патогенов, в числе которых наибольшую актуальность имели респираторно-синцитиальные вирусы, метапневмовирусы, аденовирусы, вирусы гриппа и парагриппа, коронавирусы. К редким видам были отнесены боксавирусы и мимивирусы. Биологическое разнообразие патогенов, вызывающих НРВИ, диктует необходимость активного внедрения в работу лабораторной службы медицинских учреждений методов молекулярной генетики с целью качественной этиологической диагностики, разработки и реализации схем адекватной противовирусной терапии, а также эффективных программ профилактики, реализация которых позволит существенно снизить риск распространения этих инфекций и экономические затраты.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 50—61

Ключевые слова: нозокомиальные вирусные инфекции, респираторные патогены, этиологическая диагностика, стандартное определение случая, профилактические мероприятия.

V.G.Akimkin¹, Yu.A.Zakharova², E.P.Igonina³, E.V.Bolgarova²

NOSOCOMIAL RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS: STATE OF THE PROBLEMS

¹Central Institute of Epidemiology, Moscow; ²Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections; ³Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia

We scanned the PubMed search database for literature on the incidence of nosocomial respiratory viral infections (NRVI) published over a ten-year period. Necessity to apply the standard case definition and the laboratory panel based on the multiplex polymerase chain reaction in frequency assessment was established. In general, predominance of rhinoviruses in the etiological structure was detected. Rationale was given for introduction of nonspecific epidemic prevention activities against a broad spectrum of other respiratory pathogens including high-priority respiratory syncytial viruses, metapneumoviruses, adenoviruses, influenza and parainfluenza viruses and coronaviruses. Bocaviruses and mimiviruses were designated as rare species. The biological diversity of the pathogens causing NRVI calls for active promotion of molecular genetics techniques in the work of the laboratory services of health facilities to perform quality etiological diagnosis, design relevant antiviral therapy regimens and effective prevention programs whose implementation will lead to significant reduction in the spread risk of these infections and the treatment costs.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 50—61

Key words: nosocomial viral infections, respiratory pathogens, etiological diagnosis, standard case definition, preventive activities

За 10-летний период (с 2008 по 2017 год) в базе данных PubMed при поисковом запросе «nosocomial respiratory viral infection» было найдено в среднем по 32 публикации в год, посвященных нозокомиальным респираторным вирусным инфекциям (НРВИ) [22]. Однако, литературные источники, позволяющие оценить истинный масштаб данной проблемы в отдельном медицинском учреждении, немногочисленны. Как известно, на результат расчета кумулятивной инцидентности влияет выбор критериев, составляющих эпидемиологическое стандартное определение случая инфекции. Сложность оценки данного показателя по НРВИ обусловлена различными подходами и рядом объективных причин: отсутствием стандартизованного реестра возбудителей НРВИ; невысокой аналитической надежностью традицион-

ных серологических методов обнаружения вирусов; накоплением новых данных о спектре возбудителей, ассоциированных с НРВИ. Так, в США для подтверждения случая НРВИ у госпитализированных лиц с симптомами острого респираторного заболевания (ОРЗ) рекомендовано использовать стандартное определение случая нозокомиальной инфекции и диагностическую панель на основе мультиплексной ПЦР с технологией флуоресцирующих микросфер [13]. Лабораторная панель рассчитана на определение вирусов гриппа А (генов общего матриксного белка, H1, H3, H1N1-2009), аденовирусов, общего фрагмента генома энтеровирусов и риновирусов (в США положительный результат без расшифровки относят к риновирусам), коронавирусам (NL63, HKU1, 229E, OC43), респираторно-синцитиальных вирусов А и В, вирусов парагриппа (1, 2, 3, 4 типа), метапневмовирусов, бокавирусов.

Установленный случай НРВИ определяют как наличие признаков инфекции дыхательных путей у пациента с положительным результатом лабораторного тестирования, у которого время, прошедшее с момента поступления в стационар до появления первых симптомов заболевания, превышало верхнюю границу инкубационного периода. Вероятный случай НРВИ расценивают как заболевание, возникшее у пациента в пределах верхней границы инкубационного периода. Пациент может быть включен в расчет повторно, если в период пребывания в стационаре наблюдалось полное исчезновение симптомов, а затем их новое появление. Если второй эпизод был вызван другим вирусом, то случай НРВИ считался установленным, если аналогичным вирусом — вероятным.

В ретроспективном исследовании, проведенном в 2015 году, Chow E.J. and Mermel L.A. [11] описан пример такого комплексного подхода к изучению заболеваемости НРВИ в университетском госпитале (США). В результате за год было выявлено 40 случаев НРВИ (32 установленных и 8 вероятных) у 38 пациентов, из которых 17 случаев — в госпитале для взрослых и 23 — в госпитале для детей. Ни у кого из взрослых с НРВИ не наблюдалось рвоты или конъюнктивита, в то время как данные симптомы наблюдались в 15% и 2,5% случаев среди детей. Этиологическая структура НРВИ, часть из которых носила сочетанный характер, была представлена: риновирусами/энтеровирусами (без расшифровки) — 25 случаев (57%); респираторно-синцитиальными вирусами — 6 (14%); метапневмовирусами — 4 (9%); вирусами гриппа А — 3 (6,8%); аденовирусами — 3 (6,8%); коронавирусами — 2 (4,5%); вирусами парагриппа — 1 (2,3%). Вирусы гриппа В обнаружены не были. Таким образом, в этиологической структуре НРВИ доминировали риновирусы/энтеровирусы как среди взрослых — 11 (61%), так среди детей — 14 (54%). Доля вирусов гриппа А и В оказалась незначительной. Инцидентность составила 5 на 10000 поступивших в стационар пациентов за год у взрослых и 44 — у детей. Авторы публикации обратили внимание на то, что показатели инцидентности НРВИ у детей устойчиво (на порядок) превышали аналогичные показатели у взрослых (44 и 5) и практически совпали с результатами, опубликованными в США в 1980 году (55 и 4 соответственно) [53].

Sidler J.A. et al. [52] в Университетском детском госпитале в Базеле (Швейцария) использовали панель диагностических тестов для определения респираторных вирусов (грипп А и В, парагрипп, респираторно-синцитиальный вирус, аденовирус, коронавирус, метапневмовирус, риновирус) и рассчитали показатель инцидентности НРВИ, составивший 1,3 случая на 1000 пациенто-дней. В этиологической структуре преобладали риновирусы — 73% (22 из 30 случаев). Применение современных молекулярно-генетических методов исследования и стандартного определения случая нозокомиальной инфекции выявило более высокий показатель инцидентности НРВИ среди детей, поступающих в стационары неотложной помощи (acute-care hospitals).

Таким образом, анализ этиологической структуры НРВИ установил доминирующую роль Rhinovirus, в связи с чем, этиологическая диагностика НРВИ в период сезонного подъема заболеваемости по мнению авторов не должна ограничиваться вирусами гриппа.

При анализе публикаций представлены особенности эпидемического процесса с участием некоторых актуальных возбудителей НРВИ.

Риновиролы. Louie J.K. et al. [36] установили, что в 2003 году в течение 6-недельного периода в пансионате для престарелых (США) наблюдались респираторные заболевания у 56 пациентов и у 26 лиц из числа обслуживающего персонала. Распространение инфекции среди персонала характеризовалось высокой кумулятивной инцидентностью (attack rate) [2]. У 12 постояльцев исход инфекции был летальным. В 7 из 13 образцов секционного материала на культуре клеток были обнаружены риновирусы, 6 изолятов из них идентифицированы как риновирус А82. Другие респираторные вирусы и бактериальные патогены обнаружены не были. Wald T.G. et al. [58] описали эпидемическую вспышку риновирусной инфекции в пансионате для ветеранов (Италия). В период с 14.08.1993 г. по 02.09.1993 г. выявлено 67 заболевших пациентов, в образцах из носоглотки которых (33 смыва) выделен риновирус. Все заболевшие имели симптомы поражения верхних отделов дыхательных путей, 71% — симптомы системного воспаления, 66% — поражения нижних дыхательных путей, 52% — симптомы при аускультации легких, 34% — гастроинтестинальные симптомы. У 17 инфицированных, имевших в анамнезе хронические обструктивные заболевания легких, наблюдалось ухудшение течения основного заболевания, один из пациентов скончался от дыхательной недостаточности, несмотря на проводившееся лечение.

Hicks L.A. et al. [20] описали эпидемическую вспышку риновирусной инфекции в двух пансионатах для престарелых лиц в штате Пенсильвания (США). В учреждении А из 170 постояльцев 40 заболели респираторным заболеванием, у 13 из них рентгенологически подтверждена пневмония, 15 — переведены в стационар, 2 — скончались. В образцах биоматериалов от 10 пациентов в 4 случаях методом ПЦР с обратной транскрипцией был обнаружен риновирус. В учреждении В из 124 постояльцев 77 заболели респираторным заболеванием, у 40 — рентгенологически подтверждена пневмония, 12 — переведены в стационар, 5 — скончались. В образцах биоматериалов у 6 пациентов из 19 методом ПЦР был обнаружен риновирус.

Результаты исследований, представленные выше, позволили с высокой долей вероятности предположить, что внедрение молекулярно-генетических методов диагностики НРВИ позволит точнее выявить связь риновирусов с клиническими формами ринита и тяжелыми случаями ОРЗ вирусной этиологии в организациях здравоохранения и учреждениях социальной защиты.

Респираторно-синцитиальные вирусы. Эпидемические вспышки НРВИ, вызванные респираторно-синцитиальными вирусами (РСВ), были описаны уже вскоре после открытия данных возбудителей в 1956 году [5,24]. У взрослых и детей клинические проявления инфекции обычно ограничиваются диагнозом «простуда», однако у недоношенных или ослабленных детей, пожилых лиц и лиц с иммунодефицитами РСВ могут вызвать бронхолит или пневмонию.

РСВ-инфекции характеризуются высокой контагиозностью. В исследовании Lindsley W.G. et al. [33] было установлено, что 32% образцов воздуха, отобранных из стационарных точек в клинике неотложной медицинской помощи Университета Западной Вирджинии (Моргантаун), содержат РНК РСВ. Двухступенчатые циклонные аэрозольные пробоотборники, разделяющие частицы аэрозоля на три фракции,

размещали попарно в штативах на высоте 152 см («верхний штатив») и 102 см («нижний штатив»). Интервал между исследованиями составлял 4-5 часов, длительность эксперимента — 11 дней. В образцах определяли РНК РСВ методом ПЦР в режиме реального времени. Особого внимания заслуживает факт обнаружения РНК РСВ в частицах аэрозоля размером <4,1 мкм (четверть всех положительных проб), что свидетельствует о возможности длительного присутствия вируса в воздухе учреждения и его последующего попадания в нижние отделы дыхательных путей.

РСВ считают одной из ведущих причин заболеваний нижних отделов дыхательных путей у детей во всех странах мира [28]. Разными авторами сообщалось о НРВИ, связанных с РСВ в блоках интенсивной терапии новорожденных и в детских палатах стационаров. Maille L. et al. [40] изучали НРВИ, вызванные РСВ в детских палатах Университетского госпитального центра в Пуатье (Франция) в период с октября 1996 по сентябрь 1998 года. РСВ-инфекцию считали нозокомиальной, если она возникала после 7 суток пребывания пациента в госпитале и в носоглоточных аспиратах иммунофлуоресцентным методом был обнаружен вирус. В ходе исследований было установлено, что из 224 случаев РСВ-инфекции были обусловлены субтипом В — 49,5%, субтипом А (эпидемические штаммы) — 44,9%, в том числе 5 случаев (2,2%) отнесены к нозокомиальным. Продолжительность пребывания пациентов при внебольничной РСВ-инфекции составила 4,8 суток, при нозокомиальной — 38,8, что свидетельствовало о тяжелом течении инфекционного процесса. Berner R. et al. [6] опубликовали результаты ретроспективного наблюдения за случаями НРВИ, обусловленными РСВ в Университетском детском госпитале во Фрайбурге (Германия) в период с января 1988 по декабрь 1997 года. Всего в группе наблюдения из 1064 пациентов был зарегистрирован 1171 эпизод заболевания, исследовано 1664 образцов биоматериала. Частота нозокомиальной РСВ-инфекции составила 38%.

Macartney K.K. et al. оценили затраты на реализацию программы, направленную на снижение заболеваемости нозокомиальными РСВ-инфекциями [37]. Исследования проведены в 304-коечном детском госпитале в Филадельфии (США). Программа предусматривала раннее выявление пациентов с симптомами респираторного заболевания, лабораторное подтверждение РСВ, выявление групп риска среди пациентов и медицинского персонала, использование барьерных методов (халаты, перчатки, маски), обучение сотрудников. Заболеваемость РСВ изучали ретроспективно, глубина исследований составила 8 лет. Стратифицированные показатели рассчитывали до и после внедрения программы инфекционного контроля, включая плотность кумулятивной инцидентности в расчете на 1000 пациенто-дней. Затраты на внедрение программы складывались из цены на лабораторные исследования, изоляционно-ограничительные мероприятия и управленческие решения. Стоимость стандартного случая нозокомиальной РСВ-инфекции определяли путем сравнения материальных затрат на лечение пациентов с РСВ и пациентов без РСВ (выборочная совокупность по 30 человек в каждой группе). В результате исследований установлено, что внутрибольничный характер инфицирования РСВ имел место у 148 пациентов (88 случаев до внедрения программы, 60 случаев — после). Стратифицированный показатель относительного риска по Mantel-Haenszel до и после внедрения программы соответствовал 61 (95% доверительный интервал 53 — 69). Расчет относительного риска развития инфекции при ожидаемой оценочной величине 100 и наблюдаемой величине 60 дал величину оценки эффективности программы, как 10 предотвращенных за сезон случаев РСВ-инфекции. При этом суммарная стоимость программы за сезон составила 15627 USD или 1563 USD на один предотвращенный случай РСВ. Средняя стоимость одного случая НРВИ, обус-

ловленного РСВ, обошлась госпиталю в 9419 USD, соотношение рентабельности составило 1:6. Таким образом, каждый доллар, потраченный на программу инфекционного контроля по РСВ, позволил сэкономить 6 долларов.

Метапневмовирусы. С момента открытия метапневмовируса человека (МПВЧ) в 2001 году в научной литературе сообщалось об эпидемических вспышках МПВ-инфекции в учреждениях долгосрочного ухода за больными в разных странах. Все вспышки сопровождались поражением верхних и нижних отделов дыхательных путей с летальными исходами [10,32,35]. Neu N. et al. [46] в ретроспективном исследовании (с 01 января по 30 апреля 2010 года) определили ведущее значение МПВЧ в развитии НРВИ гриппоподобного типа на примере 136-коечного педиатрического госпиталя длительного ухода (США). Случай гриппоподобного заболевания (ГПЗ) определяли при наличии лихорадки, кашля, патологических изменений в ротоглоточном секрете, высокой потребности в кислороде и (или) наличии одышки. За изучаемый период времени было зарегистрировано 69 случаев ГПЗ у 61 (41%) из 150 резидентов. Вирусная этиология инфекции установлена в 27 (39%) случаях, включая МПВЧ (n = 19), РСВ (n = 3), вирус гриппа А (n = 2), вирус парагриппа (n = 2), аденовирус (n = 1). Перевод в госпиталь неотложной помощи (acute care hospitals) потребовался 27 пациентам. В целом, высокая вероятность развития ГПЗ была ассоциирована с трахеостомией, показатель смертности составил 1,6%. Таким образом, на протяжении 4 месяцев в педиатрическом госпитале долгосрочного ухода в 39% случаев ГПЗ имели вирусную этиологию, из них 70% составлял МПВЧ.

Matsuda S. et al. [41] описали две эпидемические вспышки респираторных заболеваний в двух отделениях Национального госпиталя для инвалидов в префектуре Эхима (Япония). В отделении А в сентябре 2011 года заболели 34 из 159 пациентов, в отделении В в июне 2012 года — 8 из 58. МПВЧ был обнаружен в назальных и глоточных мазках у 17 пациентов и был представлен субтипом А2 (в отделении А) и субтипом В2 (в отделении В). Средняя продолжительность лихорадочного периода у пациентов составила 6,8 дней. В 79% случаев температура тела превышала 38°C и сопровождалась кашлем и отхождением мокроты. В 11 случаях имели место рентгенологические признаки бронхита или пневмонии. При исследовании сывороток крови пациентов из отделения А антитела к МПВЧ были выявлены в 95% случаев (151 из 159). Связь уровня титров антител с наличием клинических проявлений инфекции отсутствовала, однако проведенные исследования позволили выявить рецидивирующие формы заболевания. Voivin G. et al. [7] опубликовали данные эпидемиологического расследования вспышки МПВЧ в учреждении долгосрочного ухода для престарелых лиц (Квебек, Канада). Результаты получены с использованием опроса пациентов, вирусологических (материал назофарингеальных мазков с выделением вируса на культуре клеток), молекулярно-биологических (методом ПЦР с обратной транскрипцией), а также гистопатологических и иммуногистохимических исследований. В период с 01 января по 15 февраля 2006 г. симптомы ГПЗ наблюдались у 27% пациентов (96 из 364). В некоторых отделениях кумулятивная инцидентность (attack rate) достигала 72% (31 из 43). В большинстве случаев клинические проявления инфекции были обусловлены поражением верхних отделов дыхательных путей, в одном отделении у 21% заболевших с лабораторно подтвержденной МПВЧ инфекцией наблюдались признаки поражения нижних дыхательных путей. Показатель летальности для подтвержденных случаев в целом составил 50% (3 из 6), для вероятных случаев — 9,4% (9 из 96). Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей МПВЧ выявил одновременную циркуляцию двух вариантов МПВЧ в различных отделениях стационара.

Аденовирусы. В 2000 году Palomino M.A. et al. [48] сообщили о вспышке НРВИ, вызванной вариантом 7h аденовируса (AdV) в детском госпитале в Сантьяго (Чили). В результате ее развития зарегистрировано 20 случаев внутрибольничного заражения, 4 ребенка скончались. Qiu S. et al. [50] впервые сообщили о применении метода полногеномного секвенирования AdV для выяснения связи между двумя вспышками ОРЗ, вызванными новым вариантом серотипа AdV 7, вторая вспышка была внутрибольничной. Заболевания зарегистрированы в Китае с декабря 2012 по февраль 2013 года. Имеются единичные сообщения о НРВИ, вызванных другими серотипами аденовирусов. Так, Lessa F.C. et al. [31] опубликовали результаты исследований вспышки НРВИ, вызванной AdV 14 среди военных курсантов в штате Техас (США). В период с апреля по июнь 2007 года в военный госпиталь поступили 15 курсантов с пневмонией, вызванной AdV 14, что привело к распространению инфекции среди персонала. Из 218 обследованных сотрудников госпиталя 35 (16%) имели повышенные титры антител к аденовирусу, из них 28 были отнесены к лабораторно подтвержденным случаям заболевания, 7 — к вероятным случаям. В 1997 году Sanchez M.P. et al. [51] описали вспышку НРВИ, обусловленную AdV 35 в психиатрическом госпитале (США). В период развития эпидемического процесса 14 из 53 пациентов и 4 из 200 штатных сотрудников заболели пневмонией. Из 14 пациентов 13 были переведены для лечения в другой стационар, 5 — нуждались в ИВЛ, 1 — умер. Аденовирусная инфекция была подтверждена у 17 из 18 лиц с пневмонией, из них AdV 35 различными методами удалось определить у 8 заболевших. В 1988 году Brummitt C.F. et al. [8] представили материалы о групповой заболеваемости аденовирусом AdV 3a в госпитале Миннеаполиса (США). Заражение 38 сотрудников с симптомами ОРЗ произошло от пациентки госпиталя с диссеминированной аденовирусной инфекцией и иммунодефицитом, у которой случай закончился летальным исходом. Идентичность всех 38 выделенных штаммов AdV 3a от заболевших сотрудников в ходе вирусологического исследования была доказана методом рестрикционного анализа с 6 эндонуклеазами. У 4 контактировавших лиц (все пациенты госпиталя), выявлена сероконверсия к аденовирусу на фоне бессимптомного носительства.

Вирусы гриппа. В обзоре Voirin N. et al. [56] систематизированы данные о нозокомиальных вспышках, вызванных вирусами гриппа за период с 1950 по август 2007 года (США). Отмечено, что нозокомиальные вспышки гриппа происходят почти во всех типах госпиталей, а их последствия для исхода заболевания и экономические затраты на лечение весьма значительны. Источники возбудителя инфекции часто остаются неизвестны. Ими могут быть пациенты, сотрудники или посетители с легкой формой заболевания. Тем не менее, расследования нозокомиальных вспышек гриппа помогают предотвратить вторичные случаи инфекции и совершенствовать противоэпидемические мероприятия.

Macesic N. et al. [38] опубликовали результаты эпидемиологического исследования случаев внутрибольничных инфекций среди взрослых, госпитализированных с диагнозом грипп в период с апреля 2010 по ноябрь 2011 года (Мельбурн, Австралия). Выявлены 598 случаев гриппа, из них 26 (4,3%) были отнесены к нозокомиальным. Alvarez-Lerma F. et al. [1] изучали ятрогенные инфекции, обусловленные гриппом А (H1N1)pdm09 и их влияние на клиническое течение заболевания. Данные получены из базы Испанского регистра и содержали информацию о пациентах с тяжелыми формами гриппа, поступивших в отделения интенсивной терапии в период с 2009 по 2015 год. Случай заболевания считали нозокомиальным, если дата постановки диагноза «грипп» и начало противовирусной терапии превышала 7 суток от даты поступления пациента в стационар. Таким образом, в группе из 2421 пациентов с

диагнозом грипп А (H1N1)pdm09 к нозокомиальным были отнесены 224 (9,3%) случая. Установлено, что внутрибольничное заражение вирусом гриппа А (H1N1)pdm09 существенно повышало риск летальных исходов среди пациентов ОРИТ. Bearden A. et al. [3] опубликовали результаты расследования вспышки НРВИ, вызванной вирусом гриппа А (H1N1) в октябре 2009 в детском гематологическом стационаре (США). В течение 21-дневного периода там заболели 2 пациента и 4 штатных сотрудника, у всех диагноз гриппа А (H1N1)pdm09 был подтвержден методом ПЦР. У вирусов, выделенных из назофарингеальных мазков заболевших методом секвенирования по Сэнгеру, были охарактеризованы гены гемагглютинина и полимеразы (PB2). Все выделенные вирусы были идентичны по представленным локусам. В научной литературе неоднократно сообщалось о вспышках НРВИ, вызванных вирусами гриппа А в детских отделениях интенсивной терапии [14,42,45]. Так, Valley-Omar Z. et al. [54] проведен сравнительный анализ результатов эпидемиологического расследования НРВИ, вызванных вирусом гриппа А (H1N1) в детском госпитале в Кейптауне (ЮАР) в 2011 году. Филогенетический анализ позволил предположить их внутрибольничное распространение, что подразумевало наличие бессимптомных и неучтенных случаев гриппа у пациентов, посетителей и персонала.

Вирусы парагриппа. Наибольшее количество публикаций о нозокомиальных инфекциях парагриппозной этиологии (преимущественно парагриппа серотипа 3) связано с трансплантацией костного мозга в онкогематологических стационарах [19,21,23,27,30,39,47]. Авторами установлено, что инкубационный период составляет от 1 до 4 дней. Чаще других вирус парагриппа поражает верхние отделы дыхательных путей. Инфекционный процесс протекает в форме крупа, среднего отита, ОРЗ, бронхита, реже как инфекция центральной нервной системы. Одним из наиболее распространенных осложнений является прогрессирование заболевания и переход в инфекцию нижних отделов дыхательных путей (встречается у 20-39% реципиентов костного мозга). При этом уровень смертности может достигать до 30%. Для снижения высоких показателей летальности авторы рекомендуют раннее начало внутривенного введения рибавирина.

Ряд публикаций описывали случаи НРВИ парагриппозной этиологии в отделениях новорожденных [43,44] и детских стационарах (intermediate care unit) [26]. Описан случай вспышечной заболеваемости в Университетском госпитале в Испании [17]. Greninger A.L. et al. [18] сообщили о применении метода метагеномного секвенирования нового поколения (mNGS) для ускоренной расшифровки вспышки НРВИ, вызванной вирусом парагриппа 3, в детском госпитале (США). Проанализированы образцы от 3 пациентов (выявлены в общем медицинском отделении в течение 12-дневного периода) и 10 контрольных образцов (от пациентов в поликлинических условиях). В двух из трех случаев с внутрибольничной инфекцией определена идентичная геномная последовательность вируса. Время доставки и подготовки проб для секвенирования составило менее 24 часов, время от момента взятия проб до получения результата — менее 60 часов. Таким образом, применение метода mNGS позволило в короткий срок установить этиологию и характер НРВИ, провести эффективные противоэпидемические мероприятия.

Реже нозокомиальные респираторные инфекции вызывал вирус парагриппа 4 серотипа. Так, возбудитель был обнаружен в Гонконге в 2004 году при групповой заболеваемости в пансионате для детей с пороками развития. Диагноз подтвержден методом ПЦР с обратной транскрипцией [29].

Коронавирусы. Ретроспективный эпидемиологический анализ пандемии, вызванной MERS-CoV, указывает на первую вспышку этого заболевания в апреле

2012 года (Эз-Зарк, Иордания). Тогда в отделении интенсивной терапии от пневмонии скончались два медицинских работника [15]. Однако, официальным началом пандемии принято считать смерть пациента от пневмонии и почечной недостаточности в июне 2012 года в Саудовской Аравии, где впервые выделен «новый» вирус. Крупнейшая вспышка MERS-CoV за пределами Ближнего Востока произошла в Южной Корее в 2015 году, распространение вируса было нозокомиальным: 1 случай первичной инфекции, 25 случаев — вторичной и 11 — третичной [49]. Настороженность в отношении пандемического распространения MERS-CoV сохраняется до настоящего времени, поскольку в странах Ближнего востока близкородственные вирусы выделяют от верблюдов и летучих мышей. Данные о нозокомиальном характере заболеваний медицинских работников в период пандемий SARS-CoV и MERS-CoV (в том числе с летальными исходами) были представлены в работе Liu S. et al. [34]. Во время пандемии SARS-CoV 2016 года, охватившей 29 стран мира, доля заболевших медицинских работников составила 21,07% (1706 из 8096), во время пандемии MERS-CoV 2015 года — 13,37% (183 из 1368). Летальность среди заболевших медицинских работников при SARS-CoV составила 12,24%, в общей популяции — 24,50% ($p < 0,001$), при MERS-CoV соответственно — 7,03% и 36,96%. Достоверных отличий в показателях летальности медицинских работников от MERS-CoV и SARS-CoV не выявлено ($p=0,181$). Сравнительный анализ данных о внутрибольничном характере инфицирования SARS-CoV и MERS-CoV представлен в работе Chowell G. et al. [12]. Установлено, что нозокомиальное распространение обоих вирусов в период подъема заболеваемости сопровождалось их ранним сверхбыстрым распространением (early super-spreading events), что вызвало всплеск вторичных случаев инфекции.

Бокавирусы. Бокавирусы человека были открыты в 2005 году, в настоящее время род *Bocavirus*, относящийся к семейству *Parvoviridae*, включает у человек 4 типа: hBoV1, hBoV2, hBoV3, hBoV4. С респираторными заболеваниями связывают лишь hBoV1 [57], остальные 3 типа ассоциированы с гастроэнтеритом [25]. Сообщения об их нозокомиальном распространении единичны [9,16].

Мимивирусы. Мимивирусы были открыты относительно недавно, в 2003 году. Их относят к семейству *Mimiviridae*, включающему 3 вида: *Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus*, *Acanthamoeba Castellanii* и *Cafeteria Roenbergensis Virus*. Жизненный цикл мимивирусов связан с их репродукцией в фагоцитирующих простейших микроорганизмах — амебах *Acanthamoeba spp*. Исследование амеба-ассоциированных микроорганизмов в качестве возбудителей пневмонии (культуральными методами, ПЦР и серологическими методами) у пациентов в отделениях интенсивной терапии проведено Berger P.; установлено, что у 8 из 210 заболевших пневмонией пациентов был идентифицирован *A. polyphaga mimivirus* [4]. Vinsen A., La Scola B., Forel J.M. et al. обсуждали в своих работах возможное участие данного вируса в этиологии внутрибольничной пневмонии у человека, вызванной *Acanthamoeba spp*. [55].

Таким образом, обзор источников зарубежной литературы, посвященный нозокомиальным респираторным вирусным инфекциям, позволил сделать вывод об их широком распространении. Биологическое разнообразие патогенов, вызывающих ОРВИ, связанных с оказанием медицинской помощи, диктует необходимость активного внедрения в работу лабораторной службы медицинских учреждений методов молекулярной генетики с целью качественной этиологической диагностики, разработки и реализации схем адекватной противовирусной терапии, а также эффективных программ профилактики, что позволит снизить риск их распространения и экономические затраты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alvarez-Lerma F., Marin-Corral J., Vila C. et al. H1N1 GETGAG/SEMICYUC Study Group. Characteristics of patients with hospital-acquired influenza A (H1N1)pdm09 virus admitted to the intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 2017, 95 (2): 200-206. doi:10.1016/j.jhin.2016.12.017.
2. Atmar R.L. Uncommon (ly considered) manifestations of infection with rhinovirus, agent of the common cold. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41 (2): 266-267. doi: 10.1086/430927.
3. Bearden A., Friedrich T.C., Goldberg T.L. et al. An outbreak of the 2009 influenza a (H1N1) virus in a children's hospital. *Influenza Other Respir Viruses.* 2012, 6 (5): 374-379. doi:10.1111/j.1750-2659.2011.00322.x.
4. Berger P., Papazian L., Drancourt M. et al. Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12 (2): 248-255. doi:10.3201/eid1202.050434.
5. Berkovich S. Acute respiratory illness in the premature nursery associated with respiratory syncytial virus in-fectious. *Pediatrics.* 1964, 34: 753-760.
6. Berner R., Schwoerer F., Schumacher R.F. et al. Community and nosocomially acquired respiratory syncytial virus infection in a German paediatric hospital from 1988 to 1999. *Eur. J. Pediatr.* 2001, 160 (9): 541-547. doi: 10.1007/s004310100801.
7. Boivin G., De Serres G., Hamelin M.E. et al. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 44 (9): 1152-1158. doi: 10.1086/513204.
8. Brummitt C.F., Cherrington J.M., Katzenstein D.A. et al. Nosocomial adenovirus infections: molecular epidemiology of an outbreak due to adenovirus 3a. *J. Infect. Dis.* 1988, 158 (2): 423-432.
9. Calvo C., Garcia-Garcia M.L., Blanco C. et al. Human bocavirus infection in a neonatal intensive care unit. *J. Infect.* 2008, 57 (3): 269-271. doi:10.1016/j.jinf.2008.06.004.
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks of human metapneumovirus in two skilled nursing facilities -West Virginia and Idaho, 2011-2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2013, 62 (46): 909-913.
11. Chow E.J., Mermel L.A. Hospital-acquired respiratory viral infections: incidence, morbidity, and mortality in pediatric and adult patients. *Open Forum Infect. Dis.* 2017, 4 (1): ofx006. doi: 10.1093/ofid/ofx006.
12. Chowell G., Abdirizak F., Lee S. et al. Transmission characteristics of MERS and SARS in the healthcare setting: a comparative study. *BMC Med.* 2015, 13:210. doi:10.1186/s12916-015-0450-0.
13. Class II Special Controls Guidance Document: Respiratory Viral Panel Multiplex Nucleic Acid Assay — Guidance for Industry and FDA Staff. URL: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/>.
14. Cunney R.J., Bialachowski A., Thornley D. et al. An outbreak of influenza A in a neonatal intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2000, 21 (7): 449-454.
15. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 2013, 87 (14): 7790-7792. doi: 10.1128/JVI.01244-13.
16. Durigon G.S., Oliveira D.B., Vollet S.B. et al. Hospital-acquired human bocavirus in infants. *J. Hosp. Infect.* 2010, 76 (2): 171-173. doi:10.1016/j.jhin.2010.04.028.
17. Godoy C., Peremiquel-Trillas P., Andres C. et al. A molecular epidemiological study of human parainfluenza virus type 3 at a tertiary university hospital during 2013-2015 in Catalonia, Spain. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2016, 86 (2): 153-159. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.023.
18. Greninger A.L., Zerr D.M., Qin X. et al. Rapid metagenomic next-generation sequencing during an investigation of hospital-acquired human parainfluenza virus 3 infections. *J. Clin. Microbiol.* 2016, 55 (1): 177-182. doi: 10.1128/JCM.01881-16.
19. Harvala H., Gaunt E., McIntyre C. et al. Epidemiology and clinical characteristics of parainfluenza virus 3 outbreak in a haemato-oncology unit. *J. Infect.* 2012, 65 (3): 246-254. doi: 10.1016/j.jinf.2012.04.011.
20. Hicks L.A., Shepard C.W., Britz P.H. et al. Two outbreaks of severe respiratory disease in nursing homes associated with rhinovirus. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2006, 54 (2): 284-289. doi: 10.1111/j.1532-5415.2005.00529.x.
21. Hohenthal U., Nikoskelainen J., Vainionpaa R. et al. Parainfluenza virus type 3 infections in a hematology unit. *Bone Marrow Transplant.* 2001, 27 (3): 295-300.
22. Home — PubMed — NCBI. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (дата обращения 03.06.2018).

23. Kakiuchi S., Tsuji M., Nishimura H. et al. Human parainfluenza virus type 3 infections in patients with hematopoietic stem cell transplants: the mode of nosocomial infections and prognosis. *Jpn J. Infect. Dis.* 2018, 71 (2): 109-115. doi:10.7883/yoken.JJID.2017.424.
24. Kapikian A.Z., Bell J.A., Mastrotta F.M. et al. An outbreak of febrile illness and pneumonia associated with respiratory syncytial virus infection. *Am. J. Hyg.* 1961, 74: 234-248.
25. Kapoor A., Simmonds P., Slikas E., Li L. et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J. Infect. Dis.* 2010, 201 (11): 1633-1643. doi:10.1086/652416.
26. Karron R.A., O'Brien K.L., Froehlich J.L., Brown V.A. Molecular epidemiology of a parainfluenza type 3 virus outbreak on a pediatric ward. *J. Infect. Dis.* 1993, 167 (6): 1441-1445.
27. Kim T., Jin C.E., Sung H. et al. Molecular epidemiology and environmental contamination during an outbreak of parainfluenza virus 3 in a haematology ward. *J. Hosp. Infect.* 2017, 97 (4): 403-413. doi:10.1016/j.jhin.2017.09.003.
28. La Rosa G., Fratini M., Della Libera S. et al. Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 2013, 49 (2): 124-132. doi: 10.4415/ANN_13_02_03.
29. Lau S.K., To W.K., Tse P.W. et al. Human parainfluenza virus 4 outbreak and the role of diagnostic tests. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43 (9): 4515-4521.
30. Lee A.V., Bibby D.F., Oakervee H. et al. Nosocomial transmission of parainfluenza 3 virus in hematological patients characterized by molecular epidemiology. *Transpl. Infect. Dis.* 2011, 13 (4): 433-437. doi: 10.1111/j.1399-3062.2011.00603.x.
31. Lessa F.C., Gould P.L., Pascoe N. et al. Health care transmission of a newly emergent adenovirus serotype in health care personnel at a military hospital in Texas, 2007. *J. Infect. Dis.* 2009, 200 (11): 1759-1765. doi:10.1086/647987.
32. Liao R.S., Appelgate D.M., Pelz R.K. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility for the elderly in Oregon. *J. Clin. Virol.* 2012, 53 (2): 171-173. doi: 10.1016/j.jcv.2011.10.010.
33. Lindsley W.G., Blachere F.M., Davis K.A. et al. Distribution of airborne influenza virus and respiratory syncytial virus in an urgent care medical clinic. *Clin. Infect. Dis.* 2010, 50 (5): 693-698. doi: 10.1086/650457.
34. Liu S., Chan T.C., Chu Y.T. et al. Comparative epidemiology of human infections with Middle East respiratory syndrome and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronaviruses among healthcare personnel. *PLoS One.* 2016, 11 (3): e0149988. doi: 10.1371/journal.pone.0149988.
35. Louie J.K., Schnurr D.P., Pan C.Y. et al. A summer outbreak of human metapneumovirus infection in a long-term-care facility. *J. Infect. Dis.* 2007, 196 (5): 705-708.
36. Louie J.K., Yagi S., Nelson F.A. et al. Rhinovirus outbreak in a long-term care facility for elderly persons associated with unusually high mortality. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41 (2): 262-265. doi: 10.1086/430915.
37. Macartney K.K., Gorelick M.H., Manning M.L. et al. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the cost-effectiveness and cost-benefit of infection control. *Pediatrics* 2000, 106 (3): 520-526. doi: 10.1542/peds.106.3.520.
38. Macesic N., Kotsimbos T.C., Kelly P., Cheng A.C. Hospital-acquired influenza in an Australian sentinel surveillance system. *Med. J. Aust.* 2013, 198 (7): 370-372.
39. Maeng S.H., Yoo H.S., Choi S.H. et al. Impact of parainfluenza virus infection in pediatric cancer patients. *Pediatr. Blood Cancer.* 2012, 59 (4): 708-710. doi: 10.1002/psc.23390.
40. Maille L., Beby-Defaux A., Bourgoin A. et al. Nosocomial infections due to rotavirus and respiratory syncytial virus in pediatric wards: a 2-year study. *Ann. Biol. Clin. (Paris).* 2000, 58 (5): 601-606.
41. Matsuda S., Nakamura M., Hirano E. et al. Characteristics of human metapneumovirus infection prevailing in hospital wards housing patients with severe disabilities. *Jpn J. Infect. Dis.* 2013, 66 (3): 195-200.
42. Meibalan R., Sedmak G.V., Sasidharan P. et al. Outbreak of influenza in a neonatal intensive care unit. *J. Pediatr.* 1977, 91 (6): 974-976.
43. Meissner H.C., Murray S.A., Kiernan M.A. et al. A simultaneous outbreak of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3 in a newborn nursery. *J. Pediatr.* 1984, 104 (5): 680-684.
44. Moisiuk S.E., Robson D., Klass L. et al. Outbreak of parainfluenza virus type 3 in an intermediate care neonatal nursery. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1998, 17 (1): 49-53.

45. Munoz F.M., Campbell J.R., Atmar R.L. et al. Influenza A virus outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1999, 18 (9): 811-815.
46. Neu N., Plaskett T., Hutcheon G. et al. Epidemiology of human metapneumovirus in a pediatric long-term care facility. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2012, 33 (6): 545-550. doi: 10.1086/665727.
47. Nichols W.G., Erdman D.D., Han A. et al. Prolonged outbreak of human parainfluenza virus 3 infection in a stem cell transplant outpatient department: insights from molecular epidemiologic analysis. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2004, 10 (1): 58-64.
48. Palomino M.A., Larranaga C., Avendano L.F. Hospital-acquired adenovirus 7h infantile respiratory infection in Chile. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000, 19 (6): 527-531.
49. Park H.Y., Lee E.J., Ryu Y.W. et al. Epidemiological investigation of MERS-CoV spread in a single hospital in South Korea, May to June 2015. *Euro. Surveill.* 2015, 20 (25): 1-6.
50. Qiu S., Li P., Liu H. et al. Whole-genome sequencing for tracing the transmission link between two ARD outbreaks caused by a novel HAdV serotype 7 variant, China. *Sci. Rep.* 2015, 5: 13617. doi: 10.1038/srep13617.
51. Sanchez M.P., Erdman D.D., Torok T.J. et al. Outbreak of adenovirus 35 pneumonia among adult residents and staff of a chronic care psychiatric facility. *J. Infect. Dis.* 1997, 176 (3): 760-763.
52. Sidler J.A., Haberthur C., Dumoulin A. et al. A retrospective analysis of nosocomial viral gastrointestinal and respiratory tract infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2012, 31: 1233-1238.
53. Valenti W.M., Menegus M.A., Hall C.B. et al. Nosocomial viral infections: I. Epidemiology and significance. *Infect. Control.* 1980, 1 (1): 33-37.
54. Valley-Omar Z., Nindo F., Mudau M. et al. Phylogenetic exploration of nosocomial transmission chains of 2009 Influenza A/H1N1 among children admitted at Red Cross War Memorial Children's Hospital, Cape Town, South Africa in 2011. *PLoS One.* 2015, 10 (11): e0141744. doi:10.1371/journal.pone.0141744.
55. Vincent A., La Scola B., Forel J.M. et al. Clinical significance of a positive serology for mimivirus in patients presenting a suspicion of ventilator-associated pneumonia. *Crit. Care Med.* 2009, 37 (1):111-118. doi:10.1097/CCM.0b013e318192fa8b.
56. Voirin N., Barret B., Metzger M.H., Vanhems P. Hospital-acquired influenza: a synthesis using the Outbreak Reports and Intervention Studies of Nosocomial Infection (ORION) statement. *J. Hosp. Infect.* 2009, 71 (1): 1-14. doi: 10.1016/j.jhin.2008.08.013.
57. von Linstow M.L., Høgh M., Høgh B. Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: results from a prospective birth cohort study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2008, 27 (10): 897-902. doi:10.1097/INF.0b013e3181757b16.
58. Wald T.G., Shult P., Krause P. et al. A rhinovirus outbreak among residents of a long-term care facility. *Ann. Intern. Med.* 1995, 123 (8): 588-593.

Поступила 17.06.19

Контактная информация: Захарова Ю.А.,
620000, Екатеринбург, ул. Летняя, 23, р.т. (343)261-99-47

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

М.Н.Бойченко, Е.О.Кравцова, В.В.Зверев

МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПАРАЗИТИЗМА БАКТЕРИЙ

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Алгоритм внутриклеточного паразитирования бактерий не зависит от того, является ли бактерия абсолютным или внутриклеточным паразитом. В зависимости от локализации бактериальной репликативной ниши внутриклеточные паразиты делятся на цитозольные и вакуолярные. Бактерии родов *Rickettsia*, *Shigella*, *Chlamydia* и вид *Listeria monocytogenes* используют в процессе внутриклеточного паразитирования аппарат полимеризации актина клетки хозяина. Эти бакте-

рии обладают эффекторными белками, домены которых идентичны эффекторным белкам клетки хозяина. У бактерий рода *Shigella* в этом процессе активное участие принимают эффекторные белки третьего типа секреторной системы (Т3СС). *Listeria monocytogenes* в отличие от других цитозольных бактериальных внутриклеточных паразитов обладает двумя формами паразитирования: цитозольным и вакуолярным. У бактерий рода *Brucella* в создании репликативной ниши внутри клетки решающую роль выполняют эффекторные белки четвертого типа секреторной системы (Т4СС), которые также участвуют в модуляции врожденного иммунного ответа

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 61—72

Ключевые слова: *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella*, актиновая подвижность, репликативная ниша, Т3СС, Т4СС, внутриклеточный паразитизм

M.N.Boichenko, E.O.Kravtsova, V.V.Zverev

MECHANISM OF INTRACELLULAR BACTERIAL PARASITISM

Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Algorithm of intracellular bacterial parasitism does not depend on if bacterium is obligate or facultative intracellular parasite. Depending on replicative niche's localization intracellular bacterial parasites are divided onto cellular and vacuolated. *Rickettsia* spp., *Shigella* spp., *Chlamydia* spp. and *Listeria monocytogenes* use cell's machinery of actin polymerization during process of their intracellular parasitism. These bacteria possess some of effector's proteins which contain domains identical to effector proteins from the host cell. *Shigella* spp. T3SS and autotransporter protein IscA provide this process together with spreading bacteria intra colonic epithelium. In contrast other intracellular bacterial parasites, *Listeria monocytogenes* switches from dissemination in cytosol to persist in vacuole. In case of *Brucella* spp. the leading role in the creation of a replicative niche and in the modulation of the innate immune response is played by effector proteins of fourth type secretory system (T4SS).

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 61—72

Key words: *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella*, actin —based movement, replicative niche, T3SS, T4SS, intracellular parasitism

Молекулярный механизм внутриклеточного паразитирования бактерий в последнее время значительно привлекает внимание исследователей. В основе этого внимания лежит ряд факторов. Те бактерии, которые являются внутриклеточными паразитами, вызывают хронические персистирующие инфекции, заболевания, вызванные ими, протекают как в латентной форме с реактивацией, так и в форме бактерионосительства. Их паразитизм внутри клетки ограничивает доступ к ним лекарственных препаратов, что требует разработку новых антибактериальных средств для лечения этой группы заболеваний.

Следует отметить, что в развитии внутриклеточного паразитизма бактерий важную роль играют открытые в конце XX века неклассические факторы патогенности — секреторные системы, которые присутствуют главным образом у грамотрицательных бактерий. Секреторные системы представляют собой структурные белковые образования, пролегающие от внутренней цитоплазматической мембраны с формированием канала, проходящего через периплазматическое пространство и наружную мембрану. Их функцией является доставка синтезированных бактериальной клеткой веществ (эффекторов) в клетку чувствительного организма. Типы секреторных систем различаются по строению и функциональной значимости. Типы 3(Т4СС), 4(Т4СС) и 6 (Т6СС) имеют шприцеобразную форму и принимают значительное участие в процессе внутриклеточного паразитирования бактерий [1,2].

Как известно, внутриклеточные паразиты подразделяются на абсолютные, которые не способны существовать вне клетки (риккетсии, хламидии и коксии), и факультативные. Это подразделение связано с особенностями метаболизма бактериальной клетки. А вот характер взаимодействия с эукариотической клеткой не зависит от метаболической особенности бактерий, и внутриклеточных паразитов подразделяют на 2 большие группы: цитозольные и вакуолярные.

Для того, чтобы существовать внутри клетки, бактериальный паразит должен создать внутри нее репликативную нишу. Для этого он должен обладать следующими стратегиями: способностью активировать полимеризацию клеточного актина, в результате чего бактерия получает возможность проникать в клетку, которая не является профессиональным фагоцитом, путем «незаконного фагоцитоза», а также распространяться по межклеточному пласту; способностью формировать внутри клетки содержащую бактерию-паразит вакуоль, а для этого быть способной разрушать или модулировать эндосомальный каскад и ингибировать продвижение активных форм кислорода и азота; способностью противостоять факторам врожденного иммунитета.

При одном варианте как факультативные, так и облигатные паразиты формируют свою нишу в вакуоле, которая начинает диссоциировать от эндосомо-лизосомального пути созревания. Таких внутриклеточных паразитов называют вакуолярными. К ним относятся бактерии родов *Salmonella*, *Brucella*, *Coxiella*, *Legionella*, *Chlamydia* [1].

Альтернативная стратегия предполагает убежание бактерии из эндоцитарной вакуоли для того, чтобы использовать цитозоль клетки-хозяина в качестве сайта-репликации. Таких бактерий называют цитозольными внутриклеточными паразитами. К ним относятся рассмотренные ранее бактерии родов *Francisella*, *Shigella* [2], а также *Listeria*, *Rickettsia* [2,5]. Эта группа бактерий использует клеточный аппарат полимеризации актина как механизм межклеточного распространения и иммунного избегания [26,31]. Актиновый цитоскелет клетки представляет ключевую мишень для внутриклеточных бактериальных паразитов. Особенностью цитозольных паразитов является то, что они, инвазируя нефагоцитирующие клетки, выбегают из фагосомы в цитозоль, где полимеризуют актиновые филаменты для сборки на своей поверхности актинового хвоста, который обеспечивает развитие феномена актиновой подвижности (АП), способствует распространению микроба через цитозоль, направляя его распространение в соседние клетки [31].

Этот процесс состоит из нескольких этапов [26].

1. После интернализации в клетку хозяина бактерии попадают в образованную мембраной клетки фагосому.

2. Через 30-60 минут фагосома разрушается бактериальными факторами, предоставляя микробу доступ в цитозоль.

3. В цитозоле клетки хозяина цитозольные паразиты реплицируются и декорируются актиновыми филаментами клетки хозяина.

4. Рекрутирование клеточного актина является результатом полимеризации актиновых мономеров поверхностными белками бактерии. Актиновые филаменты организуются в хвостоподобные структуры и вызывают продвижение бактерий через цитоплазму к межклеточному соединению.

5. Происходит формирование выпячивания в соседнюю клетку, окруженного двойной цитоплазматической мембраной, которое в соседней клетке преобразуется в вакуоль. Бактериальные ферменты разрушают вакуоль, освобождая микроб, позволяя ему инфицировать следующие клетки.

Для развития актиновой подвижности необходим процесс нуклеации актина, т.е. сборка актиновых филаментов: димеров или тримеров. Этот процесс стимулируется в клетке белками нуклеаторами, к которым относятся Agr и формин.

Arp (actin related protein) представляет комплекс, состоящий из 7 белков [7], у которого белки Arp2/Arp3 (Arp2/3) обладают структурным подобием мономеру актина [7]. Arp2/3 стимулируют полимеризацию актина со стороны материнского филамента, образуя структуру Y-ветвистой формы, которая служит первой субъединицей нового актинового филамента.

Сам по себе Arp2/3 не способен вызвать сборку актина. Для этого требуется его активация факторами, способствующими нуклеации [14]. Одним из них является белок неврологического синдрома Wiscott-Aldrich (WASP). Взаимодействуя с Arp2/3, WASP вызывает их конформационные изменения, делая комплекс способным для осуществления нуклеации [14].

Формин-протеин функционирует как димер, используя свои два домена FH1 и FH2 для стимуляции сборки линейных актиновых филаментов.

Рассмотрим механизмы паразитирования у некоторых цитозольных паразитов, к которым относятся шигеллы, риккетсии и листерии.

Попав в толстый кишечник, шигеллы не инвазируют его эпителиальные клетки с апикальной стороны, а проходят трансцитозом эпителиальный слой через М-клетки. Начальный контакт между шигеллой и эпителиальной клеткой толстого кишечника происходит в участке липидного «рафта», богатого холестерином участка мембраны, который находится на базальной стороне эпителиальной клетки толстого кишечника [46]. Этот контакт опосредован рецепторами CD44 и альфа5,бета1-интегрином. С этого момента начинают активно участвовать факторы патогенности шигелл, синтез которых связан с генами «островков патогенности», расположенных на крупной плазмиде вирулентности WR 100.

Важным фактором патогенности шигелл является третьего типа секреторная система (ТЗСС), синтез которой опосредуется 30-килобазным районом плазмиды pWR 100, обозначенным как район входа, «entry» район [39]. «Entry» район состоит из 2 оперонов: *mxh—spa*, которые кодируют структурный аппарат ТЗСС и оперон *ira/iprg*, гены которого имеют существенное значение для инвазии микроба в клетку, *ira/iprg* оперон включает *iprg*—гены, экспрессирующие шапероны, и *ira*-гены, которые экспрессируют траслокаторы, являющиеся компонентами транслоконового комплекса, образующего поры в мембране клетки-мишени, что позволяет проводить транслокацию эффекторных молекул. Процесс проникновения шигелл в клетку требует гликозилирование ЛПС, так как это способствует более эффективно-му контакту компонентов транслоконового комплекса ТЗСС с мембраной клетки. Белок транслоконового комплекса *IraB* опосредует адгезию микроба к базальной мембране эпителиальной клетки толстого кишечника через взаимодействие гликопротеинового рецептора CD44, который локализован в «рафт»-домене цитоплазматической мембраны эпителиальной клетки. Критичным компонентом ТЗСС, необходимым для инвазии в клетку, является белок *IraC*. Этот белок состоит из 3 районов: N-терминального, обладающего сигнальной последовательностью для связывания с шапероном, C-карбоксильного и центрального гидрофобного района, который взаимодействует с *IraB*. В результате этого взаимодействия происходит проникновение иглы ТЗСС в мембрану клетки, запуск реорганизации цитоскелета и микропиноцитоза. Белок *IraD* выступает подложкой комплекса *IraB-IraC*, он также участвует в процессе сморщивания мембраны клетки [40]. В процессе реорганизации цитоскелета клетки принимают участие Rho-ГТФаза и тирозинкиназа.

В сайте внедрения микроба происходит индукция полимеризации актина, что приводит к образованию массивного мембранного впячивания, которое охватывает микроб, образуя первичную вакуоль, в которой находится возбудитель. Этот процесс

требует активации малой Rho-ГТФазы, которая рекрутирует актин-нуклеирующий комплекс Arp2/Arp3 [7]. В процесс регуляции впячивания мембраны вовлечен также белок IpaA за счет его взаимодействия с белком клетки хозяина, винкулином, который связывает цитоскелет клетки с экстрацеллюлярным матриксом. Мутанты по *iра*—гену обладают в 10 раз сниженной инвазивной способностью [33]. В лизисе образованной первичной вакуоли принимает участие IpaB-IpaC комплекс, внедрение которого в вакуолярную мембрану является причиной ее лизиса. Это происходит через образование поры, которая приводит к дестабилизации вакуоли [40].

Цитоплазма эпителиальной клетки является главной репликативной нишей для шигелл. Главным бактериальным медиатором полимеризации актина является белок IscA (intracellular spread protein) [4,21]. IscA контролирует клеточные факторы, включая neuronal Wiskotts-Aldrich синдромный протеин и Arp2/Arp3 [18].

Белок IscA кодируется плазмидой вирулентности, но не является эффекторным белком ТЗСС. Он является представителем белков — аутотранспортёров IscA, состоит из 3 доменов: N-терминальной сигнальной последовательности, С-терминального домена, формирующего бета-цилиндрический канал, который формирует пору во внешней мембране бактериальной клетки, через которую через бета-цилиндрический канал на поверхность бактерии транспортируется N-терминальный домен и центральный альфа-домен [33]. Экспонированный в цитозоль клетки-хозяина IscA активирует N-WASP. В результате этого взаимодействия происходит быстрая сборка актинового ядра и разрастание актиновой сети в области локализации N-терминального домена белка IscA, что формирует проталкивающую силу для движения бактерии по клетке.

Когда бактерия достигает межклеточного контакта, происходит образование мембранного выпячивания, проникающего в соседнюю клетку [24]. Мембранное выпячивание подвергается преобразование в вакуоль-подобное выпячивание (ВПВ). ВПВ представляет образование, состоящее из двойной мембраны, окружающей бактериальную клетку, но остается связанным с клеткой, из которой произошло выпячивание [24]. Преобразование выпячивания в вакуоль происходит через коллапс «шей» выпячивания. Плазматическая мембрана ВПВ богата тирозиновыми остатками, поэтому предполагается, что в процессе преобразования ВПВ в вакуоль принимает участие тирозинкиназа и фосфатидил инозитол-3киназа [2,24].

В процессе разрушения вторичной вакуоли, окруженной двойной цитоплазматической мембраной, что способствует «побегу» из нее шигелл, участвуют сама ТЗСС и ее эффекторные белки IscBVirA.

Дальнейшая внутриклеточная репликация, активная подвижность и сохранение шигелл внутри клеток зависят от эффекторной молекулы ТЗСС IscB [36], который защищает бактерию от узнавания и захвата механизмом самопереваривания (аутофагии). Самопереваривание — процесс, при котором внутренние компоненты клетки доставляются внутрь ее лизосом, где подвергаются деградации.

На белке IscA имеется индуцирующий процесс аутофагии сайт узнавания [33], который маскируется IscB при участии шаперона IrgA для предупреждения заглатывания микроба везикулами аппарата аутофагии [36]. В ингибиции процесса самопереваривания участвует также белок VirA, обладающий цистеин протеазной активностью и способностью вызывать микротубулярную деградацию. После проникновения в соседнюю клетку повторяется новый цикл распространения шигеллы по клеточному пласту.

Бактерии рода *Rickettsia*, в отличие от шигелл, являются облигатными внутриклеточными паразитами, которые в организме человека преимущественно инфицируют эндотелий малых и средних сосудов [43]. Интернализация риккетсий в

клетку хозяина происходит, как предполагают, индуцированным фагоцитозом, в процессе которого принимают участие белки наружной мембраны риккетсий [43]. Оказавшись внутри внутриклеточной вакуоли, риккетсии разрушают ее мембрану, используя гемолизин и фосфолипазу D. Для дальнейшей диссеминации через эндотелий риккетсии используют актиновую подвижность, однако молекулярный механизм ее развития отличается от такового у шигелл [2].

Наиболее детально этот процесс изучен у риккетсий, входящих в группу клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ). На поверхности бактериальной клетки риккетсий группы КПЛ имеется белок RickA, обладающий аминокислотным подобием WASP. Он способен стимулировать Acp2/3-зависимую полимеризацию в системе *in vitro*.

Помимо RickA на поверхности клетки риккетсий группы КПЛ имеется еще белок Sca2, который участвует в нуклеации актина [23,28]. Этот белок обладает аминокислотным подобием белку формину [23]. Подобно форминовому белку Sca2 нуклеирует сборку линейных актиновых филаментов. Это предполагает, что риккетсии группы КПЛ используют формин-подобные свойства Sca2 для первичного механизма движения как внутри клетки, так и между клетками.

Наличие на поверхности микробной клетки риккетсий группы КПЛ двух белков, способных стимулировать полимеризацию актина, привело к предположению, что они действуют в клетке на разных стадиях инфекционного процесса. RickA связан с индукцией реорганизации актина цитоскелета клетки в период интернализации риккетсий [23]. На примере *R. parkeri* из группы КПЛ было показано, что в период раннего времени инфекционного процесса экспрессируется RickA, полимеризуя короткие закругленные актиновые хвосты Acp2/3-зависимым механизмом [22,38]. В дальнейшем Sca2 начинает вызывать полимеризацию длинного прямого актинового хвоста.

Интересным циклом внутриклеточного паразитирования обладают бактерии рода *Listeria*. *L. monocytogenes* обладает способностью сохраняться и реплицироваться как в фагоцитарных, так и в нефагоцитарных клетках [16]. Поверхностные белки микроба: интерналины А и В (nlA,B) служат лигандами для рецепторов клетки хозяина для лигандо-рецепторного взаимодействия, опосредующего захват бактерии рецептор — опосредованным эндоцитозом [16]. Оказавшись в вакуоли внутри клетки, *L. monocytogenes* секретирует холестерин-зависимый листериолизин О (LLO), обладающий двойной функцией: ингибцией развития фагосомы и образовании поры в мембране вакуоли. Используя листериолизин совместно с двумя фосфолипазами С, *L. monocytogenes* разрушает мембрану вакуоли и выбегает в цитоплазму клетки хозяина [5,16]. Микроб реплицируется в цитозоле и приобретает актиновую подвижность, используя актиновый цитоскелет клетки хозяина. В цитоплазме клетки происходит индукция поверхностного белка ActA, который, имитируя хозяйский фактор нуклеации актина, активирует Acp2/3 [6], индуцируя сборку актина в форме «актинового хвоста», напоминающего комету [32]. Актиновая подвижность дает возможность микробу распространяться из клетки в клетку через образование мембранного впячивания из первично инфицированной клетки в соседнюю, формируя двух-мембранную вакуоль, из которой микроб «убегает» и инициирует новый цикл [5,32]. *L. monocytogenes*, как показали последние исследования, обладает двумя формами паразитирования: цитозольным и вакуолярным.

После нескольких дней паразитирования в цитозоле бактерии резко прекращают продукцию ActA и захватываются в листерии содержащую вакуоль. В этой вакуоле происходит переход микроба в так называемое живое, но не культивируемое состояние (VBNC). В этом состоянии бактерии не удается обнаружить, используя рутинные методы культивирования [30]. При использовании модели мышинных

макрофагов в системе *in vitro* было показано, что при обработке инфицированных листериями клеток высокими дозами гентамицина происходил запуск образования VBNC с отбором бактериальных клеток в некультивированной форме [30]. Такой двойной цикл внутриклеточного паразитирования *L.monocytogenes* должен способствовать бессимптомному носительству этого микроба, что может быть очень опасным для беременных, а также сохранению микроба в организме-хозяина при проведении антибиотикотерапии.

Вакуолярные паразиты после проникновения в клетку сохраняются и размножаются в содержащих микробы вакуолях, избегая их слияния с лизосомой или изменяя окружение фаголизосомы. К ним относятся бактерии родов *Salmonella*, *Brucella*, *Coxiella*, *Chlamydia* [1]. Следует отметить, что процесс формирования фаголизосомы проходит через несколько стадий. Вскоре после проникновения микроба в клетку и формирования эндосомы наступает ранняя фаза, в течение которой связанная с ферментом ГТФазой RAB5 эндосома приобретает маркерный белок EEA1. Поздняя эндосома теряет RAB5, приобретая ГТФазу RAB7, лизосомо-ассоциированные гликопротеины LAMP1 и LAMP2 и вакуолярную АТФазу, которая проталкивает протоны в развивающуюся фагосому для понижения pH. В финале фагосома сливается с лизосомальными участками, приобретая катепсины и гидролазы, вакуолярная АТФаза понижает pH до 4,5 [1,9]. Стратегия внутриклеточного паразитизма направлена или на разрушение эндосомального каскада и ограничения созревания фагосомы на ранней стадии для избегания слияния с лизосомой, или изменения состояния фаголизосомы в случае слияния фагосомы с лизосомой, что реализуется у этой группы бактерий.

Рассмотрим, что происходит в процессе паразитирования внутри клетки у бактерий рода *Brucella*. Бруцеллы, возбудители бруцеллеза, проникают в организм человека через дыхательные пути, пищеварительный тракт и конъюнктиву. Бруцеллы не обладают ТЗСС, в процессе проникновения в организм прикрепляются к клеткам слизистой, связываясь с рецепторами, содержащими сиаловую кислоту и сульфатные остатки [15,42]. Связывание способствует активации ГТФазы, которая стимулирует сигнальный каскад, приводящий к реорганизации цитоскелета клетки, в результате мембрана клетки располагается вдоль поверхности бактерии. Интернализация бруцеллы в клетку происходит по zipper-подобному механизму (механизму молнии) [1]. После проникновения в фагоцитарную и нефагоцитарную клетки бруцеллы оказываются внутри мембранного образования, называемого содержащей бруцеллы вакуоли (БСВ) или (BCV). БСВ начинает продвигаться по эндосомальному пути, приобретая ранние и поздние эндосомальные мембранные маркеры, внутри нее происходит понижение pH до 4,5. На этом этапе внутриклеточного цикла она получает название эндосомальной БСВ (эБСВ). Несмотря на приобретение маркеров поздней эндосомы, ассоциированных с лизосомой мембранных протеинов 1 и 2 (LAMP1,2), которые контролируют слияние с лизосомой, эБСВ избегает слияния с лизосомой [9,20].

Под влиянием низкого pH начинается активация VirB оперона, синтезирующего Т4СС, через которую в клетку хозяина через мембрану эБСВ поставляются эффекторные молекулы для модуляции клеточных функций и биогенеза БСВ. Т4СС бруцелл не требуется микробу для инвазии в клетку, но необходима для пролонгированной персистенции. Т4СС секретирует 15 эффекторных молекул, которые обеспечивают внутриклеточную персистенцию бруцелл. Эффекторные белки Т4СС участвуют в модификации внутриклеточного трафика, ограничивая слияние БСВ с лизосомой, а также способствуют выработке относительно низкого уровня

иммунного ответа, сигнального узнавания врожденного иммунитета [9]. Благодаря активности эффекторов T4CC eБСВ начинает терять эндосомальные маркеры с сопутствующим поддерживающим взаимодействием со структурами эндоплазматического ретикулума (ЭР), приобретая его мембранные маркеры, что показывает переход eБСВ в репликативную eБСВ. Эти структурные и функциональные изменения коррелируют с началом бактериальной репликации [15]. Следует отметить, что репликация внутриклеточных вакуолярных паразитов может происходить в узких и объемных вакуолях. У бруцелл вакуолярная мембрана окружает каждую бактерию, и репликация микроба сопровождается растяжением вакуолярной мембраны при делении, вызывая «инкапсулирование» каждого потомка, формируя узкую вакуоль [9,15]. Объемные вакуоли содержат 2 и более бактерии, окруженные единой мембраной. Вслед за бактериальной репликацией наступает добавочная стадия внутриклеточного цикла бруцеллы — стадия захвата рБСВ серповидо подобными мембранными структурами, которая приводит к образованию мультимембранной вакуоли, напоминающую аутофагосому. Эта ремодулированная рБСВ получила название аутофаговой БСВ (аБСВ). Ее образование связано с выделением бактерии из инфицированной клетки и окончанием внутриклеточного цикла [9].

VirB оперон, кодирующий у бруцелл T4CC, состоит из 12 генов и расположен во 2 хромосоме. Он высоко консервативен у всех видов рода *Brucella*. T4CC секретирует 15 эффекторных молекул, которые обеспечивают внутриклеточную персистенцию бруцелл. Мутанты бруцелл, дефицитные по T4CC, хотя и способны инвазировать клетки хозяина, но не способны поддерживать внутриклеточный жизненный цикл и устанавливать репликативную нишу [29]. В биогенезе рБСВ принимают участие такие эффекторные молекулы T4CC, как RicA, необходимый для установления ЭР-производной репликативной БСВ, вырабатывая точное взаимодействие с органеллами секреторных путей; VspB регулирует биогенез рБСВ и внутриклеточную репликацию; SerA регулирует эБСВ трафик [9,10]. По мнению Delevoe C. et al. [12], T4CC требуется для выработки относительного низкого уровня иммунного ответа, сигнального узнавания врожденного иммунитета, играя, таким образом, решающую роль в ингибции врожденного иммунитета хозяина. Следует отметить, что присутствие в липиде А ЛПС бруцеллэлонгированных молекул жирных кислот приводит, как к уменьшению токсичности эндотоксина, так и к понижению врожденного иммунного ответа, вследствие того, ЛПС служит слабым агонистом для TLR4 [41]. В добавок к этому бруцеллы вырабатывают иммунорегуляторные факторы, которые супрессируют иммунный ответ. В ингибции врожденного иммунитета принимают участие эффекторные молекулы T4CC VseC, VtrA.

Эффекторный белок VseC участвует в активации ответа на неправильно свернутый белок [9]. VtrA содержат TIR (toll-interleukinreceptor) домен. VtrA действует на клеточный сигнальный адапторный белок MyD88 [8], вызывая ингибцию сигнального каскада узнавания клетки хозяина, приводя к нарушению TLR опосредованной продукции провоспалительных факторов [9,29,37,45,47].

Рассмотрим поведение еще одного представителя вакуолярных паразитов, который, в отличие от бруцелл, является абсолютным внутриклеточным паразитом. Это бактерии рода *Chlamydia*. Все хламидии обладают бифазным циклом развития, при котором они из экстрацеллюлярной инфекционной формы элементарного тельца (ЭТ) при попадании в клетку хозяина переходят в метаболически активное ретикулярное тельце (РТ) [19]. Трансформация ЭТ в РТ осуществляется внутри инфицированной хламидией клетке хозяина в образованной мембранной вакуоле, которую называют включением [11,17].

ЭТ и РТ хламидий морфологически и функционально различны. ЭТ способны сохраняться в экстрацеллюлярном пространстве, благодаря отличительному строению внешней мембраны, которая в два раза толще внешней мембраны других грамотрицательных бактерий. Это связано с присутствием во внешней мембране сети перекрестно связанных дисульфидными связями белков, образующих внешнемембранный комплекс, который обеспечивает резистентность ЭТ к осмотическому давлению и ригидность, необходимых для их внеклеточного жизненного цикла [25].

Несмотря на то, что ЭТ считаются метаболически неактивными, они содержат избыток белков, которые могут быть использованы при «взрыве» метаболической активности в случае проникновения в клетку хозяина и дифференцировке в РТ [44]. В процессе конвертации ЭТ в РТ внешнемембранный комплекс уменьшается в размерах, обеспечивая текучесть мембраны, что является необходимым условием для репликации РТ. РТ делятся бинарным делением. Внутри включения происходит накопление РТ, после чего наступает их реконверсия в инфекционное ЭТ. Реконверсия протекает в несколько стадий — от ранней до поздней [34]. Инфекционные ЭТ выделяются затем из клетки путем ее лизиса или выдавливания из включения [34]. Как ЭТ, так и РТ обладают третьего типа секреторной системой.

ЭТ содержит функционально активную ТЗСС, и активация секреции эффекторных молекул наступает быстро при контакте с клеткой хозяина и выключается после дифференцировки РТ в ЭТ [26].

В связи с ограниченной метаболической активностью ЭТ, секреторный аппарат и эффекторы, требуемые для процесса инвазии хламидии в клетку хозяина, должны быть упакованы в процессе конечной стадии реконверсии РТ в ЭТ [11]. Эффекторные молекулы хламидийной ТЗСС можно разделить на две категории: Тагр — связанный с процессом инвазии транслокационный актин, рекрутирующий фосфопротеин [48]; Inc класс эффекторов, которые опосредуют ключевые этапы взаимодействия хламидий с клеткой хозяина [3].

Контакт с клеткой хозяина, благодаря секреции ТЗСС, индуцирует ремодулирование актина, в результате чего происходит быстрая интернализация микроба [19]. Тагр секретируется в течение 1 минуты после контакта микроба с клеткой и подвергается фосфорилированию клеточными киназами. Фосфорилированный Тагр участвует в процессе нуклеации актина, который необходим для входа микроба в клетку. Этот процесс протекает с вербовкой регуляторов актина, в частности, белков семейства Wiskott-Aldrich [27,31]. Тагр синтезируется на поздней стадии конверсии РТ в ЭТ и быстро упаковывается в ЭТ [48].

После внедрения ЭТ в клетку включение начинает диссоциироваться от канонического эндосомасомального пути и передвигается к перинуклеарной области, при этом перехватывая материал из мультивезикулярных телец, липидных капель, эндоплазматического ретикула [11]. Для создания благоприятного взаимодействия паразит-хозяин хламидиям, как и другим вакуолярным внутриклеточным паразитам [1], необходимо манипулировать мембранным трафиком. Внутриклеточное обитание хламидий требует предотвращения слияния включения с лизосомой. В то же время, происходит продвижение слияния включения с другими компонентами клетки, такими как экзоцитарные везикулы, и слияния включений друг с другом для обеспечения сильного «бактериального удара». Такое слияние включений друг с другом обозначается как гомотипное [17]. В этих процессах ведущая роль принадлежит большой группе эффекторов ТЗСС, входящих в семейство Inc белков [11], которые способны связываться с мембраной включения. Inc белки являются участниками как гомотипного слияния, так и опосредованного SNARE белком мемб-

ранного слияния. SNARE представляет большую группу белков эукариотической клетки, ответственных за внутриклеточное слияние мембран [35]. Inc белки обладают состоящим из 40–60 аминокислотных остатков двудольным гидрофобным доменом с включенными в центре гидрофильными остатками. Гидрофобные домены транспортируются через T3CC в мембрану включения [11]. У хламидий обнаружены Inc белки, обладающие SNARE-подобными доменами. В частности, *C.trachomatis* кодирует 3 Inc белка со SNARE-подобными доменами [13]. IncA обладает двумя гомологичными SNARE — N-терминальным и C-терминальным, которые работают независимо в процессе мембранного слияния, но оба они требуются для гомотипного слияния. C-терминальный необходим для осуществления IncA олигомеризации и слияния множества включений в одно.

Обобщая изложенный материал, можно сделать заключение, что алгоритм поведения бактерии-паразита внутри клетки не зависит от того, является ли бактериальный внутриклеточный паразит абсолютным или факультативным. Обращает на себя внимание тот факт, что многие внутриклеточные бактериальные паразиты обладают структурами, которые имитируют структуры клетки хозяина. Тем самым, эти структуры функционируют как функциональные блокаторы, приспособлявая клетку хозяина для своего существования в ней. К таким структурам относятся обнаруженные у хламидий Inc белки, обладающие SNARE-подобными доменами [13]; эффекторный белок T4CC бруцелл, BtpA, который содержит TIR (toll interleukin receptor) домен [9]; белок Sca2, обладающий аминокислотным подобием белку формину у риккетсий [23]; белок RickA, обладающий аминокислотным подобием с WASP у риккетсий [38]. Эволюционное происхождение таких структур представляет интересный вопрос, который может быть разрешен в ходе дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойченко М.Н., Кравцова Е.О., Волчкова Е.В. и др. Некоторые молекулярные механизмы паразитирования бактерий внутри цитоплазмы клетки хозяина. Инфекционные болезни. 2018, 16(2): 92-97.
2. Бойченко М.Н., Кравцова Е.О., Волчкова Е.В., Белая О.Ф. Некоторые вопросы молекулярного патогенеза внутриклеточного паразитизма бактерий. Инфекционные болезни. 2017, 15(4):71-75.
3. Bastidas R.J., Elwell C., Engel J., Valdivia R.H. Chlamydial intracellular survival strategies. Cold Spring Harb. Perspec. Med. 2013, 3: a010256.
4. Bernardini M.L., Mounier J., dHauteville H. et al. Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, 86:3867-3871.
5. Bierene H., Milohanic E., Kortebi M. To be cytosolic or vacuolar. The double life of *Listeria monocytogenes*. Front Cell Infection Microbiol. 2018, 9:136. doi: 10.3389/fcimb.2018.00136.
6. Campbell-Valois F.X., Sachse M., Sansonetti P.J., Parsot C. Escape of actively secreting *Shigella flexneri* from ATG8/LC3- positive vacuoles formed during cell-to-cell spread is facilitated by IcsB and VirA. MBio. 2015, 6: e02567-e2514.10.1128/mBio.02567-14.
7. Campellone K.G., Welch M.D. A molecular arms race: cellular control of action assembly. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010, 11: 237-251. doi:10.1038/nrm2867.
8. Castaneda-Roldan E.I., Avelino-Flores F., Dall'Agnol M. et al. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. Cell Microbiol. 2004, 6:435-445.
9. Celli J., de Chastellier C., Franchini D.-M. et al. *Brucella* evades macrophages killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J. Exp. Med. 2003, 198: 545-556.
10. Dai V., Li Z. Conserved type III secretion system exerts important roles in *Chlamydia trachomatis*. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2014, 7(9): 5404-5414.
11. De Barsey M., Jamet A., Filopon D. et al. Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. Cell Microbiol. 2011, 13:1044-1058.

12. Delevoeye C., Nilges M., Dehoux P. et al. SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoSPathog.* 2008, 4: e1000022. doi:10.1371/journal.ppat.1000022.
13. Derivery E., Gautreau A. Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *BioEssays* 2010, 32:119-131. doi:10.1002/bies.200900123.
14. Dohmer P.H., Valguanera E., Czibener C., Ugalde J.E. Identification of a type IV secretion substrate of *Brucella abortus* that participates in the early stages of intracellular survival. *Cell Microbiol.* 2014, 16:396-410. doi:10.3389/fcimb.2006.00079.
15. Dumoux M., Clare D.K., Sabibil H.R., Hayward R.D. Chlamydiae assemble a pathogen synapse to hijack the host endoplasmic reticulum. *Traffic*.2012, 13: 1612-1627.
16. Egile C., Loisel T.P., Laurent V. et al. Activation of the CDC42 effector N-WASP by Shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J.Cell.Biol.* 1999, 146:1319-1332.
17. Elwell C., Mirrashidi K., Engel J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016 Jun; 14(6): 385-400. doi:10.1038/micro.2016.30.
18. Figueiredo P., Ficht Th. et al. Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis. *Am. J. Pathol.* 2015, 185(6);1505-1517.
19. Goldberg M.B., Barzu O., Parsot C., Sansonetti P.J. Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a Shigella flexneri protein involved in intracellular movement. *J.Bacteriol.* 1993, 175:2189-2196.
20. Gouin E., Egile C., Dehoux P. et al. The RickA protein of Rickettsia conorii activates the Arp2/3 complex. *Nature.* 2004, 427: 29. doi:10.1038/nature02318.
21. Haglund C.M., Choe J.E., Skau C.T. et al. Rickettsia Sca2 is a bacterial formin-like mediator of actin-based motility. *Nat. Cell Biol.* 2010, 12:10578-1063. doi: 10.1038/ncb2109.
22. Herve Agaisse. Molecular and Cellular Mechanisms of Shigella flexneri Dissemination. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2016, 6:29.
23. Huang Z., Chen M., Li K. et al. Cryo-electron tomography of Chlamydia trachomatis gives a clue to the mechanism of outer membrane changes. *J. Electron. Microsc. (Tokyo).* 2010, 59: 237-241.
24. Ireton K. Molecular mechanisms of cell-cell spread of intracellular bacterial pathogens. *Open Biol.* 2013 Jul; 3(7) 130079. doi: 10.1098/rsob.130079.
25. Jiwani S., Ohr R.J., Fischer E.R. et al. Chlamydia trachomatis Tarp cooperates with the Arp2/3 complex to increase the rate of actin polymerization. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 2012, 420: 816-821.
26. Kleba B., Clark T.R., Lutter E.I. et al. Disruption of the Rickettsia rickettsii Sca2 autotransporter inhibits actin-based motility. *Infect. Immun.* 2010, 78:2240-2247. doi:10.1128/IAI.00100-10.
27. Kohler S., Foulongne V., Ouahrani-Bettache S. et al. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucellasuis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99:15711-15716.
28. Kortebi M., Milohanec E., Mitchell G. et al. Listeria monocytogenes switches from dissemination to persistence by adopting a vacuolar lifestyle in epithelial cell *Plos.Pathog.* 2017, nov 30; 13(11)e 1006734. doi: 10.1371/journal.ppat1006734.
29. Lamason R.L., Welch M.D. Actin-based motility and cell-to-cell spread of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 2017 Feb; 35: 48-57. doi:10.1016/j.mib.2016.11.007.
30. Lambrechts A., Gevaert K., Cossart P. et al. Listeria comet tails: the actin-based motility machinery at work. *Trends Cell Biol.* 2008,18: 220-227.
31. Mattock E., Biocker A.J. How do the virulence factors of Shigella work together to cause disease? *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017,7:64.
32. Nans A., Ford C., Hayward R.D. Host-pathogen reorganization during host cell entry by Chlamydia trachomatis. *Microbes Infect.* 2015. Nov-Dec 17 (11-12): 727-731. doi:10.1016/Jmicr.2015.08.004.
33. Nickel W., Weber T., McNew J.A. et al. Content mixing and membrane integrity during membrane fusion driven by pairing of isolated v-SNAREs and t-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, 96:12571-12576. doi:10.1073/pnas.96.22.12571.
34. Ogawa M.T., Yoshimori T., Suzuki T. et al. Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science.* 2005, Feb4, 307(5710):727-731. doi:10.1126/science/1106036.
35. Rana R.R., Zhang M., Spear A.M. et al. Bacterial TIR-containing proteins and host innate immune system evasion. *Med. Microbiol. Immunol.* 2013, 202:1-10.
36. Reed S.C.O., Lamason R.I., Risca V.I. et al. Rickettsia actin-based motility occurs in distinct phases mediated by different actin nucleators. *Curr. Biol.* 2014, 24: 98-103.

37. Roehrich-Doenitz A.D. Regulation of Type III Secretion Hierachy in *Shigella flexneri*. Ph.D.thesis. University of Bristol, 2013.
38. Roehrich-Doenitz A.D., Guillosoy E., Blocker A.J., Martinez-Argudo I. *Shigella* IpaD has a dual role: signal transduction from type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation. *Mol. Microbiol.* 2013, 87:690-706. doi:10.1111/mmi.12124.
39. Rolan H.G. Tsohis R.M. Inactivation of the Tipe IV system reduces the Th1 polyrasation of immune responses to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immunol.* 2008, Jul, 76(7):3207-3213. doi:10.1128/IAI.00203-08.
40. Rossetti C.A., Drake K.L., Adams L.G. Transcriptome analysis of HeLa cells response to *Brucella melitensis* infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the *Brucella* pathogenesis. *Microbes Infect.* 2012, 14:756-767.
41. Salcedo S.P., Marchesini M.I., Degos C. et al. Recent molecular insights into rickettsial pathogenesis and immunity. *Future Microbiol.* 2013, Oct. 8(10):1265-1288. doi:10.2217/fmb.13.102.
42. Saka H.A. et al. Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms. *Mol. Microbiol.* 2011, 82: 1185-1203.
43. Lepidi H. et al. BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013, 3:28.
44. Schroeder G.N., Hilbi H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by Type III Secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008, Jan; 21(1):134-156.
45. Snyder G.A., Deredge D., Waldhuber A. et al. Crystal structures of the Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domains from the *Brucella* protein TcpB and host adaptor TIRAP reveal mechanisms of molecular mimicry. *J. Biol. Chem.* 2014, 289:669-679.
46. Wang J., Zhang Y., Yu P., Zhong G. Immunodominant regions of *Chlamydia trachomatis* Type III secretion effector proteins, Tarp. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010, 17: 1371-1376.
47. Weber M., Faris R. Subversion of the endocytic and secretory pathways by bacterial effector proteins. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2018, 6:1. doi. 10.3389/fcell.2018.00001.
48. West N.P., Sansonetti P., Mounier J. et al. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science.* 2005, 307,1313-1318. doi:10.1126/science.1108472.

Поступила 31.05.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

М.П.Костинов^{1,2}, А.М.Костинов³, Д.В.Пахомов¹, В.Б.Полищук¹, А.М.Костинова⁴, А.Д.Шмитько¹, А.А.Тарасова⁵

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПНЕВМОКОККОВОЙ ВАКЦИНЫ У ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ И ИММУНОКОМПРОМЕНТИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова; ²Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; ³Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова; ⁴ГНЦ Институт иммунологии, Москва; ⁵Приволжский исследовательский медицинский университет, Н. Новгород

В статье приведён анализ многочисленных научных исследований, выполненных в России, по применению пневмококковой полисахаридной вакцины у иммунокомпетентных и иммунокомпроментированных пациентов. Новыми являются данные по оценке влияния вакцины на клинико-иммунологические аспекты при конкретной патологии у детей, что позволяет раскрыть механизмы, взаимосвязанные с эффективностью вакцинации.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 72—83

Ключевые слова: пневмококковая полисахаридная вакцина, пневмококковая инфекция, вакцинация

EFFICACY OF PNEUMOCOCCAL VACCINE IN IMMUNOCOMPETENT AND IMMUNOCOMPROMISED PATIENTS

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Sechenov First Moscow State Medical University; ³Lomonosow Moscow State University; ⁴State Scientific Centre Institute of Immunology, Moscow; ⁵Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

The article presents the analysis of numerous scientific studies carried out in Russia with the use of pneumococcal polysaccharide vaccine in immunocompetent and immunocompromised patients. New data are available to assess the impact of vaccines on clinical and immunological aspects in a particular pathology in children, which allows to reveal the mechanisms associated with the effectiveness of vaccination.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 72–83

Key words: pneumococcal polysaccharide vaccine, pneumococcal disease, immunization

Streptococcus pneumoniae продолжает быть ведущим патогеном развития пневмококковых инфекций, особенно у лиц с различными отклонениями в состоянии здоровья. Наиболее перспективным направлением в профилактике инвазивных и неинвазивных клинических форм заболеваемости оказались вакцины, содержащие ограниченное количество полисахаридных антигенов против наиболее агрессивных серотипов *S. pneumoniae*. Первой пневмококковой вакциной была 14-валентная полисахаридная, вошедшая в медицинскую практику в 1977 г., а в 1983 г. — 23-валентная полисахаридная вакцина (ППВ23). Оказалось, что данная вакцина не эффективна у детей до 2 лет, поскольку иммунная система у младенцев не способна реагировать на полисахариды, которые относятся к Т-независимым антигенам. В связи с этим, в 2000 г. были разработаны 7-10-13-валентные конъюгированные пневмококковые вакцины, высоко эффективные для детей с младенческого возраста и до глубокой старости, которые вошли в Национальные календари профилактических прививок большинства стран мира [55]. Однако, самые распространенные 13 серотипов, вошедшие в состав конъюгированной вакцины, не способны прикрывать остальные, хотя и реже встречающиеся, серотипы *S. pneumoniae*, имеющиеся в препарате ППВ23. В связи с этим, для пациентов с первичными и вторичными иммунодефицитными состояниями, которые являются одним из наиболее уязвимых контингентов, рекомендовано дополнительно однократное применение ППВ23 для лиц старше 2 лет [15, 26, 57, 58]. В настоящее время эти пациенты разделены на 2 группы, отличающиеся по схеме применения пневмококковых вакцин. *Иммунокомпетентные лица*: с хроническими сердечно-сосудистыми заболеваниями (включая застойную сердечную недостаточность и кардиомиопатию); хроническими заболеваниями лёгких (включая хроническую обструктивную болезнь лёгких и эмфизему); сахарным диабетом и другими метаболическими нарушениями; с хроническими заболеваниями печени (включая цирроз) и алкоголизмом; живущие в особых условиях среды или особых социальных условиях. Данной категории пациентов интервал между ранее проведённой вакцинацией с применением 13-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины (ПКВ13) и последующем введением ППВ23 должен составлять один год. *Иммунокомпроментированные лица*: со сниженным иммунитетом (иммунодефицитные состояния) при ВИЧ, лейкозах, лимфоме, болезни Ходжкина, множественной миеломе, злокачественных опухолях, хронической почечной не-

достаточности или нефротическом синдроме; получающие иммуносупрессивную химиотерапию (включая кортикостероиды), а также реципиенты после пересадки костного мозга или трансплантации органов); с кохлеарными имплантатами; с вытеканием спинномозговой жидкости; с функциональной или анатомической аспленией (включая серповидно-клеточную анемию и спленэктомия). Для указанной когорты больных интервал между ранее проведённой вакцинацией с применением ПКВ13 и последующим введением ППВ23 должен составлять 8 недель.

Результаты научных исследований, которые будут изложены ниже, проведены до начала регистрации конъюгированных пневмококковых вакцин на территории РФ, следовательно, дана истинная оценка эффективности применения ППВ23 и исключена вероятность получения бустеризирующего эффекта иммунизации с применением иных пневмококковых вакцин. Исследования, проведённые в основном в ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова при сотрудничестве с другими научными учреждениями РФ с 2000 г., касались изучения клинко-иммунологического эффекта вакцинации ППВ23 пациентов, имеющих различные изменения в состоянии здоровья.

Бронхолёгочные заболевания. Установлено, что однократное введение вакцины ПКВ23 у детей с хроническими неспецифическими заболеваниями лёгких (ХНЗЛ) в первые дни после завершения курса базисной терапии и достижения периода клинической ремиссии не сопровождается развитием необычных явлений в поствакцинальном периоде. Иммунизация приводит к снижению частоты обострений основного заболевания и случаев ОРИ в 1,6 — 2 раза. Введение вакцины ПКВ23 больным ХНЗЛ после завершения курса фармакотерапии способствует элиминации *S. pneumoniae* и *H. influenzae* в 88%, и в 60% случаев соответственно, а в остальных случаях приводит к переходу ассоциации микробов в монокультуру, при этом в группе непривитых элиминация отмечена у 40% и 32,5% больных (соответственно). Вакцинация сопровождается нарастанием уровня IgG к антигенам, входящим в состав вакцин, наиболее выраженным в подгруппах детей с их исходно низкими значениями. Тяжесть течения заболевания и проведённая ранее терапия не оказывают существенного влияния на антителообразование. Неспецифическое действие ПКВ23 у детей, больных ХНЗЛ, выражается в увеличении уровня IgG к клеточной стенке *S. aureus* и *S. epidermidis* и снижению уровня IgG к клеточной стенке *S. saprophyticus*, *Streptococcus spp.* и *E. coli*. Полученные результаты подтверждают эффективность включения вакцины в комплекс терапевтических и реабилитационных мероприятий у детей с хронической патологией органов дыхания [41,45-47].

Исследование микробного пейзажа мокроты и бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ) у детей с хронической патологией дыхательных путей показало, что *H. influenzae* выделяется в 51,3% и 40% случаев и *S. pneumoniae* — в 39,1% и 30%. Микст-формы чаще встречаются в БАЛЖ при доминировании *H. influenzae* в 42,8% и *S. pneumoniae* в 38,1% случаев. Среди выделенных пневмококков преобладали 1, 8, 19 серотипы, 1 и 8 серотипы *S. pneumoniae* были резистентны к антибактериальным препаратам одной и двух групп. Клинические штаммы *H. influenzae* чаще относились к IV биотипу. Для IV, II и I биотипов *H. influenzae* типа *b* характерна множественная антибиотикорезистентность, 11,36% штаммов *H. influenzae* продуцировали β-лактамазу. Сочетанная иммунизация с использованием ПКВ23 и вакцины против *H. influenzae* типа *b* (Акт-хИБ) сопровождается в течение года элиминацией *S. pneumoniae* и *H. influenzae* типа *b* в 71,42 — 100% случаев и снижением продолжительности обострения у детей с бронхиальной астмой (БА) в 3,4 раза, а у пациентов с пороками развития лёгких в сочетании с БА (ПРЛ+БА) — в 2,1 и ПРЛ — в 1,6, а

длительность курсов антибиотикотерапии в 2 раза. Введение бактериальных вакцин против пневмококковой и гемофильной типа *b* инфекций детям с ПРЛ+БА является безопасным и не приводит к развитию нежелательных явлений в поствакцинальном периоде. Отмечено, что у детей с хронической бронхолегочной патологией бактериальные вакцины оказывают иммуномодулирующее и иммунокорректирующее действие на фагоцитарную активность нейтрофилов и экспрессию молекул маркеров НК-клеток (CD₁₆), CD 3⁺, CD 4⁺, CD 8⁺, CD 19⁺, CD 25⁺, HLA-DR и сопровождаются активацией адаптивного иммунитета, проявляющейся синтезом IgM и IgG к вакцинным антигенам [20,21,35,44].

У детей с рецидивирующим бронхитом введение ПКВ23 приводит к изменению показателей мукозального иммунитета, что проявляется в нарастании уровней IgG, IgA и sIgA в слюне в 4,8; 1,5 и 2,1 раза соответственно в течение года после вакцинации. Применение иммуностимулирующего препарата Аффинолейкин в комплексном лечении детей с рецидивирующим бронхитом, с последующим введением ПКВ23 приводит к снижению частоты обострений рецидивирующего бронхита соответственно в 2,3-3,0 раза, случаев острых респираторных заболеваний — в 1,5-2,6 раза, позволяет сократить назначение антибактериальных химиопрепаратов в 2,8-6 раз. Иммунопотенцирующее действие иммунокорректирующего препарата Аффинолейкин при вакцинации против пневмококковой инфекции приводит к наиболее значимому (в 1,6-1,8 раза) нарастанию специфических IgG к полисахаридам, входящим в состав вакцины ПКВ23, сохраняющимся более 12 месяцев, без увеличения содержания сывороточного общего IgE. Следовательно, комбинированное назначение иммунокорректора и вакцинация у детей с рецидивирующим бронхитом приводит к усилению клинико-иммунологического эффекта вакцинации против пневмококковой инфекции [9,10,22,23].

У детей с лёгкой персистирующей и среднетяжёлой персистирующей бронхиальной астмой в течение первого месяца после введения ПКВ23 и вакцины против гриппа наблюдаются редкие (не более 13,3%) лёгкие и среднетяжёлые общие и/или местные реакции, одинаковые как при моно-, так и сочетанной иммунизации и вакцинация не сопровождается отягощением аллергического процесса. Вакцинация против пневмококковой и гриппозной инфекций приводит к уменьшению частоты обострений бронхиальной астмы на фоне респираторных инфекций соответственно в 1,8 и 1,5 раза, а их сочетанное введение в 2,1 раза; к улучшению клинического течения бронхиальной астмы (дневных и ночных симптомов, улучшению параметров внешнего дыхания у детей со среднетяжёлым течением заболевания; уменьшению объёма фармакотерапии при моновакцинации против пневмококковой инфекции у 21,7% пациентов, против гриппа — у 23,3%, при сочетанной вакцинации — у 36,7%), не ведёт к расширению спектра причинно-значимых аллергенов. Иммунопрофилактика, проводимая препаратами ПКВ23 и против гриппа у детей с бронхиальной астмой, способствует одинаковому уменьшению количества ОРИ в 1,8 раза, а при сочетанном применении — в 2,5 раза, бронхитов соответственно в 2,5, 1,8 и 4 раза. Введение ПКВ23 детям с бронхиальной астмой сопровождается уменьшением высеваемости *S. pneumoniae* в мокроте с 93,8 до 58,3%, а при её сочетании с препаратом против гриппа с 90,0 до 33,3%, что не наблюдается в группах сравнения и моновакцинации против гриппа. Поствакцинальные специфические IgG к полисахаридам, входящим в состав вакцины ПКВ23, в динамике характеризуется одинаковым увеличением их уровня как при моновакцинации ПКВ23, так и при сочетании с препаратом против гриппа, при этом через 6 месяцев двукратный прирост антител сохраняется у 37% детей, получивших иммунизацию только против

пневмококковой инфекции, при сочетанной — 60%, а через год у трети пациентов обеих групп. Установлено, что уровень IgG к полисахаридам вакцинных штаммов *S. pneumoniae* в поствакцинальном периоде различен в зависимости от тяжести бронхиальной астмы: через год у детей со среднетяжёлым течением прирост антител регистрировался только при моновакцинации ПКВ23, тогда как у больных с лёгким персистирующим течением он не зависел от схемы иммунизации пневмококковой вакциной. Важно отметить, что вакцинация детей с бронхиальной астмой не приводила к изменениям уровня общего IgE и сопровождалась уменьшением IgE к *S. pneumoniae* в первые 3 месяца при моновакцинации ПКВ23 и в течение 6-12 месяцев при сочетанном введении указанной вакцины и вакцины против гриппа [1—3,11,36,37].

Анализ наличия сенсибилизации к инфекционным аллергенам у детей, страдающих бронхиальной астмой показал, что в 78,4% выявлена полисенсибилизация к бактериальным аллергенам, в 11,4% — моносенсибилизация, при этом наиболее часто среди бактериальных аллергенов встречаются *S. pneumoniae* (42,3%), *H. influenzae* (39,7%), *K. pneumoniae* (38,4%), *S. aureus* (34,6%). Более высокая степень сенсибилизации к бактериальным аллергенам отмечена у пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением заболевания. Вакцинация ПКВ23 и против *H. influenzae* типа *b* (Акт-хИБ) не сопровождается развитием необычных реакций у детей с бронхиальной астмой, что свидетельствует о хорошей переносимости этих вакцин у данного контингента больных. Применение ПКВ23 способствует снижению тяжести течения бронхиальной астмы и частоты присоединения ОРИ в 1,5 — 2,5 раза у детей на протяжении более 12 мес. Вакцинация больных с бронхиальной астмой препаратами ПКВ23 и Акт-хИБ приводит к повышению IgG к антигенам, входящим в состав вакцин, и снижению общего уровня IgE и IgE к *S. pneumoniae* и *H. influenzae* типа *b* [25,33,34,42,43].

Сахарный диабет 1 типа. Вакцинация ПКВ23 или ее сочетание с вакциной против гриппа у детей и подростков с СД 1 типа, на фоне заместительной инсулинотерапии при достижении фазы компенсации (через 2 недели после их выхода из декомпенсации) и субкомпенсации, не сопровождалась развитием необычных явлений, не усугубляла характер течения СД 1 типа, не вызывала повышения содержания HLA-DR и аутоантител к нативной и денатурированной ДНК. Сочетанное введение вакцин не приводит к увеличению числа и интенсивности реакций в поствакцинальном периоде. После введения одной или двух вакцин одновременно у больных СД 1 типа отмечено снижение частоты случаев ОРИ (в 2,2 и 1,6 раза соответственно), их длительности и тяжести, уменьшению количества бактериальных осложнений ОРИ и эпизодов применения антибиотикотерапии (в 3,6 и 3,9 раза соответственно) в течение первого года после вакцинации. Дети и подростки, больные СД 1 типа, имеют нарушения в системе клеточного и гуморального иммунитета в виде супрессии Т-клеточной популяции и активации системы иммуноглобулинов. Через 1-1,5 месяца после иммунизации наблюдалась положительная динамика изначально сниженных показателей клеточного иммунитета, а через год — приближение к норме показателей гуморального иммунитета. При этом, вне зависимости от возраста, длительности течения диабета, фазы компенсации и наличия поздних сосудистых осложнений, дети и подростки с СД 1 типа способны адекватно отвечать на вакцинацию достаточным нарастанием титров противопневмококковых антител [29,30,49,51,54].

Заболевания почек. Клиническая эффективность вакцинации против пневмококковой инфекции и гриппа у детей, страдающих гломерулонефритом и хроничес-

кой почечной недостаточностью (ХПН), характеризуется достоверным снижением количества респираторных инфекций в 2,1 — 3,5 раза, их осложнённого течения, что способствует уменьшению в 4,5 раза доли рецидивов гломерулонефрита, связанных с инфекцией. Снижается потребность в назначения антибиотиках при терапии ОРИ. Вакцинация ПКВ23 в сочетании с вакциной против гриппа детей, больных гломерулонефритом и ХПН, безопасна: не вызывает увеличения частоты и тяжести рецидивов основного заболевания, не ведёт к повышению уровня аутоантител к ДНК. У пациентов с гломерулонефритом и ХПН выявлены иммунные нарушения в виде снижения показателей Т-лимфоцитов и повышения содержания сывороточных IgG в периоде ремиссии основного заболевания. Вакцинация ПКВ23 в сочетании с вакциной против гриппа у детей оказывает иммуномодулирующий эффект в виде снижения гуморальной активности и повышения количества общих CD3+ лимфоцитов. Уровни поствакцинальных антител у нефрологических пациентов через 1 и 12 месяцев после прививки достоверно отличаются от исходных значений. Однако интенсивность антителообразования ниже, чем у детей не имеющих хронических заболеваний. В группах детей с нефротической формой гломерулонефрита и азотемическими стадиями ХПН наблюдается более быстрое снижение поствакцинальных титров антител к пневмококку [4,16,17,27,28,32].

Ревматические заболевания. Вакцинация против пневмококковой инфекции и гриппа у данной группы детей клинически эффективна, снижает заболеваемость ОРИ и их осложнениями, потребность в антибактериальной терапии в 1,5 и 11 раз соответственно. Эффективность вакцинации выше у пациентов, болеющих более 5 раз в течение года. Снижается число госпитализаций по поводу обострений основного заболевания, количество обострений, связанных с ОРИ. Иммунизация безопасна, не ухудшает течения ревматических заболеваний, но возможны кратковременные артралгии на 3–4 неделях после вакцинации, не приводящие впоследствии к обострению основного заболевания. Сочетанное введение ПКВ23 и вакцины против гриппа не приводит к повышению содержания антител к нативной и денатурированной ДНК и значимым сдвигам в показателях клеточного и гуморального иммунитета. Интенсивность антителообразования у детей с ревматическими заболеваниями ниже, чем в группе сравнения, у пациентов с патологией респираторного тракта, однако средние геометрические уровни антител к полисахаридам вакцины ПКВ23 через 2 месяца и через год достоверно отличаются от исходных значений во всех группах вакцинированных. Одновременное введение вакцин ПКВ23 и полимерсубъединичной (иммуноадьювантной) вакцины против гриппа ухудшает антительный ответ к полисахаридам пневмококковой вакцины. Через год средние геометрические уровни антител в группе, получивших сочетанную вакцинацию, достоверно ниже, чем у пациентов, привитых ПКВ23. Получение иммуносупрессивной терапии в средних терапевтических дозах (метотрексат, преднизолон, их комбинации и другие) снижает иммунный ответ на вакцинацию, но сохраняет способность к двукратной сероконверсии титров специфических антител к полисахаридам пневмококков у 2/3 вакцинированных пациентов [18,19,52].

Вакцинация и иммуотропные препараты. Установлено, что формирование поствакцинальных антител к *S. pneumoniae* в высоких титрах зависит от нозологии и применяемой иммунокоррекции: у детей с ревматическими заболеваниями — при назначении Аффинолейкина иммунокорректирующего препарата, у детей с сахарным диабетом 1 типа — на фоне курса ИРС 19 топического иммунокорректора и Аффинолейкина иммунокорректирующего препарата, при почечной патологии — при использовании препаратов ИРС 19 топического иммунокорректора и вакцины

против гриппа. Применение иммунокорректирующих препаратов одновременно с вакцинацией против пневмококковой инфекции не приводит к повышению частоты и интенсивности поствакцинальных реакций на введение вакцины ПКВ23. Использование моновакцины против гриппа приводит к формированию иммунного ответа как у детей с патологией респираторного тракта (группа сравнения), так и у детей с сахарным диабетом 1 типа, ревматическими и почечными заболеваниями. Иммуносупрессивная терапия не снижает антителообразование к вирусам гриппа. У детей дошкольного возраста однократного введения вакцины против гриппа недостаточно для достижения уровня иммунной защиты. Отмечен клинический эффект вакцинации против пневмококковой инфекции в сочетании с иммунокорректорами, характеризующийся снижением заболеваемости респираторными инфекциями у детей, с сахарным диабетом 1 типа в 1,6-2 раза, с ревматической патологией — в 2-3,3 раза, с заболеваниями почек — в 1,7-3,9 раза, у пациентов с заболеваниями респираторной системы — в 1,5-2,7 раза; уменьшением числа осложнённого течения ОРВИ. Введение вакцины против пневмококковой инфекции у детей с сахарным диабетом 1 типа, ревматическими и почечными заболеваниями на фоне иммуносупрессивных препаратов не усиливает аутоиммунные процессы и оказывает иммуномодулирующее действие, что проявляется увеличением относительного числа субпопуляций лимфоцитов с фенотипом CD4⁺, снижением исходно повышенных уровней IgG, IgA, IgM в сыворотке крови при сохранении достигнутого эффекта не менее года [7,13,14,53].

ВИЧ-инфицированные и ВИЧ-контактные. Результаты ретроспективного и проспективного исследования вакцинации инактивированными препаратами ПКВ23 и Акт-Хиб детей ВИЧ-инфицированных матерей подтверждают безопасность их применения. Частота развития системных (общих) реакций не превышает 18,3% и не зависит от ВИЧ-статуса детей. Вакцинация ВИЧ-инфицированных детей (без иммунной недостаточности) указанными препаратами не сопровождается клинико-иммунологическими признаками прогрессирования ВИЧ-инфекции. Иммунологические показатели у детей с перинатальным ВИЧ-контактом в ходе вакцинального процесса претерпевают возрастные физиологические изменения, аналогичные группе здоровых сверстников. У ВИЧ-инфицированных выявлен замедленный синтез АТ, а проведённая ранее антиретровирусная терапия не оказывает существенного влияния на антителообразование. У не инфицированных ВИЧ перинатально детей динамика уровней антител аналогична здоровым детям. В ходе вакцинации детей с перинатальной трансмиссией ВИЧ сохраняется стойкая гипериммуноглобулинемия, уровни CD4⁺ субпопуляций лимфоцитов достоверно не изменяются. В отдалённые сроки после вакцинации регистрируются повышение CD8⁺ субпопуляций лимфоцитов, что характеризует естественное течение ВИЧ-инфекции. После завершения курса иммунизации ВИЧ-инфицированных детей частота сероконверсии к вакцинным антигенам гемофильной типа *b* инфекции — 89%, к полисахаридам пневмококковой инфекции — 83%, достоверно не отличались от уровней сероконверсии групп сравнения (здоровых). Средние значения поствакцинальных антител к большинству антигенов у ВИЧ-инфицированных детей оказались в 1,5 — 4,5 раза ниже, чем у детей групп сравнения. В течение года после иммунизации было отмечено снижение частоты ОРВИ на 36,4 — 34,6% соответственно (ВИЧ-контактные и ВИЧ-инфицированные), что свидетельствует о клиническом эффекте вакцинации [31,38 — 40,50].

Рецидивирующие отиты и хронические риносинуситы. У детей с рецидивирующими средними отитами (РСО) и рецидивирующими и хроническими риносинуситами (РиХР) в носоглотке носительство *H. influenzae* типа *b* составляет 26,3 — 30%, особен-

но у детей от 4 до 7 лет (30%), *S. pneumoniae* выделяется соответственно у 28,8-43,8%, максимально у детей от 2 до 3 лет — 43,8%. После применения комбинированной вакцинации препаратами ПКВ23 и Акт-Хиб частота встречаемости *H. influenzae* типа *b* и *S. pneumoniae* значительно снижается и составляет соответственно в возрасте 2-3 года 5,3% и 17,5%; 4 — 7 лет 8% и 13,3%. 8 — 12 лет 3,2% и 10,6%. Спустя 3 месяца после иммунизации отмечается полная элиминация β-гемолитического стрептококка группы А, а к концу года регистрируется не более чем 3,5% случаев. В поствакцинальном периоде у детей с РСО и/или РИХР отмечается нормализация клиничко-эндоскопического состояния структур носоглотки, объём глоточной миндалины приближается к возрастным нормам. Во всех возрастных группах преобладают клинически лёгкие катаральные формы воспаления: 75-83% при средних отитах, 68-75% при риносинуситах. Сезонная вакцинация против гриппа в сочетании с препаратами ПКВ23 и Акт-Хиб (для ранее не привитых пациентов) снижает частоту заболеваний респираторными инфекциями у наблюдаемых групп детей в среднем в 2-2,9 раза; частоту обострений рецидивирующих инфекций ЛОР-органов в 1,7-2,9 раза, сокращает (в 3-4 раза) суммарную продолжительность заболеваний в год, в 2-3 раза частоту и в 8-10 раз длительность использования антибактериальных препаратов системного действия [8,12,24,56].

Дети с носительством S.pneumoniae. В настоящее время доказано, что массовая вакцинация против пневмококковой инфекции с использованием конъюгированной вакцины значительно приводит к снижению носительства *S. pneumoniae* в популяции. Индивидуальное применение неконъюгированной полисахаридной пневмококковой вакцины не может оказывать популяционный микробиологический (влиять на микробиоту верхних дыхательных путей) эффект из-за ограниченного количества лиц вакцинированных и, конечно, отличия в механизме иммунного ответа при ее введении. Тем не менее, результаты исследований по изучению эффективности ПКВ23 при различных патологических состояниях у детей и взрослых, в том числе, часть из них указанных выше, доказывают, что вакцина способна повлиять на микробный пейзаж слизистых респираторного тракта и мокроты пациентов [5,6]. В исследовании, проведенном на Дальнем Востоке, среди детей дошкольного возраста распространённость бактерионосительства *S. pneumoniae* составляет 27,51%. Факторами риска, оказывающими влияние на формирование носительства *S. pneumoniae* у детей 3-7, лет явились хроническая ЛОР-патология в стадии ремиссии (61,2±4,0%, коэффициент корреляции Тау Кенделла 0,452) и отягощённый аллергический анамнез (59,1±4,1%, коэффициент корреляции Тау Кенделла 0,412). У детей с бактерионосительством обнаружен дисбаланс цитокинового статуса, проявляющийся гиперпродукцией TNF-α и низким уровнем IL-6 на местном уровне, дефицитом TNF-α, STNFR55, STNFR75 в системном кровотоке. У детей с хроническими заболеваниями ЛОР-органов на системном уровне отмечается гиперцитокинемия IL-6. Специфический гуморальный иммунитет у бактерионосителей пневмококка характеризуется снижением интенсивности антителообразования к полисахаридам сероваров *S. pneumoniae* 3, 6В, 9N, 23F и к полисахаридам ПКВ23, что указывает на недостаточность специфического иммунитета к *S. pneumoniae* у обследованных детей. Применение ПКВ23 у детей-носителей *S. pneumoniae* приводит к элиминации пневмококка в 83,3% случаев, снижению частоты обострений основного заболевания в 2 раза и случаев ОРИ у детей с аллергическими заболеваниями в 1,4 раза, с хроническими ЛОР-заболеваниями в 2,4 раза, восстанавливает процессы цитокиновой регуляции. Вакцинация способствует достоверному двукратному приросту IgM и IgG к полисахаридам, входящим в состав вакцины [48].

Несмотря на доказанные преимущества современных конъюгированных полисахаридных пневмококковых вакцин в профилактике инвазивных и неинвазивных пневмококковых инфекций, роль полисахаридных пневмококковых вакцин в расширении спектра защиты индивидуума к *S.pneumoniae* актуальна, а ПКВ23 остаётся пока необходимой и незаменимой в комплексе иммунизации иммунокомпетентных и иммунокомпроментированных пациентов. Результаты проведённых исследований подтверждают клиническо-иммунологический эффект применения полисахаридной пневмококковой вакцины до эпохи внедрения конъюгированных вакцин. Можно предположить, что современные рекомендации ВОЗ и других организаций на последовательное применение конъюгированной и полисахаридной пневмококковой вакцины еще больше будет способствовать усилению ожидаемых клинических, микробиологических, иммунологических, социальных и других эффектов иммунизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Андреева Н.П., Петрова Т.И., Голубцова О.И., Кожевникова С.Л., Карпочева С.В., Магаршак О.О., Костинов М.П. Клиническая эффективность активной иммунизации против пневмококковой инфекции у детей с бронхиальной астмой. Медицинская иммунология. 2006, 8(2-3): 195.
3. Вакцинация взрослых с бронхолегочной патологией. Руководство для врачей. Под ред. М.П. Костинова. М., Арт студия Созвездие, 2013.
4. Вакцинация детей с заболеваниями почек. Пособие для врачей. Под ред. М.П. Костинова. М., МДВ, 2012.
5. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. Практическое руководство для врачей. 4-е изд. Под ред. М.П. Костинова. М., Медицина для всех, 2013.
6. Вакцинация против гепатита В, гриппа и краснухи взрослых пациентов с хроническими заболеваниями. Руководство. Под ред. М.П. Костинова, В.В. Зверева. М., МДВ, 2009.
7. Волкова О.Н., Тарасова А.А., Сулоева С.В., Костинов М.П., Намазова Л.С. Новые направления применения топических бактериальных лизатов. Инфекционные болезни. 2006, 4(4): 71-73.
8. Гаращенко Т.И., Костинов М.П., Ильенко Л.И., Кытько О.В., Гаращенко М.В., Фошина Е.П., Овечкина Н.В., Кац Т.Г. Профилактическое и терапевтическое использование гемофильной и пневмококковой вакцин у часто и длительно болеющих детей с рецидивирующими средними отитами. Вопросы современной педиатрии. 2006, 5(5): 24-28.
9. Голубцова О.И., Андреева Н.П., Костинов М.П., Костинов А.М. Результаты вакцинации против пневмококковой инфекции детей с рецидивирующим бронхитом. Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского. 2017, 96 (4): 146-150.
10. Голубцова О.И., Петрова Т.И., Костинов М.П. Потенцирование аффинолейкином эффективности вакцинации против пневмококковой инфекции у детей с рецидивирующим бронхитом. Медицинская иммунология. 2006, 8(2-3): 433-434.
11. Гущина Я.С., Маркелова Е.В., Костинов М.П., Ибрагимова Е.М. Возможности вакцинации детей с бронхиальной астмой. Тихоокеанский медицинский журнал. 2009, 4: 17-19.
12. Ильенко Л.И., Костинов М.П., Гаращенко М.В., Кытько О.В., Овечкина Н.В., Кац Т.П. Иммунизация вакцинами для профилактики пневмококковой, гемофильной инфекции и гриппа у часто и длительно болеющих детей с хронической и часто рецидивирующей неспецифической инфекционной патологией бронхолегочной системы. Вопросы современной педиатрии. 2006, 5(4): 27-30.
13. Иммунокоррекция вакцинального процесса у лиц с нарушенным состоянием здоровья. Под ред. М.П. Костинова, М., Группа МДВ, 2006.
14. Иммуномодуляторы и вакцинация. Под ред. М.П. Костинова, И.Л. Соловьевой, М., 4Мпресс, 2013.

15. Иммунопрофилактика пневмококковых инфекций. Учебно-методическое пособие. Под ред. Н.И. Брико. М., 2013.
16. Квасова М.А., Костинов М.П., Лукушкина Е.Ф., Тарасова А.А., Коровкина Т.И., Юшкова И.Ю., Лукачев И.В. Клиническая эффективность сочетанной вакцинации против пневмококковой и гриппозной инфекций у детей с острыми и хроническими гломерулонефритами и хронической почечной недостаточностью. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2009, 87(3): 75-79.
17. Квасова М.А., Костинов М.П., Тарасова А.А., Лукушкина Е.Ф., Прошагина В.С. Профилактическая роль вакцинации «Пневмо 23» среди детей с гломерулонефритами. Вопросы современной педиатрии. 2006, 5(1): 727-728.
18. Коровкина Т.И., Лукушкина Е.Ф., Костинов М.П., Тарасова А.А. Респираторные инфекции при ревматических заболеваниях и возможность их вакцинопрофилактики. Детские инфекции. 2005, 4(3): 58-60.
19. Коровкина Т.И., Тарасова А.А., Лукушкина Е.Ф., Костинов М.П. Иммунологический статус до и после вакцинации «Пневмо 23» у детей с ревматическими заболеваниями. Вопросы современной педиатрии. 2006, 5(1): 281.
20. Костинов М.П. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. Практическое руководство для врачей (1-е изд.). М., Медицина для всех, 1996.
21. Костинов М.П. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. Практическое руководство для врачей (3-е изд.). М., Медицина для всех, 2002.
22. Костинов М.П. Иммунокоррекция в педиатрии. Практическое руководство для врачей. М., Медицина для всех, 1997.
23. Костинов М.П. Иммунокоррекция в педиатрии: Практическое руководство для врачей, (2-е изд. допол.). М., Медицина для всех, 2001.
24. Костинов М.П., Малеев В.В. Нив-инфекция: вопросы вакцинопрофилактики. М., Медицина для всех, 1998.
25. Костинов М.П., Озерецковский Н.А. Клинико-иммунологическая эффективность иммунобиологических препаратов. Справочник. М., Миклош, 2004.
26. Костинов М.П. Новое в клинике, диагностике и вакцинопрофилактике управляемых инфекций. М., 1997
27. Костинов М.П., Лукушкина Е.Ф., Квасова М.А., Тарасова А.А., Коровкина Т.И. Оценка эффекта вакцинации против пневмококковой инфекции детей с хронической почечной недостаточностью и гломерулонефритами. Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. 2008, 3: 34-39.
28. Костинов М.П., Руснак Ф.И. Вакцинация детей с заболеваниями почек. Нефрология. 2016, 20(1): 24-35.
29. Костинов М.П., Сkochилова Т.В., Воробьева В.А., Тарасова А.А., Коровкина Т.И., Лукачев И.В., Юшкова И.Ю., Ванеева Н.П. Аутоантитела у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа после вакцинации против пневмококковой и гриппозной инфекций. Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. 2009, 2: 53-57.
30. Костинов М.П., Сkochилова Т.В., Тарасова А.А., Воробьева В.А., Коровкина Т.И., Лукачев И.В., Юшкова И.Ю., Ястребова Н.Е. Уровень антител к пневмококковой вакцине у детей и подростков с сахарным диабетом 1-го типа. Проблемы эндокринологии. 2009, 55(3): 17-21.
31. Костинов М.П., Снегова Н.Ф. Вакцинация детей, рождённых от ВИЧ-инфицированных матерей. Аллергология и иммунология. 2013, 2: 58-68.
32. Костинов М.П., Тарасова А.А., Квасова М.А. Лукушкина Е.Ф., Лукачев И.В., Коровкина Т.И., Юшкова И.Ю., Ястребова Н.Е. Иммунологический эффект пневмококковой вакцины у детей с острым и хроническим гломерулонефритами. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2010, 89(6): 92-98.
33. Лукачев И.В., Костинов М.П., Шабалина С.В. Бронхиальная астма и бактериальная инфекция. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2003, 3: 48-52.
34. Лукачев И.В., Костинов М.П., Шабалина С.В. Иммуностимуляция бактериальными вакцинами при патологии органов дыхания. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2003, 3: 49-53.

35. 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 вакцинации против гемофильной типа b и пневмококковой инфекцией у детей с хронической патологией органов дыхания. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2018, 97(2): 122-129.
36. Маркелова Е.В., Гушина Я.С., Костинов М.П., Журавлева Н.В. Клинико-иммунологический эффект вакцинации «ПНЕВМО 23» детей с атопической бронхиальной астмой. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005, 2: 83-85.
37. Маркелова Е.В., Гушина Я.С., Костинов М.П., Касснер Л.Н. Клинико- иммунологические аспекты применения поликомпонентной пневмококковой вакцины «ПНЕВМО-23» у детей с атопической бронхиальной астмой. Методические рекомендации. Владивосток, 2004.
38. Пахомов Д.В., Костинов М.П., Поддубиков А.В., Ванеева Н.П., Снегова Н.Ф., Никитина Т.Н., Зинкина Т.Н., Сулоева С.В. Безопасность и иммунологические эффекты вакцинации ВИЧ-инфицированных детей против пневмококковой инфекции. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2009, 88(5): 85-89.
39. Пахомов Д.В., Костинов М.П., Поддубиков А.В., Ванеева Н.П., Снегова Н.Ф., Никитина Т.Н., Зинкина Т.Н., Сулоева С.В. Иммунологический эффект вакцинации против пневмококковой инфекции у ВИЧ-инфицированных детей. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009, 2: 48-52.
40. Пахомов Д.В., Снегова Н.Ф., Костинов М.П. К проблеме эффективности вакцинации детей, рождённых ВИЧ-инфицированными матерями, и ВИЧ-инфицированных детей против пневмококковой инфекции. Риски и преимущества. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2005, 24(5): 53-54.
41. Протасов А.Д., Рыжов А.А., Жестков А.В., Костинов М.П. Влияние комплексной вакцинации против пневмококковой, гемофильной типа В инфекций и гриппа на клиническое течение хронической обструктивной болезни легких. Вестник современной клинической медицины. 2012, 5(2): 22-24.
42. Расширение комплекса лечебно-профилактических мероприятий при бронхиальной астме у детей с применением вакцин «ПНЕВМО 23» и «Акт-ХИБ». Пособие для врачей. Под ред. М.П. Костинова. М., Медицина для всех, 2004.
43. Руководство по клинической иммунологии в респираторной медицине (1-е изд.). Под ред. М.П. Костинова, А.Г. Чучалина. М., ООО АТМО, 2016.
44. Руководство по клинической иммунологии в респираторной медицине. Под ред. М.П. Костинова, А.Г. Чучалина (2-е изд. допол.). М., Группа МДВ, 2018.
45. Рыжов А.А., Катосова Л.К., Костинов М.П., Волков И.К., Магаршак О.О. Оценка влияния бактериальных вакцин «PNEUMO 23» и «АСТ-Н1В» на течение хронического воспалительного процесса органов дыхания у детей. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005, 3: 84-87.
46. Рыжов А.А., Костинов М.П., Волков И.К., Катосова Л.К. Применение вакцины Pneumo-23 при хронических обструктивных бронхолегочных заболеваниях у детей. Медицинская иммунология. 2002, 4(2): 254.
47. 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.
48. 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.
49. Сkochилова Т.В., Воробьева В.А., Костинов М.П., Тарасова А.А., Коровкина Т.И., Юшкова Ю.И., Лукачев И.В. Вакцинация против пневмококковой и гриппозной инфекций у детей и подростков с сахарным диабетом 1-го типа. Проблемы эндокринологии. 2009, 55(4): 6-10.
50. Снегова Н.Ф., Костинов М.П., Пахомов Д.В. Опыт вакцинации против пневмококковой инфекции у ВИЧ-инфицированных детей и детей ВИЧ-инфицированных матерей. Вопросы современной педиатрии. 2006, 5(1): 539-540.
51. Тарасова А.А., Костинов М.П., Волкова О.Н., Деулин М.С., Сулоева С.В., Маянская И.В., Толкачева Н.И. Возможности профилактики респираторных инфекций у детей с сахарным диабетом первого типа. Вопросы современной педиатрии. 2006, 5(6): 55-59.

52. Тарасова А.А., Костинов М.П., Коровкина Т.И., Лукушкина Е.Ф., Шмитько А.Д. Иммунологическая эффективность и безопасность вакцинации против пневмококковой инфекции у детей с ревматическими заболеваниями. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2015, 94(2): 110-115.
53. Тарасова А.А., Костинов М.П., Лукушкина Е.Ф., Скочилова Т.В., Сулоева С.В., Толкачева Н.И., Волкова О.Н. Применение местного респираторного иммуномодулятора у детей с сахарным диабетом 1-го типа. Вопросы современной педиатрии. 2006, 5(1): 569-570.
54. Тарасова А.А., Костинов М.П., Ястребова Н.Е., Скочилова Т.В. Эффект вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции у детей с сахарным диабетом 1 типа. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2007, 6: 45-49.
55. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Под ред. А.Г. Чучалина, В.В. Яснецова. Выпуск XVII. М., 2016.
56. Фошина Е. П., Костинов М. П., Поддубиков А. В. Влияние бактериальных вакцин на состояние микробиоценоза носоглотки и оценка их клинической эффективности у детей с хроническими риносинуситами и тонзиллофарингитами. Педиатрия. Журнал им. Г.Н.Сперанского. 2018, 97(2): 129-133.
57. 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. 2015. 2(25): 1-19.
58. ACIP recommendations on use PCV13 and PPS23 in immunocompromized adult. MMWR October 2012, 61(40): 816-818.

Поступила 14.06.19

Контактная информация: Костинов Михаил Петрович, д.м.н., проф.,
105064, Москва, Малый Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-41-49

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.Г.Абрамова¹, А.К.Никифоров^{1,2}, А.А.Мовсесянц³, И.М.Жулидов¹

БЕШЕНСТВО И АНТИРАБИЧЕСКИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ: ОТ ПРИВИВКИ ПАСТЕРА К СОВРЕМЕННЫМ BIOTECHNOLOGIЯM

¹Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

²Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова; ³Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва

В обзоре рассмотрены актуальные вопросы распространения бешенства в мире и Российской Федерации, этапы разработки и направления совершенствования имеющихся антирабических иммунобиологических препаратов, применяемых в медицинской практике для активной и пассивной иммунизации против бешенства. Современный уровень развития биотехнологии с применением методов молекулярной биологии и геной инженерии открывает перспективы конструирования новых безопасных эффективных антирабических препаратов с применением рекомбинантных технологий. Расширение спектра иммунобиологических препаратов против бешенства и их внедрение в практику здравоохранения будет способствовать ликвидации смертности людей от бешенства.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 83—94

Ключевые слова: бешенство, вирус бешенства, профилактика бешенства, антирабическая вакцина, антирабический иммуноглобулин, рекомбинантные технологии

RABIES AND RABIES IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS: VACCINATIONS PASTEUR TO THE CONTEMPORARY BIOTECHNOLOGY

¹Russian Research Institute for Plague Control «Microb», Saratov, ²Vavilov Saratov State Agrarian University; ³Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia

The review provides information on topical issues of rabies spread in the world and the Russian Federation, the stages of development and directions of improvement of available preventive anti-rabies immunobiological preparation used in medical practice for active and passive immunization against rabies. The current level of biotechnology development with the use of molecular biology and genetic engineering methods opens up prospects for the design of new safe effective anti-rabies drugs using recombinant technologies. Expanding the range of immunobiological drugs against rabies and their introduction into health practice will contribute to the elimination of human mortality from rabies.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 83—94

Key words: rabies, rabies virus, prevention of rabies, anti-rabies sera, anti-rabies immunoglobulin, recombinant technologies

Бешенство — древнейшая вирусная смертельная инфекция зоонозной природы, возбудителем которой является нейротропный вирус рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. Есть мнение, что бешенство начало формироваться более 70 млн лет назад в результате эволюционирования вирусов семейства *Rhabdoviridae* и их адаптации в направлении от растений к беспозвоночным, а затем позвоночным животным [16].

В настоящее время Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) признает 14 генотипов вируса бешенства, объединенных на основании филогенетического родства и антигенных характеристик в три филогруппы: I филогруппа — вирус классического (уличного) бешенства (RABV), распространенный в Европе, Азии, Северной и Южной Америке; лиссавирус европейских летучих мышей типа 1 (EBLV1), циркулирующий в Европе, в т.ч. в европейской части России; лиссавирус европейских летучих мышей типа 2 (EBLV2), также циркулирующий в Европе; вирус *Vokeloh Bat* (BBLV), выделенный от летучей мыши в Германии; вирус *Duvenhage* (DUVV), выделенный от укушенного летучей мышью человека и летучих мышей в Зимбабве и Южной Африке; лиссавирус австралийских летучих мышей, изолированный от людей в Австралии (ABLV); вирус Центральной Азии *Agavan* (ARAV); вирус Центральной Азии *Khujaud* (KHUV); вирус *Irkut* (IRKV), изолированный А.Д. Ботвинкиным в Восточной Сибири; II филогруппа — *Lagos bat* (LBV), циркулирующий среди собак, кошек и плотоядных летучих мышей в Центральной и Южной Африке; *Mokola* (MOKV), изолированный от человека, собак, кошек и землероек в Центральной и Южной Африке; вирус *Shimoni bat* (SHIBV) от летучей мыши в Африке; к III филогруппе отнесены наиболее отличающиеся представители рода *Lyssavirus*: вирус летучих мышей Западного Кавказа (WCBV), обнаруженный в Краснодарском крае, и *Icoma lyssavirus* (IKOV), выделенный в Танзании от африканской циветты. Кроме того, описаны новые вирусы, изолированные от летучих мышей, и которые, вероятно, будут классифицированы в рамках рода *Lyssavirus* — *Gannoruwa bat lyssavirus* (Шри-Ланка), *Lleida bat lyssavirus* (Испания), *Taiwan bat lyssavirus* (Тайвань) и *Kotolahti bat lyssavirus* (Финляндия) [47].

По данным ВОЗ, бешенство занимает одно из первых мест среди зоонозных инфекций, наносящих наибольший экономический ущерб. В совокупности нано-

симый ущерб складывается из потерь от падежа животных; затрат на отлов бродячих животных; вакцинацию домашних и диких животных; проведение диагностических исследований; постэкспозиционное лечение пациентов, контактировавших с больными или подозрительными на бешенство животными; проведение профилактических и карантинных мероприятий. Так, в США ежегодно на борьбу с бешенством тратится более 300 млн долларов; в Германии с 1983 по 2008 г. было потрачено 122 млн долларов на оральную вакцинацию диких животных, преимущественно лис; во Франции в период с 1988 по 1993 г. расходы на постэкспозиционное лечение, превентивную вакцинацию домашних и диких животных составили 261 млн долларов согласно программам, действующим в этих странах [46]. Благодаря действию подобных программ в большинстве стран Западной Европы бешенство среди типичных переносчиков (собак, лисиц) практически не регистрируется.

Ежегодно от бешенства на Земном шаре погибают до 60 тыс. человек, подавляющее большинство смертей приходится на страны Азии и Африки — 59,6 и 36,4% соответственно. Заболевания людей бешенством регистрируются более чем в 150 странах; свободными от данного заболевания являются некоторые островные государства (Япония, Новая Зеландия, Великобритания), ряд стран Северной Европы (Швеция, Норвегия), Антарктида [21]. В последние десятилетия угрозой представляет распространение вируса бешенства среди летучих мышей, данная проблема наиболее актуальна для США, стран Латинской Америки, Канады, некоторых стран Африки [22]. С недавних пор эпизоотии бешенства в популяциях летучих мышей зафиксированы также в Австралии и государствах Европы: Германии, Дании, Голландии, Испании, Франции, Словакии [34].

Самая сложная ситуация по бешенству на сегодняшний день отмечается в Азии, где ежегодно от бешенства умирают до 40 тыс. чел, а основными переносчиками вируса являются собаки [42]. ВОЗ совместно с Глобальным альянсом по борьбе с бешенством на конференции, состоявшейся в Женеве в 2015 г., поставлена глобальная цель — ликвидировать к 2030 г. смертность людей от бешенства после укусов собак в соответствии с намеченными практическими действиями в данном направлении [47].

На постсоветском пространстве в настоящее время доминируют очаги бешенства природного типа с тенденцией к увеличению их числа в связи с миграцией диких животных и вовлечением в эпизоотии новых видов животных, таких как барсуков, хорьков, рысей, бобров, медведей, лосей, нутрий. Природные эпизоотии бешенства протекают на территориях Беларуси, Молдовы, Украины, Казахстана, Эстонии, Литвы, Латвии [16]. Для Средней Азии и Закавказья, а также юга Казахстана характерно сочетание природных и антропоургических очагов бешенства собак [21]. Антропоургические очаги бешенства регистрируются и на юге Российской Федерации, хотя на эпидемический процесс бешенства в нашей стране, в основном, оказывают влияние природные очаги [10]. В России ежегодно регистрируется от 839 до 7633 случаев бешенства животных, 34,5% заболеваний приходится на лис, 18% — на собак, 14% — на крупный рогатый скот, 11% — на домашних кошек [34]. Наиболее неблагоприятными по бешенству регионами Российской Федерации являются территории Центрального (36 % случаев бешенства у людей), Южного (19 %), Приволжского (16 %) и Северо-Кавказского (13 %) федеральных округов [19]. Молекулярно-генетические исследования полевых изолятов вируса бешенства из различных регионов России подтверждают их принадлежность преимущественно к 1 генотипу (RABV), однако зафиксирована циркуляция лиссавирусов не 1 генотипа среди летучих мышей [10].

Всего в России за период с 1975 по 2017 гг. зафиксировано 502 случая смерти людей от бешенства, что составляет в среднем 12 случаев в год [9, 34]; 40,1% от общего числа смертей вызваны контактами с собаками, 33,3% — с лисами, 13,2% — с кошками, 7% — с волками, 5,5% — с енотами, по 0,4% — с полярными лисами и коврами. Отмечены 2 случая гибели людей от бешенства после укусов летучих мышей [11]. Сегодня имеет место тенденция к росту числа укусов дикими животными — в 2017 году зарегистрировано 9 884 таких случая (6,74 на 100 тыс. населения), что является признаком осложнения эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по бешенству [9].

Вирус бешенства передается человеку со слюной больного животного через укус, далее из мышечной ткани, достигнув нервных окончаний, вирус начинает распространяться центростремительно по центральной нервной системе, вызывая острый прогрессирующий энцефалит со смертельным исходом. В случае развития клинической картины бешенства способов неспецифического лечения на сегодняшний день не разработано, и при появлении признаков заболевания прогноз для пациента неблагоприятный. Из-за абсолютной летальности бешенства вопросы постэкспозиционной профилактики заболевания имеют исключительно важное значение. Единственным способом предотвратить заболевание людей бешенством является своевременное введение пациенту антирабических препаратов — вакцины и антирабического иммуноглобулина при укусах опасной локализации, что является единой мировой тактикой [14, 47]. По данным ВОЗ, до 20 млн человек в мире ежегодно получают антирабическое лечение, что позволяет предотвращать сотни тысяч случаев смерти от бешенства [47]. В Российской Федерации ежегодно в связи с укусами и контактами с больными или подозрительными на бешенство животными за антирабической помощью обращаются до 450 тыс. человек [7, 9].

Антирабические препараты, практическую ценность которых невозможно переоценить, прошли длительный путь непрерывного совершенствования. История вакцинации против бешенства началась в XIX веке, когда выдающийся французский микробиолог Луи Пастер поставил науку о бешенстве на прочную экспериментальную основу и создал методику предупреждения заболевания с помощью антирабических прививок, считающуюся одним из самых великих открытий в области медицины. В лаборатории Пастера путем многочисленных внутримозговых пассажей на кроликах взвеси мозга зараженного животного был получен частично аттенуированный вакцинный штамм вируса бешенства с укороченной и постоянной инкубацией для кроликов — фиксированный вирус. Штамм Пастера был передан для производства антирабической вакцины во многие страны мира, где в специальных лабораториях он поддерживается методом интрацеребрального заражения кроликов.

Первые антирабические вакцины типа Ферми, приготовленные из ткани мозга овец и других животных, содержали частично аттенуированный вирус бешенства с плохо контролируемым показателем остаточной вирулентности, что могло служить причиной развития у пациентов «лабораторного бешенства». Так, групповые случаи заболевания «лабораторным бешенством» в результате иммунизации людей вакциной типа Ферми с высоким остаточным инфекционным титром имели место в Бразилии в 1965 г. [14]. Разработка и внедрение в производство инактивированных вакцин явились значительным достижением в области вакцинопрофилактики бешенства. Наиболее широко в свое время в мировой практике здравоохранения применялась вакцина Семпла на основе инактивированного фенолом *virus fixe* из мозговой ткани кролика. Мозговые вакцины из-за содержания в них миелина нередко вызывали тяжелые неврологические осложнения у пациентов, и для сни-

жения реактогенности был налажен выпуск инактивированных вакцин на основе вируса из мозга новорожденных животных, однако и эти вакцины оказались энцефалитогенными [14]. Надо отметить, что мозговые вакцины до сих пор используют для профилактики бешенства у людей в Алжире, Эфиопии, Аргентине и Боливии, несмотря на рекомендации ВОЗ отказаться от их производства в связи с имеющимися побочными эффектами [47].

Очередным этапом совершенствования технологии изготовления антирабических вакцин явилось культивирование фиксированного вируса бешенства в тканях куриных и утиных эмбрионов (авианизированные вакцины). Утиная инактивированная антирабическая вакцина в свое время достаточно широко применялась для профилактики бешенства в США, с 1958 по 1971 г. данной вакциной были иммунизированы с лечебной целью 434 000 человек [29]. Недостатком данной вакцины является содержание в ней значительного количества балластных тканей утинового зародыша, способных вызывать у пациентов аллергические, общие генерализованные реакции и неврологические осложнения. В настоящее время авианизированные вакцины производят в Индии (PDEV, Lyssavac-N/Vaxirab и PCECV, Rabipur, Vaxirab-N) [47].

Принципиально новым этапом и настоящим прорывом в производстве вакцин явилось получение культуральных антирабических вакцин, чему способствовали успехи в разработке методик культивирования вируса *in vitro* в культуре клеток [14]. Первые культуральные вакцины были получены в конце 60-х годах XX века и до сих пор с успехом используются для профилактики бешенства во всем мире. На сегодняшний день в мировой практике производства антирабических вакцин для профилактики заболевания у людей вирус бешенства успешно репродуцируют на различных клеточных субстратах, среди которых: диплоидные клетки человека HDCV (Франция, Imovax; Индия, Rabivax; Китай, Chengdu Kanghua); первичные клетки почки сирийского хомячка РРНКCV (Россия, КОКАВ; Китай); перевиваемые клетки почечного эпителия африканской зеленой мартышки Vero PVRV (Франция, Veroxab; Индия, Indirab; Китай, SPEEDA; Бразилия); перевиваемые клетки почки сирийского хомячка ВНК-21 [47].

Отечественная концентрированная культуральная антирабическая вакцина КОКАВ, производство которой ведется с 1988 года, представляет собой концентрированный и очищенный вакцинный вирус бешенства Внуково-32, выращенный в первичной культуре клеток сирийских хомячков. По своим иммунобиологическим свойствам отечественная вакцина не уступает зарубежным аналогам, она характеризуется минимальным риском развития побочных реакций у пациента, хорошей переносимостью и высокой профилактической эффективностью. Имеются данные о разработке отечественной экспериментальной технологии производства культуральной антирабической вакцины на клетках перевиваемой линии Vero [20].

Культуральные вакцины признаны наиболее эффективными и безопасными, тем не менее, в научной литературе имеются сообщения о побочных эффектах после их применения. Так, зарегистрированы случаи возникновения нежелательных реакций в виде энцефаломиелитов после введения пациентам культуральной антирабической вакцины Rabipur (Индия), полученной на клетках куриных фибробластов [31]. По статистике, осложнения неврологического характера после вакцинации наблюдаются с частотой 1/500 тыс. пациентов; аллергические реакции регистрируются в 0,11 % случаях [23]. Отмечается, что у пациентов, привитых по показаниям антирабической вакциной Veroxab, полученной на клетках перевиваемой линии Vero, наблюдалось меньше нежелательных реакций, чем у привитых вакциной Abhayrab, полученной на диплоидных клетках человека [40].

Направления в совершенствовании производства имеющихся антирабических вакцин связаны с новыми подходами к селекции вакцинного вируса по количественному уровню экспрессии основного иммуногена вируса бешенства — гликопротеида [6]; поиском оптимальных субстратов для культивирования вируса и новых адьювантов [15, 45]; оптимизацией биотехнологических приемов очистки и фильтрации ростовых и поддерживающих сред [8].

В последние десятилетия интенсивное развитие биотехнологии и молекулярной биологии способствовало экспериментальным разработкам вакцин четвертого поколения — генно-инженерных вакцин с заданными свойствами. Разрабатываются вакцины как на основе рекомбинантного вируса бешенства, так и гибридные вакцины, где ген белка G встроен в геном других вирусов. Основной мишенью для модификаций при разработке вакцин на основе рекомбинантного вируса бешенства является гликопротеид, отвечающий за индукцию протективного иммунитета. Существуют два подхода при исследованиях в данном направлении. При первом разрабатываются инактивированные вакцины на основе вируса бешенства, в геном которого встроены две или три копии гена gpG, что усиливает иммунный ответ и увеличивает его продолжительность [30]. Во втором случае разрабатываются живые рекомбинантные вакцины на основе вируса бешенства с мутантной формой G-белка с аминокислотными заменами, в результате которых вирус теряет патогенность при сохранении высокой иммуногенной активности [25]. Живые рекомбинантные вакцины используют для иммунизации животных, применение их для вакцинации людей маловероятно ввиду опасности возникновения побочных эффектов. Так, C. Rupprecht et al. описывают случай возникновения прогрессирующих болей, эритемы, крупных волдырей, некроза на левом предплечье пациента вследствие случайного контакта с рекомбинантной живой вакциной при благоприятном исходе [39].

Для получения вакцин против вируса бешенства на основе вирусных векторов с успехом используют герпесвирусы, аденовирусы, поксвирусы, бакуловирусы, экспрессирующие протективный белок G вируса бешенства. Рекомбинантные вакцины V-RG (Vaccinia Rabies Glycoprotein — оспенный гликопротеин вируса бешенства) сконструированы путем введения в геном вируса оспы последовательности ДНК, кодирующей гликопротеин вируса бешенства [5]. Сегодня рекомбинантные вакцины являются наиболее экологически безопасными препаратами для борьбы с бешенством и применяются в ветеринарной практике для иммунизации диких плотоядных против бешенства во многих странах мира.

В 2015 г. были опубликованы данные о конструировании поливалентной рекомбинантной вакцины RABV/EBOV против вирусов бешенства и Эбола на основе инактивированного вируса бешенства с встроенным гликопротеидом вируса Эбола, иммуногенность которой подтверждена в доклинических испытаниях на мышах и приматах [49].

В последние десятилетия активно развиваются исследования в направлении конструирования антирабических ДНК-вакцин на основе плазмидного вектора, кодирующего G-белок вируса бешенства [24]. Для создания ДНК-вакцин используются хорошо изученные плазмиды грамотрицательных бактерий, чаще всего *Escherichia coli*. Плазмидная ДНК при попадании в организм животного индуцирует выработку в цитоплазме целевого продукта — протективного белка, однако клинические испытания многих вирусных ДНК-вакцин показали недостаточную эффективность иммунного ответа для защиты от вирусных инфекций. В связи с этим, проводятся научные исследования по повышению эффективности антирабических ДНК-вакцин [43].

При разработке новых антирабических рекомбинантных вакцин в качестве вакцинных кандидатов возможно использование вирусоподобных частиц (ВПЧ), способных индуцировать гуморальный и клеточный иммунные ответы [13]. ВПЧ представляют собой антигенные детерминанты вириона без фрагментов генома, что исключает возможность развития инфекционного процесса. При разработке ВПЧ, несущих антигены вируса бешенства, основным вопросом является получение с помощью плазмид или вирусных векторов стабильных клеточных линий для выработки целевого продукта, а также введение в состав ВПЧ различных молекулярных адьювантов. Интересны данные о применении для вакцинации животных против бешенства иммуносом, получаемых при использовании очищенного оболочечного белка вируса бешенства — гликопротеида [15]. Иммуносомы (виросомы) представляют собой оболочку вириона без нуклеиновой кислоты, прикрепленную к поверхности липосом. В эксперименте иммуносомы индуцировали строгоспецифичный гуморальный и клеточный ответ и обладали высокой протективной активностью.

Не менее интересным направлением является получение генно-инженерных антирабических вакцин на основе G-белка, синтезируемого в растениях; вирусные антигены попадают в макроорганизм через пищеварительный тракт, индуцируя иммунный ответ [17]. В качестве подобных «биофабрик» используют томаты, табак, морковь, кукурузу. В литературе имеются сведения о конструировании рекомбинантного вируса табачной мозаики со встроенными химерными пептидами, соответствующими эпитопам G-белка вируса бешенства. Поедание мышами шпината, пораженного рекомбинантным вирусом табачной мозаики, способствовало выработке у них иммунитета против бешенства. При тестировании «съедобной вакцины» на добровольцах в их крови были обнаружены вируснейтрализующие антитела против бешенства [50]. Трансгенные растения синтезируют G-белок вируса бешенства в количестве до 1% от общего содержания растительных белков, что позволяет рассматривать данный тип вакцин перспективным для оральной иммунизации. Однако необходимо отметить недостатки «съедобных вакцин», связанные с разрушением антигена при термообработке пищевого продукта и под воздействием кислой среды желудка, необходимостью периода «созревания» растительных вакцин, сложностью поиска оптимальной дозировки.

Важнейшим профилактическим препаратом, минимизирующим риск заболевания человека бешенством при укусах опасной локализации, является антирабический иммуноглобулин, применяемый в комбинации с антирабической вакциной [7]. В результате комбинированного постэкспозиционного лечения происходит формирование пассивного иммунитета против бешенства за счет введения специфических антител до начала проявления активного иммунитета в ответ на введение вакцины. Эффективность комбинированных прививок была показана еще в начале XX века, когда в СССР, Индии и Румынии были получены данные по снижению заболеваемости бешенством людей, укушенных больными животными, при назначении им антирабической сыворотки в комбинации с вакциной [14]. Однако недостаточно высокий уровень защитных антител в сыворотке и высокая реактогенность, сопряженная с большими объемами вводимой сыворотки, не позволили обосновать целесообразность внедрения комбинированного метода в практику здравоохранения. Дальнейшие исследования были направлены на получение очищенной и концентрированной сыворотки с более высоким титром вируснейтрализующих антител. В СССР в Московском НИИВС им. И.И. Мечникова в 50-х годах прошлого века М.А. Селимов с соавт. разработали технологию получения концентрированной лошадиной антирабической сыворотки, успешно прошедшей испытания в опытах

в Иране по программе ВОЗ, что способствовало признанию комбинированного способа лечения [41]. К этому же периоду относятся исследования М.А. Селимова по выделению из антирабической сыворотки гамма-глобулина, характеризующегося более выраженным лечебным эффектом по сравнению с сывороткой [14]. Рассматривая вопросы разработки профилактических антирабических препаратов и внедрения их в практику здравоохранения, нельзя не отметить неопределимый вклад в отечественную и мировую рабиологию выдающегося российского ученого-рабиолога Мидата Абдурахмановича Селимова, 100-летний юбилей которого пришелся на 2018 год.

Гетерологичный антирабический иммуноглобулин с 70-х годов XX века успешно применяется в мировом здравоохранении в схеме комбинированного постэкспозиционного лечения, а современные методы очистки и фильтрации, используемые при его производстве, способствуют снижению риска развития нежелательных побочных реакций у пациентов до 1—3% [47]. К примеру, в середине XX века частота возникновения поствакцинальных осложнений в ответ на введение иммуноглобулина животного происхождения составляла в среднем 46%, а в конце 80-х гг. — 6% [48].

На сегодняшний день в мировом здравоохранении для предупреждения заболевания людей бешенством наряду с гетерологичным иммуноглобулином применяют гомологичный препарат на основе сыворотки крови человека, иммунизированной антирабической вакциной. Гомологичный иммуноглобулин отличается хорошей переносимостью, низкой частотой поствакцинальных осложнений и применяется преимущественно в развитых странах. В развивающихся странах спрос на гомологичный иммуноглобулин, несмотря на преимущества его использования при комбинированном лечении, ограничен высокой стоимостью и небольшими объемами препарата, связанными с трудностями иммунизации волонтеров-доноров [47]. По этим же причинам отсутствует масштабное производство гомологичного АИГ в Российской Федерации, где весьма сложная эпизоотологическая обстановка по бешенству влечет за собой большое количество обращающихся за антирабической помощью и, следовательно, значительную ежегодную потребность в препарате.

Для снижения частоты нежелательных побочных реакций на введение гетерологичного АИГ предлагаются усовершенствованные технологии очистки препарата, предусматривающие максимальное удаление балластных примесей [28]. К настоящему времени в мировой и отечественной биотехнологической практике, в том числе в институте «Микроб», являющимся единственным производителем гетерологичного антирабического иммуноглобулина на территории Российской Федерации, разработаны технологии получения высокоочищенного гетерологичного АИГ на основе $F(ab')_2$ -фрагментов с низкими анафилактическими свойствами [4]. За рубежом препарат на основе $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина Favirab эффективно применяют для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей на Филиппинах [37].

Одним из направлений совершенствования качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина является применение для иммунизации животных-продуцентов рабического антигена на основе культурального вируса. S.K. Goel et al. описывают способ получения антирабической сыворотки от лошадей с применением в качестве антигена культуральных вакцин из клеток куриных эмбрионов Rabipur (Индия) и PVRV (Франция) на основе *virus fixe*, репродуцированного на перевиваемых клетках Vero [26]. Клетки перевиваемой линии Vero используют и отечественные ученые при разработке технологии получения культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов в производстве антирабического иммуноглобулина

[1, 3]. Авторы указывают на преимущество использования культурального антигена по сравнению с вирусной мозговой суспензией, позволяющего получать сыворотки с высоким уровнем защитной активности. Культуральный рабический антиген применяют в серийном производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина в Таиланде, при этом активность АИГ, получаемого с применением культуральных технологий, составляет не менее 200 МЕ/мл, что отвечает требованиям ВОЗ [33].

Есть мнение, что замена продуцентов-лошадей при получении антирабических гетерологичных сывороток на животных других видов позволит снизить реактогенность конечного продукта — специфического иммуноглобулина. Так, получены препараты кроличьего [32] и овечьего антирабических иммуноглобулинов [38] со сниженной реактогенностью, которые могут стать альтернативой иммуноглобулину из сыворотки крови лошади, а также гомологичному препарату, практически недоступному для населения в развивающихся странах. Японские ученые получили вируснейтрализующие антитела из желтка кур, иммунизированных рекомбинантным штаммом *E. coli*, продуцирующим гликопротеид вируса бешенства [35]. Разработанный метод, как отмечают авторы, является гуманным по отношению к животным, а также позволит получать эффективные антирабические препараты в тех развивающихся странах, в которых недоступен не только человеческий, но и лошадиный антирабический иммуноглобулин. Однако при масштабном производстве гетерологичного АИГ для получения больших объемов иммунной сыворотки и выделения из нее гамма-глобулина лошадь остается незаменимым продуцентом.

Важным вопросом является исследование эффективности использования моноклональных антител для постэкспозиционной профилактики бешенства в качестве альтернативы антирабическому иммуноглобулину [36]. Эксперты ВОЗ для постэкспозиционной профилактики бешенства рекомендуют использовать коктейль из моноклональных антител, содержащий по меньшей мере, два антитела против вируса бешенства [47]. По данным ВОЗ, препарат на основе моноклональных антител, полученный в Институте сывороток в Индии, прошел тестовые испытания и по эффективности не уступал гомологичному антирабическому иммуноглобулину [27].

Использование современных рекомбинантных технологий позволяет ученым создавать новые амбициозные проекты по разработке очищенных, безопасных препаратов против бешенства на основе гуманизированных антител. Гуманизация включает в себя модификацию чужеродных каркасных аминокислотных остатков при сохранении последовательностей антигенсвязывающих областей. В работах отечественных ученых С.В. Беневоленского с соавт. [2], П.Г. Свешникова с соавт. [12] изложены подходы к конструированию рекомбинантных гуманизированных антигенсвязывающих Fab-фрагментов антирабических антител, которые могут являться прототипом терапевтического средства для профилактики бешенства. На примере моноклонального антитела против гликопротеида вируса бешенства разработаны метод гуманизации антител и система их продукции в клетках дрожжей.

В последние десятилетия активно развивается область молекулярной иммунобиотехнологии, связанной с получением и использованием наноантител — уникального класса полнофункциональных антител размером 24 нм, состоящих исключительно из тяжелых цепей и присутствующих в норме наряду с обычными антителами в крови у представителей семейства Camelidae (Верблюдовые), а также у некоторых видов хрящевых рыб — скатов и акул [44]. Преимуществами наноантител являются их способность за счет малых размеров проникать в труднодоступные органы или ткани организма, стабильность, низкая иммуногенность, что указывает на

перспективу их использования в иммунотерапии вирусных заболеваний, в том числе бешенства. Отечественными учеными разработана технология получения тримеризованных однодоменных антител, специфически связывающихся с гликопротеидом вируса бешенства и нейтрализующих вирус, для чего была использована технология генерирования библиотеки однодоменных антител и последующего отбора последовательностей, кодирующих однодоменное антитело с заданной специфичностью с помощью метода фагового дисплея [18]. В результате эксперимента было установлено, что полученный инновационный препарат способен нейтрализовать вирус бешенства *in vitro* и защищать культуру клеток от инфицирования вирусом бешенства при концентрации 300 мкг/мл и выше, при этом вируснейтрализующая активность тримеризованного однодоменного антитела превышала аналогичный показатель у коммерческого иммуноглобулина из сыворотки крови человека.

Таким образом, на сегодняшний день в направлении поиска современных антирабических препаратов ведутся активные исследования, в том числе с привлечением разнообразных методов молекулярной биологии и генной инженерии. Применение в медицинской практике препаратов нового поколения, полученных с применением рекомбинантных технологий, пока рассматривается только как перспектива в силу их недостатков, к которым можно отнести небольшие объемы выхода целевого продукта, недостаточно высокий уровень специфической активности, сложные технологии получения и контроля, влияющие на конечную стоимость препарата. Тем не менее, достигнутые успехи открывают новые перспективы и задают вектор последующих исследований по конструированию новых эффективных и безопасных препаратов для предупреждения бешенства. Расширение спектра антирабических иммунобиологических препаратов, внедренных в медицинскую практику, будет способствовать полной ликвидации смертности людей от бешенства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Комиссаров А.В. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 2: 95-102.
2. Беневоленский С.В., Зацепин С.С., Клячко Е.В., Морозкина Е.В., Позднякова Л. П., Свешников П.Г., Солопова О. Н., Шемчукова О.Б., Ягудин Т.А. Гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты (fab) против вируса бешенства, изолированный фрагмент днк, кодирующий fab против вируса бешенства, клетка дрожжей, трансформированная фрагментом днк, и способ получения fab против вируса бешенства с использованием дрожжей. Патент РФ № 2440412, МПК С12N001/00. 25.03.2010.
3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Лобовикова О.А., Свинцов Р.А., Разживин А.В., Савицкая Л.В., Галкина М.В., Михеева Т.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н. Культуральный антиген в технологии получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 4 (114): 65-68.
4. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Савицкая Л.В., Галкина М.В., Минаева Л.Н., Михеева Т.А., Селезнёва А.Г., Жулидов И.М., Свинцов Р.А., Лазаренко Г.П., Брандзишевский Ю.В. Изучение анафилактических свойств F(ab')₂-фрагментов гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Проблемы особо опасных инфекций. 2009, 2: 65-67.
5. Горбачева П., Макаров В.В. Рекомбинантная антирабическая вакцина для оральной иммунизации лисиц. Ветеринарная патология. 2010, 2: 16-18.
6. Грибенча С.В., Лосич М.А., Грибенча Л.Ф., Непоклонова И.В. Новый принцип селекции вакцинного вируса на основе количественного уровня экспрессии G-белка — главного иммуногена вируса бешенства. Вопросы вирусологии. 2012, 2: 44-47.

7. Мовсисянц А.А., Бутырский А.Ю., Бондарев В.П., Олефир Ю.В., Постнова Е.Л., Мухачева А.В. К вопросу о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015, 5 (84): 85-89.
8. Мухачева А.В., Мовсисянц А.А., Алсынбаев М.М. Выбор оптимальных методов очистки белковых веществ, входящих в состав вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной (КОКАВ). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014, 3 (76): 84-88.
9. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад. М., Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.
10. Полещук Е.М., Броневец А.Д., Сидоров Г.Н. Современные особенности эпидемиологии бешенства в России. *Инфекционные болезни*. 2016, 14 (1): 29-36.
11. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Грибенча С.В. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России. *Вопросы вирусологии*. 2013, 3: 9-17.
12. Свешников П.Г., Ягудин Т.А., Морозкина Е.В., Клячко Е.В., Зацепин С.С., Беневоленский С.В., Шемчукова О.Б., Позднякова Л.П., Солопова О.Н. Получение гуманизированного Fab-фрагмента нейтрализующего антитела против вируса бешенства. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2010, 3: 185-190.
13. Седова Е.С., Шмаров М.М. Новые антирабические рекомбинантные вакцины. *Биопрепараты*. 2016, 16 (4): 219-229.
14. Селимов М.А. Бешенство. М., Медицина, 1978.
15. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. М., Библионика, 2007.
16. Скрипченко Г.С., Пономаренко А.И., Рыбакова Т.М., Авсенина Л.А., Лавренюк Е.Д. Исторические и современные аспекты бешенства. *Український медичний часопис*. 2003,4 (36): 61-68.
17. Стародубова Е.С., Преображенская О.В., Кузьменко Ю.В., Латанова А.А., Ярыгина Е.И., Карпов В.Л. Вакцины против бешенства: современное состояние и перспективы развития. *Молекулярная биология*. 2015, 49 (4): 577-584.
18. Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А., Метлин А.Е., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Тутьихина И.Л., Алексеева С.В., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Тримеризованное однодоменное антитело, специфически связывающееся с гликопротеином g вируса бешенства, нейтрализующее вирус бешенства. Патент № 2533802 РФ, МПК C07K16/10, A61K39/42. 20.11.2014.
19. Чернышова Е.В., Назаров Н.А., Метлин А.Е. Эпизоотическая ситуация по бешенству в России и анализ эффективности антирабической вакцинации среди домашних животных, вывозимых за границу. *Ветеринария сегодня*. 2013, 4: 49-51.
20. Шафеева Р.С., Фролова А.В., Хайбуллина С.Ф., Муллагулова М.Н. Культуральная антирабическая вакцина на клетках Vero. *Цитология*. 1994, 36 (6): 588.
21. Шестопалов А.М., Кисурина М.И., Груздев К.Н. Бешенство и его распространение в мире. *Вопросы вирусологии*. 2001, 2: 7-12.
22. Banyard A.C., Evans J.S., Luo T.R. et al. Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Viruses*. 2014, 6 (8): 2974-2990.
23. Consoles C.A., Bolzan V.L. Rabies review: immunopathology, clinical aspects and treatment. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2007, 13 (1): 5-38.
24. Ertl H.C.J. Novel vaccines to human rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009, 3 (9): e515.
25. Faber M., Faber M.L., Papaneri A. et al. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J. Virol.* 2005, 79 (22): 14141-14148.
26. Goel S.K., Sharma S., Singh U.S. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. *Biologicals*. 2003, 31 (4): 233-236.
27. Gogtay N.J., Munshi R., Ashwath Narayana D.H. et al. Comparison of a novel human rabies monoclonal antibody to human rabies immunoglobulin for postexposure prophylaxis: a phase 2/3, randomized, single-blind, noninferiority, controlled study. *Clin. Infect. Dis.* 2017, 66 (3): 387-395.

28. Hong H., Rooijackers E., Ke N. et al. Methods for the purification of equine rabies immunoglobulin: effects on yield and biological activity. *Biologicals*. 1994, 22: 1-6.
29. Hoskins J.M. Duck-embryo vaccine. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. Third ed. Geneva, WHO, 1973: 243-255.
30. Korak P., Bosch B., Cox M. et al. A recombinant rabies vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice. *Vaccine*. 2014, 32: 4644-4650.
31. Kumar R., Singh A.K., Pradhan R.N. et al. A case report of post Rabipur (purified chick embryo rabies vaccine) acute disseminated encephalomyelitis. *J. Assoc. Physicians. India*. 2015, 63 (1): 56-58.
32. Liu X., Liu Q., Feng X. et al. Rabbit anti-rabies immunoglobulins production and evaluation. *Trop. Biomed*. 2011, 28 (1): 138-148.
33. Luekrajat T., Wangsai J., Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin. In: *Laboratory techniques in rabies*. 4 th ed. Geneva, WHO, 1996: 401-404.
34. Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Alkhovsky S.V. et al. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology*. Elsevier Science Publishing, 2015.
35. Motoi Y., Sato K., Hatta H. et al. Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine*. 2005, 23: 3026-3032.
36. Nagarajan T., Marissin W., Rupprecht C. Monoclonal antibodies for the prevention of rabies: theory and clinical practice. *Antibody Technology Journal*. 2014, 4: 1-12.
37. Quiambao B.P., Dytioco H.Z., Dizon R.M. et al. Rabies post-exposure prophylaxis in the Philippines: health status of patients having received purified equine F(ab')₂ fragment rabies immunoglobulin (Favirab). *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2008, 2 (5): e243.
38. Redwan E.-R., Fahmy A., Hanafy A.E. et al. Ovine anti-rabies antibody production and evaluation. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis*. 2009, 32: 9-19.
39. Rupprecht C.E., Blass L., Smith K. et al. Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. *N. Engl. J. Med*. 2001, 345 (8): 582-586.
40. Sari T., Tulek N., Bulut C. et al. Adverse events following rabies post-exposure prophylaxis: A comparative study of two different schedules and two vaccines. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2014, 12: 659-666.
41. Selimov M.A. Efficacite de l'administration combinee de gamma-globulin de serum immune de cheval et de vaccin antirabiques chez des loups enragés. Extrait de «*La Revue de Medicine*». 1975, 10-11: 723-730.
42. Tenzin, Ward M.P. Review of rabies epidemiology and control in South, South East and East Asia: past, present and prospects for elimination. *Zoonoses Public Health*. 2012, 59 (7): 451-467.
43. Ullas P.T., Desai A., Madhusudana S.N. Rabies DNA vaccines: current status and future. *World Journal of Vaccines*. 2012, 2: 36-45.
44. Vanlandschoot P., Stortelers C., Beirnaert E. et al. Nanobodies®: new ammunition to battle viruses. *Antiviral Research*. 2011, 92: 389-407.
45. Wang X., Bao M., Wan M. et al. CpG oligodeoxynucleotide acts as a potent adjuvant for inactivated rabies virus vaccine. *Vaccine*. 2008, 26: 1893-1901.
46. WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. Geneva, World Health Organization, 2013. WHO Technical Report Series 982.
47. WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. Geneva, World Health Organization, 2018. WHO Technical Report Series 1012.
48. Wilde H., Chomchey P., Punyaratabandhu P. et al. Purified equine rabies immune globulin: a safe and affordable alternative to human rabies immune globulin. *Bull. of the WHO*. 1989, 67 (6): 731-738.
49. Willet M., Kurup D., Wirblich C. et al. Preclinical development of inactivated rabies virus-based polyvalent vaccine against rabies and filoviruses. *Journal of Infectious Diseases*. 2015, 212: 414-424.
50. Yusibov V., Hooper D.C., Spitsin S.V. et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine*. 2002, 20 (25-26): 3155-3164.

Поступила 08.05.19

Контактная информация: Абрамова Елена Геннадьевна, д.б.н., 410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)51-69-65.

Т.С.Чехляева^{1,2}, С.В.Шульга¹, Д.В.Ерохов¹, Н.Т.Тихонова¹, В.В.Зверев²

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА КРАСНУХИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ ЭЛИМИНАЦИИ КРАСНУХИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ВРОЖДЕННОЙ КРАСНУХИ

¹Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, ²Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

В обзоре представлен анализ генетического разнообразия вируса краснухи. Представлены исторические и географические сведения о циркуляции штаммов разных генотипов краснухи. Показана тенденция к сокращению генетического разнообразия вируса в мире как следствие реализации программы элиминации краснухи.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 95—102

Ключевые слова: краснуха, синдром врожденной краснухи, СВК, вирус краснухи, элиминация краснухи, генотип вируса краснухи

T.S.Chekhlyeva^{1,2}, S.V.Shulga¹, D.V.Erokhov¹, N.T.Tikhonova¹, V.V. Zverev²

GENETIC DIVERSITY OF RUBELLA VIRUS AT THE PRESENT STAGE OF RUBELLA ELIMINATION AND CONGENITAL RUBELLA PREVENTION PROGRAMS

¹Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

The review is devoted to an analysis of the genetic diversity of the rubella virus. Historical and geographical data of the circulation of various genotypes of the rubella virus were presented. The tendency to reduce the genetic diversity of the virus in the world as a result of the rubella elimination programs have been shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 95—102

Key words: rubella, congenital rubella syndrome, CRS, rubella virus, rubella elimination, rubella genotype.

Вирус краснухи относится к РНК-содержащим вирусам, вирусная РНК которого окружена капсидом и липопротеидной оболочкой. Вирион имеет экосаэдрический тип симметрии. Капсид образован капсидным белком (С), липопротеидная оболочка содержит два гликопротеина Е1 и Е2. Геном вируса представлен одноцепочечной РНК положительной полярности и помимо структурных белков (С, Е1 и Е2) кодирует два неструктурных белка Р150 и Р90. Длина генома краснухи составляет порядка 9765 нуклеотидов (нт) [10].

Впервые таксономическая принадлежность вируса краснухи была определена в 1975 г., он был отнесен к семейству *Togaviridae* как единственный представитель рода *Rubivirus*. Сходство в строении вирионов родов *Alphavirus* и *Rubivirus* позволило объединить их в одно семейство [11]. Однако накопление и анализ данных о молекулярно-генетических особенностях вируса краснухи привело к пересмотру его таксономической принадлежности Международным комитетом по таксономии вирусов (ICVT) и выделению его в отдельное семейство *Matonoviridae* [16].

Краснуха — антропонозная инфекция, возникающая при воздушно-капельной передаче вируса, клинически является легким заболеванием с умеренно выраженными явлениями интоксикации, катаральными явлениями и экзантемой. Часть случаев может протекать инapparантно. Патогномоничными признаками краснухи являются пятна Форхгеймера — участки энантемы на слизистой ротовой полости и болезненное увеличение шейных, заушных и затылочных лимфатических узлов. Заболевание в большинстве случаев имеет благоприятный прогноз. Осложнения краснухи встречаются достаточно редко, к ним относятся артрит и артритоподобные заболевания [19], отит [9], бронхопневмония [21], тромбоцитопеническая пурпура [8], поражения нервной системы (энцефалит [7], менингоэнцефалит [7], синдром Гийома-Барре [12] и пр.). Специфического лечения краснухи в настоящее время нет, показана изоляция больного на дому или в стационаре при тяжелом течении заболевания или совместном проживании с лицами из декретированных групп, симптоматическая терапия.

Большую значимость для общественного здравоохранения представляет краснуха у беременных из-за вероятности внутриутробного инфицирования плода, которое может стать причиной синдрома врожденной краснухи (СВК). Клинические проявления СВК многообразны и включают в себя поражения сердечно-сосудистой системы, нервной системы, эндокринной системы, органов дыхания, зрения и слуха. Риск развития СВК тем выше, чем меньше срок гестации на момент инфицирования. Особенно высокая частота поражений (порядка 60,9%) отмечена при инфицировании в первые 4 недели беременности, во второй месяц — 26,4% и в третий — 7,9% [2]. Самым надежным способом предупреждения СВК является вакцинация женщин детородного возраста.

Высокая контагиозность вируса краснухи и его тератогенное действие стали причиной инициации Европейским региональным бюро Всемирной организации здравоохранения (ЕРБ ВОЗ) в 2002 г. программы по предупреждению СВК в странах региона, а в 2004 г. в неё было включено достижение элиминации краснухи [6]. Некоторые страны Европейского региона наравне с программой ВОЗ приняли национальные программы элиминации инфекции. Так, в Российской Федерации в настоящее время действует Национальная программа элиминации кори и краснухи (2016–2020 гг.), целями которой являются [5]: достижение и поддержание устойчивого уровня sporadicческой заболеваемости корью и краснухой на территории страны в 2016 — 2018 гг.; верификация элиминации кори и краснухи на территории страны в 2019 — 2020 гг.

Достижение и поддержание высокого уровня ($\geq 95\%$) охвата двумя дозами вакцины против краснухи декретированных групп населения, организация эпидемиологического надзора, своевременное выявление и лабораторное подтверждение случаев инфекции являются ключевыми стратегиями элиминации краснухи и предупреждения СВК [28]. Благодаря реализации программы элиминации удалось значительно снизить показатели заболеваемости краснухой в странах Европейского региона, а в ряде стран — добиться элиминации инфекции. Количество случаев СВК в странах региона существенно снизилось вследствие снижения общей заболеваемости краснухой: с 2013 г. по 2017 г. в регионе было зарегистрировано всего 114 случаев рождения детей с СВК [3, 14]. В Российской Федерации последний случай СВК был зарегистрирован в 2015 г., а в 2019 г. по итогам проведения Европейской региональной комиссии по элиминации кори и краснухи было подтверждено достижение элиминации краснухи на территории страны в 2015 — 2017 гг.

Элиминация краснухи — основная задача, от достижения которой зависит успех программы по предупреждению СВК. Согласно критериям ВОЗ, под элиминацией

краснухи следует понимать отсутствие эндемичной передачи вируса на территории страны на протяжении по меньшей мере 36 месяцев в условиях высокоэффективного эпидемиологического надзора. Циркуляция штаммов вируса на территории региона на протяжении 12 месяцев и более при отсутствии данных, подтверждающих завозной характер инфекции, считается эндемичной.

Лабораторные исследования в рамках надзора за краснухой и СВК включают как определение специфических маркеров острой инфекции в сыворотке крови больных с подозрением на краснуху, так и молекулярно-биологические исследования, направленные прежде всего на определение генотипа вируса. Генетический мониторинг циркуляции диких штаммов вируса краснухи — важный элемент эпидемиологического надзора за инфекцией [26]. Информация, получаемая в результате генопирования вируса краснухи, позволяет отслеживать его циркуляцию на региональном и глобальном уровнях, дифференцировать в определенной мере местные и завозные случаи инфекции, является одним из ключевых элементов верификации элиминации.

С 2004 г. действует рекомендованный экспертами ВОЗ протокол гентипирования вируса краснухи посредством определения последовательности 739 нт гена, кодирующего оболочечный белок E1 (фрагмент 8731–9469 нт) и сравнения полученной последовательности с последовательностями тех же участков генома эталонных штаммов генотипов [24]. Исторически для генетической характеристики вируса использовались различные участки гена E1, однако для рутинного анализа с целью надзора рекомендовано использовать гипервариабельный участок гена. Полученные последовательности вирусного генома депонируются в международную базу данных эпиднадзора за краснухой на основе нуклеотидных последовательностей (RubeNS), созданную ВОЗ в сотрудничестве с Агентством защиты здоровья (Лондон, Великобритания) [1]. База данных RubeNS предоставляет пользователям наиболее полную информацию по генотипам вируса краснухи, а также эпидемиологические данные, демонстрирующие циркуляцию генетических вариантов вируса в глобальном масштабе. В базе данных RubeNS реализована возможность типирования, филогенетического анализа, поиска идентичных/родственных штаммов, анализа (в том числе ретроспективного) данных генетического мониторинга по странам и регионам ВОЗ.

Стандартизованная номенклатура вируса краснухи была предложена в 2004 г., первоначально она включала в себя 10 генотипов: 7 признанных (*recognized*) генотипов — 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2A, 2B и 3 предварительных (*provisional*) генотипа — 1a, 1g и 2c [24]. По мере накопления информации о генетическом разнообразии вируса краснухи номенклатура претерпевала изменения.

В настоящее время выделяют 2 клады, генетическая дистанция между которыми составляет 0,08–0,1, включающие в себя 13 генотипов: 10 генотипов в кладе 1 и 3 генотипа в кладе 2 (табл.) [23]. Клада 1 включает в себя 9 признанных генотипов «диких» штаммов (1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 1G) и 1 предварительный генотип — 1a. Клада 2 состоит из 3 генотипов: 2A, 2B и 2C.

Наименования штаммов краснухи осуществляется по стандартным правилам, благодаря которым любой исследователь способен определить время и место изоляции вируса [24, 26]: указывается источник полученной последовательности (RVi — изолят вируса на культуре клеток, RVs — образец биологического материала); город или любой другой населенный пункт, в котором зарегистрирован случай заболевания; код страны в формате ISO 3166; порядковый номер недели и год регистрации случая; при наименовании вакцинных штаммов вируса после имени ставится обозначение VAC; в случае выделения вируса от больного с СВК после имени ставится обозначение CRS.

Референс-штаммы вируса краснухи

Генотип	Действующий референс-штамм	Код доступа в системе Genbank
1a	RVi/Brussel.BEL/0.63/(VAC)	AF188704
	RVi/New Jersey. USA/0.61/(VAC)	M30776
	RVi/ Pennsylvania. USA/0.64/ (VAC)	JF727653
	RVi/ Toyama. JPN / 0.67/	AB047330
1B	RVi/Jerusalem.ISR/0.75/	AY968207
	RVi/Tiberias.ISR/0.88/	AY968209
	RVi/Bene Berak.ISR/0.79/	AY968208
1C	RVi/California.USA/0.91/	AY968212
	RVi/San Salvador.SLV/0.02/	AY968211
	RVi/Panama City.PAN/0.99/	AY968217
1D	RVi/Tokyo.JPN/0.90/	AY968214
	RVi/Saitama.JPN/0.94/	AY968216
1E	RVi/Shandong.CHN/0.02/	AY968210
	RVi/Kuala Lumpur.MYS/0.01/	AY968221
1F	RVi/Shandong.CHN/0.00/	AY968213
	RVi/Anhui.CHN/0.00/	AY968215
1G	RViKampala.UGA/20.01/	EF588978
	RVi/Ontario.CAN/27.05/	EF588970
	RVi/Minsk.BLR/29.04/	AM258945
1H	RVi/Minsk.BLR/28.05/2	AM258953
	RVi/Ryazan.RUS/09.08	HG326276
1I	RVi/Milan.ITA/46.92/	AY161360
	RVi/London.GBR/0.86/	AF039122
1J	RVi/Kagoshima.JPN/22.04/	AB285129
	RVi/Miyazaki.JPN/10.01/	AB285130
2A	RVi/Beijing.CHN/0.79/	AY258322
	RVi/Beijing.CHN/0.80/ VAC	AY258323
2B	RVi/TelAviv.ISR/0.68/	AY968219
	RVi/Washington.USA/16.00/	AY968220
	RVi/Anhui.CHN/0.00/2	AY968218
2C	RVi/Moscow.RUS/0.67/	DQ388279
	RVi/Moscow.RUS/0.97/	DQ085340

Данные о глобальном распространении генотипов вируса краснухи как в ретроспективе, так и в настоящее время, достаточно ограничены. В базе данных RubeNS содержится 3148 записей о нуклеотидных последовательностях участка 739 нт гена E1, многие из которых относятся к ранним вакцинным или лабораторным штаммам [1]. Эпидемиологический надзор и лабораторное подтверждение случаев краснухи реализованы в 106 странах мира, однако далеко не все страны осуществляют генотипирование циркулирующих в рамках надзора [15]. Со времени инициации программы элиминации краснухи и предупреждения врожденной краснухи в ряде стран и внедрения генетического мониторинга циркуляции вируса типировано порядка 2800 штаммов вируса [1].

Генотип 1а в настоящее время является единственным предварительным генотипом, который включает в себя штамм Wistar RA 27/3, используемый для изготовления живой краснушной вакцины, а также небольшое количество штаммов дикого типа, выделенных от больных краснухой в Монголии и Мьянме в 2000–2001 гг. Несмотря на эпизодическую изоляцию штаммов генотипа 1а от случаев, ассоциированных с вакцинацией, штаммы дикого типа не изолировались глобально с 2001 г.

Для генотипа 1а характерна неопределенность в филогенетических отношениях как с утвержденными генотипами, так и внутри группы [24]. Согласно существующей номенклатуре в качестве кандидатов в референс-штаммы генотипа 1а приняты RVi/Pennsylvania.USA/0.64/1а, RVi/Brussels.BEL/0.63/1а, RVi/New Jersey.USA/0.61/1а и RVi/Toyama.JPN/0.67/1а, которые формируют две группы в рамках одного генотипа [23].

Остальные 9 генотипов клады 1 в разные периоды были распространены как в отдельных странах, так и по всему миру. Некоторые из них глобально не изолировались более 15 лет, что позволяет классифицировать их как вымершие.

Первый штамм вируса, принадлежащий генотипу 1В, относится к лабораторным [18]. Впервые дикий штамм краснухи генотипа 1В был выделен в 1971 г. в Люксембурге. Дикие штаммы генотипа 1В эпизодически выделялись в некоторых европейских странах до 2001 г., в 2002 — 2008 гг. отмечалась нерегулярная изоляция в ЮАР и Конго. С 2008 г. штаммы генотипа глобально не изолировались.

Штамм генотипа 1С впервые был изолирован в 1986 г. в США. В 1990 г. штамм генотипа 1С был изолирован в Японии от импортированного случая, генотип не получил местного распространения [18]. По данным мониторинга циркуляции генотип 1С был признан эндемичным для стран Карибского бассейна и США. Последняя изоляция штамма генотипа 1С зафиксирована в 2005 г., что совпало с достижением элиминации эндемичной краснухи в Панамериканском регионе [22].

Генотип 1D известен с 1976 г., впервые выделен в Японии. Генотип был распространён в странах Восточной Азии (Япония, Китай, Южная Корея) до 1996 г., эпизодически изолировался в США, Канаде, Новой Зеландии [29]. В 1999 г. в Австралии был зарегистрирован случай краснухи, вызванный штаммом вируса генотипа 1D, после чего генотип в мире не изолировался и признан вымершим [26].

Генотип вируса краснухи 1Е впервые выделен в 1995 г. во Франции [27]. С 1995 г. по 2017 г. генотип характеризовался глобальным распространением. Однако с 2018 г. большинство случаев, связанных с генотипом 1Е, регистрируются преимущественно в Японии, реже в Китае, откуда экспортируются в другие страны.

Штаммы генотипа 1F, одного из самых «молодых» утвержденных генотипов, характеризовались эндемичной циркуляцией в Китае в 1999 — 2002 гг., в других странах не изолировались [29]. Генотип краснухи 1F в настоящее время признан вымершим [26].

Генотип 1G был выделен впервые в 1991 г. в Великобритании [13]. До 2016 г. генотип характеризовался глобальным распространением. Последняя изоляция произошла в 2016 г. в Германии, после чего данных об изоляции штаммов генотипа в мире нет.

Генотип 1H, впервые выделенный в Италии в 1991 г., характеризовался эндемичной циркуляцией в ряде стран СНГ (Россия, Беларусь, Казахстан, Киргизия) в 2004 — 2010 гг., эпизодически изолировался в Турции в 2001 г. [17, 31]. После 2010 г. в странах СНГ была достигнута элиминация эндемичной краснухи и, соответственно, отмечено прекращение циркуляции генотипа 1H. Предполагалось, что генотип также элиминирован глобально, однако в 2016 г. в Турции и в 2017 г. в России были

вновь изолированы штаммы генотипа 1Н. Штамм вируса, выделенный в России от спорадического случая, имел существенные отличия от штаммов, выделенных на территории страны до 2010 г. Данные эпидемиологического расследования, проведенного в отношении этого случая, указывают на его вероятное импортирование из Индии. Возможно, на территории Индии генотип 1Н активен в настоящее время, но ограниченность данных не позволяет подтвердить это предположение.

Первый штамм краснухи генотипа 1П изолирован в Великобритании в 1986 г. Информация о циркуляции штаммов генотипа ограничена, известно, что в 1991 — 1994 гг. штаммы генотипа 1П эпизодически выделялись в Италии и Германии [13]. Последний раз генотип 1П был зарегистрирован в Италии в 1994 г., в настоящее время признан вымершим [31].

Генотип 1J активно циркулировал в Японии в 2001 — 2004 гг., где и был впервые изолирован в 1997 г. [29]. В 2005 г. были отмечены вспышки в Испании и Бразилии, с 2010 по 2015 гг. штаммы генотипа циркулировали на Филиппинах, откуда эпизодически экспортировались в другие страны [20]. Последняя изоляция генотипа отмечена в 2016 г. в Индии.

Клада 2 включает в себя 3 генотипа: 2А, 2В и 2С. Генотип 2А включает в себя вакцинные штаммы BDR1 и BDR2, полученные в 1979-1980 гг. в Китае [30]. Штамм краснухи BDR2 используется для производства вакцины в Китае. Нет данных о существовании диких штаммов генотипа 2А.

Генотип 2В в настоящее время характеризуется глобальным распространением наряду с генотипом 1Е. Впервые генотип выделен в Израиле в 1968 г. [24]. В последние годы генотип 2В преимущественно циркулирует в странах Юго-Восточной Азии и Китае, на Африканском континенте, в Южной Азии — в регионах, не достигших элиминации краснухи. Заболеваемость в странах, свободных от эндемичной циркуляции, определяется преимущественно импортированием штаммов генотипа 2В.

Генотип 2С впервые изолирован на территории современной России в 1967 г. [29]. Следующая изоляция произошла только в 1997 г. [29]. В 1999-2005 гг. штаммы генотипа изолировались на ограниченном пространстве Западной Сибири, более нигде в мире зарегистрированы не были [4, 26].

Анализ данных о генетическом распространении вируса краснухи показывает, что в настоящее время из 13 известных генотипов циркулируют только 2 — 1Е и 2В, что демонстрирует успехи в контроле и элиминации краснухи в мире. Однако нельзя не учитывать то, что филогенетические отношения в рамках каждого из сохранившихся генотипов очень сложны из-за их глобальной циркуляции, и этот факт ограничивает анализ путей импортирования и связей внутри вспышки молекулярно-биологическими методами. Тенденция к глобализации циркуляции двух генотипов определяет сложность филогеографической кластеризации выделенных штаммов. Методы молекулярно-эпидемиологических исследований, предложенные в 2004 г., возможно, не являются оптимальными на современном этапе элиминации, возникает необходимость совершенствования существующей методологии молекулярных исследований в рамках эпидемиологического надзора за краснухой, в том числе с использованием методов секвенирования следующего поколения (NGS) [25].

ЛИТЕРАТУРА

1. База данных эпиднадзора за краснухой на основе определения нуклеотидных последовательностей (RubeNS). www.who-rubella.org.
2. Зверев В.В., Десяткова Р.Г. Врожденная краснуха. Бюллетень «Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики». 2004, 6 (36).

3. Компьютеризованная информационная система по инфекционным заболеваниям (ЦИСИЗ). <http://data.euro.who.int/cisid/>.
4. Лаврентьева И.Н., Семериков В.В., Жебрун А.Б., Фельдблюм И.В., Марков А.В. Краснуха в России: изменчивость возбудителя в период вакцинопрофилактики. *Журн. микробиол.* 2008, 3: 26-31.
5. Программа «Элиминация кори и краснухи в Российской Федерации» (2016 — 2020 гг.). https://rospotrebnadzor.ru/deyatelnost/epidemiological-surveillance/?ELEMENT_ID=5968.
6. Элиминация кори и краснухи и предупреждение врожденной краснушной инфекции. Стратегический план Европейского региона ВОЗ 2005-2010 гг. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0019/79030/E87772R.pdf.
7. Ai J., Xie Z., Liu G. et al. Etiology and prognosis of acute viral encephalitis and meningitis in Chinese children: a multicentre prospective study. *BMC Infect Dis.* 2017, 17(1): 494.
8. Boehlen F., Balavoine J.F, de Moerloose P. Severe thrombocytopenic purpura due to rubella infection in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2003, 2(2): 144-146.
9. Catlin F. Prevention of hearing impairment from infection and ototoxic drugs. *Arch Otolaryngol.* 1985, 111 (6): 377-384.
10. Dominguez G., Wang C-Y., Frey T.K. Sequence of the genome RNA of rubella virus: evidence for genetic rearrangement during togavirus evolution. *Virology.* 1990, 177: 225.
11. Fenner F., Pereira H.G., Porterfield J.S. et al. Family and generic names for viruses approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses, June 1974. *Intervirology,* 3(3), 193-198.
12. Figueiredo C.A., Klautau G.B., Afonso A.M. et al. Isolation and genotype analysis of rubella virus from a case of Guillain-Barré syndrome. *J. Clin. Virol.* 2008, 43(3): 343-345.
13. Frey T.K., Abernathy E.S., Bosma T.J. et al. Molecular analysis of rubella virus epidemiology across three continents, North America, Europe, and Asia, 1961-1997. *J. Infect. Dis.* 1998, 178 (3): 642-650.
14. Global and regional immunization profile. European Region. 2018. https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/data/gseurprofile.pdf?ua=1.
15. Global measles and rubella laboratory network support for elimination goals, 2010—2015. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2016, 91: 240-246.
16. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): Taxonomy release 2018b. <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/8266>.
17. Jin L., Thomas B. Application of molecular and serological assays to case based investigations of rubella and congenital rubella syndrome. *J. Med. Virol.* 2007, 79 (7): 1017-1024.
18. Katow S., Minahara H., Fukushima M. et al. Molecular epidemiology of rubella by nucleotide sequences of the rubella virus E1 gene in three East Asian countries. *J. Infect. Dis.* 1997, 176 (3): 602-616.
19. Marks M., Marks J.L. Viral arthritis. *Clin. Med. (Lond).* 2016, 16(2): 129-134.
20. Martinez-Torres A.O., Mosquera M.M., Sanz J.C. et al. Phylogenetic analysis of rubella virus strains from an outbreak in Madrid, Spain, from 2004 to 2005. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 47 (1): 158-163.
21. Pether J.V., Caul E.O., Betteridge T.J. et al. Fatal pneumonia after glandular fever and rubella. *Lancet.* 1989, 1(8648): 1210.
22. Rubella — Elimination of rubella and congenital rubella syndrome in the Americas. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10801:2015-elimination-rubella-congenital-syndrome-americas&Itemid=40721&lang=en.
23. Rubella virus nomenclature update: 2013. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2013, 32: 337-348.
24. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2005, 14: 126-132.
25. The role of extended and whole genome sequencing for tracking transmission of measles and rubella viruses: report from the Global Measles and Rubella Laboratory Network meeting, 2017. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2018, 93: 55-59.
26. Update of standard nomenclature for wild-type rubella viruses, 2007. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2007, 84: 216-222.
27. Vauloup-Fellous C., Hubschen J.M., Abernathy E.S. et al. Phylogenetic analysis of rubella viruses involved in congenital rubella infections in France between 1995 and 2009. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48 (7): 2530-2535.
28. World Health Organization. Global Measles and Rubella strategic plan 2012-2020. 2011. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44855/9789241503396_eng.pdf.

29. Zheng D.P., Frey T.K., Icenogle J. et al. Global distribution of rubella virus genotypes. *Emerging Infect. Dis.* 2003, 9 (12): 1523-1530.
30. Zheng D.P., Zhou Y.M., Zhao K. et al. Characterization of genotype II Rubella virus strains. *Arch. Virol.* 2003, 148 (9): 1835-1850.
31. Zheng D.P., Zhu H., Revello M.G. et al. Phylogenetic analysis of rubella virus isolated during a period of epidemic transmission in Italy, 1991-1997. *J. Infect. Dis.* 2003, 187 (10): 1587-1597.

Поступила 21.07.19

Контактная информация: Чехляева Татьяна Сергеевна,
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (495)452-28-26

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

К.В.Машилов¹, Т.А.Костинова^{1,2}

ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА ИНТЕРКУРРЕНТНЫХ ИНФЕКЦИЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; ²Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом

В обзоре на основании анализа современных эпидемиологических данных выявляются объективные предпосылки возрастания роли вакцинопрофилактики в повышении эффективности лечения различных форм туберкулеза у основных контингентов больных. Приводятся конкретные рекомендации и современные данные об эффективности и безопасности использования вакцин при лечении больных туберкулезом.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 102—108

Ключевые слова: вакцинопрофилактика, лечение, туберкулез, безопасность, эффективность

К.В.Mashilov¹, Т.А.Kostinova^{1,2}

VACCINE PROPHYLAXIS OF INTERCURRENT INFECTIONS OF RESPIRATORY TRACT IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Moscow City Scientific and Practical Center for Tuberculosis Control, Russia

In this review, on the base of analysis of the current epidemiological data, the objective preconditions of the growing role of vaccinal prevention in increasing of effectiveness of treatment of tuberculosis in the key groups of patient is elucidated. Here are actual recommendations and information about efficiency and safety of vaccines in treatment of tuberculosis.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 102—108

Key words: vaccinal prevention, treatment, tuberculosis, safety, effectiveness

Текущая эпидемиологическая обстановка по заболеваемости туберкулезом остается напряженной в большинстве стран [44, 47, 48, 50]. По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется более 10 миллионов новых случаев заболевания, что в определенный момент позволяло говорить о пандемии туберкулеза [46].

Показатель заболеваемости туберкулезом в мире колеблется в чрезвычайно широких пределах от 1287/100000 (Свазиленд) до 29/100000 (в странах Америки) [56].

Несмотря на четкую тенденцию снижения заболеваемости туберкулезом в Российской Федерации в последние десятилетия, это заболевание остается одной из важнейших проблем отечественного здравоохранения и сегодня.

Характерной особенностью текущей напряженной эпидемиологической обстановки по заболеваемости туберкулезом в РФ, как и во всем мире, служит продолжающееся ухудшение структуры заболеваемости. Для этого процесса типичны: повышение удельного веса обширных деструктивных процессов [49, 52], резкое увеличение числа больных с ВИЧ-ассоциированным туберкулезом [51, 56], распространение и возрастание количества штаммов микобактерий, резистентных к антибактериальным препаратам [53], которые вызывают развитие туберкулеза с тяжелым течением и значительно снижают возможности этиотропной терапии больных [43, 54].

Очевидно, что проблема лечения и профилактики интеркуррентных инфекций у больных туберкулезом в этих условиях становится еще более актуальной, чем раньше. Патогенетические и клинические особенности специфического туберкулезного инфекционного процесса [55] благоприятствуют развитию интеркуррентных заболеваний, которые в свою очередь осложняют и утяжеляют течение и лечение основного заболевания [13, 23]. Наличие хронических болезней органов дыхания у больных туберкулезом легких утяжеляет течение туберкулезного процесса, создает трудности в организации эффективной терапии и являются фактором риска формирования лекарственной резистентности микобактерий туберкулеза [14].

Так, ежегодно в осенне-зимний период наблюдается увеличение показателя смертности от легочного туберкулеза, связанное с циркуляцией вируса гриппа, при этом смертность среди пациентов с туберкулезом, ассоциированная с вирусом гриппа, составляет 164 на 10 000 больных в год [57]. Таким образом, одно из наиболее перспективных направлений повышения эффективности терапии туберкулеза — профилактика интеркуррентных инфекционных заболеваний, поражающих бронхолегочную систему, в частности гриппа и пневмококковой инфекции.

Грипп осложняет течение основного заболевания у больных туберкулезом, так как они входят в группу риска лиц с тяжелой бронхолегочной патологией, высоким риском возникновения осложнений специфического процесса после перенесенного гриппа, сопровождающегося появлением длительной выраженной интоксикации, кровохарканья, бактериовыделения, новых очагово-инфильтративных, деструктивных изменений в легких, увеличением сроков лечения [4]. Высокий риск возникновения осложнений специфического процесса после перенесенного гриппа свидетельствует об актуальности и необходимости иммунизации пациентов, страдающих туберкулезом легких, разработки оптимальных схем иммунопрофилактики гриппа у данной категории больных [9, 20]. К тому же, применение различных противовирусных препаратов не дает защиты от инфицирования конкретными штаммами вируса гриппа [1, 15, 17, 26].

Одной из эффективных мер борьбы с интеркуррентными инфекциями дыхательных путей и развитием осложнений туберкулеза является проведение вакцинопрофилактики управляемых инфекций среди больных туберкулезом. Эта мера особенно актуальна в детских противотуберкулезных учреждениях, где имеется многочисленная не иммунизированная и к тому же иммунодефицитная прослойка. Вышесказанное в полной мере относится и к учреждениям пенитенциарной системы.

Некоторые работы в этом направлении были выполнены отечественными исследователями и касаются вакцинации детского контингента [22]. По результатам иммунизации против пневмококковой инфекции и гриппа с использованием полисахаридной вакцины в сочетании со сплит-вакциной у детей из групп риска, инфицированных микобактерией туберкулеза, эффективность профилактики ОРИ, включая бронхиты и пневмонию, составила 93,8%, сократив заболеваемость в 13,9 раза.

Необходимость защиты пациентов с туберкулезом от вирусных и бактериальных инфекций давно признана и обусловлена рядом особенностей туберкулеза, к которым относятся хроническое течение, наличие латентных форм, склонность к внутриклеточному расположению возбудителя, изменение реактивности иммунной системы, полиморфизм клинических проявлений и многообразие клинических вариантов течения болезни [3, 34, 35, 40,41].

Однако на практике, отсутствие четких рекомендаций по тактике вакцинации детей с различными проявлениями туберкулезной инфекции и опасения, что иммунизация приведет к обострению основного заболевания или развитию тяжелых осложнений в поствакцинальном периоде, приводят к тому, что на практике отечественные педиатры остерегаются вакцинировать детей с туберкулезом. Так, в методических указаниях «Медицинские противопоказания к проведению профилактических прививок препаратами национального календаря прививок» [25] туберкулез не упоминается как самостоятельная нозология; если же рассматривать его как хронический процесс, то вакцинация откладывается до наступления ремиссии — полной или максимально достижимой, в том числе на фоне поддерживающего лечения. Зарубежные рекомендации также содержат довольно расплывчатые формулировки. Так в «Общих рекомендациях по иммунизации» ACIP и AAFP имеется лишь одно упоминание о том, что туберкулез при легком течении не является противопоказанием для проведения вакцинации [42]. Такая ситуация объективно обусловлена тем, что данная проблема еще относительно недавно оставалась весьма малоисследованной. Однако сегодня появились новые данные по этому вопросу.

Так, в настоящее время мы располагаем убедительными доказательствами того что течение поствакцинального периода у детей с латентной туберкулезной инфекцией и у детей больных туберкулезом привитых живыми и инактивированными вакцинами от дифтерии, паротита, кори и ветрянки, не отличались от такового у здоровых детей [12,45].

По данным литературы, переносимость трехвалентных инактивированных противогриппозных вакцин у больных туберкулезом легких не отличается от таковой у здоровых лиц [16, 24]. При этом сохраняется их высокая иммуногенность — защитные антитела к вирусу гриппа А(Н1N1) вырабатываются в 95,1% случаев, к штамму А(Н3N2) — в 81,9%, к вирусу гриппа группы В — в 94,4%, что свидетельствует об их высокой эффективности [24].

Анализ показателей эффективности лечения вакцинированных пациентов с туберкулезом органов дыхания (сроки нормализации температуры тела, общее состояние, исчезновение симптомов интоксикации, сроки абациллирования, закрытие полостей распада в легочной ткани, сроки стационарного лечения), клинико-рентгенологической динамики туберкулезного процесса, биохимических, гематологических показателей является обоснованным доказательством безопасности применения инактивированных гриппозных сплит- и полимерсубъединичных вакцин у больных туберкулезом. В настоящее время выявлены новые механизмы действия современных вакцин против гриппа — индукторы генов и факторов врожденного и

адаптивного иммунитета в клетках крови человека [33, 37, 38]. К тому же, доказано и длительное сохранение специфических антител [10,39].

По результатам иммунизации против пневмококковой инфекции и гриппа с использованием полисахаридной вакцины в сочетании со сплит-вакциной у детей из групп риска, инфицированных микобактериями туберкулеза, вакцинация вызывает минимум нежелательных явлений: только у 3% детей регистрировались незначительные местные реакции и менее чем у 1% — общие системные реакции. Начиная с 2002 года НИИ фтизиопульмонологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова профилактика пневмококковой инфекции и гриппа рекомендована для инфицированных микобактерией туберкулеза детей, часто болеющих неспецифическими инфекционно-воспалительными заболеваниями верхних и нижних отделов респираторного тракта [28].

В настоящее время для профилактики пневмококковой инфекции у взрослых пациентов, страдающих туберкулезом, в том числе легких, рекомендуется применять схемы, предлагаемые в соответствии с существующими рекомендациями для вакцинации иммунокомпрометированных пациентов, используя инновационную пневмококковую конъюгированную вакцину, имеющую фармакоэкономические преимущества перед неконъюгированной пневмококковой полисахаридной вакциной [19, 21, 30].

Пациенты в возрасте 19 лет и старше должны получить одну дозу пневмококковой конъюгированной вакцины (ПКВ13).

Тем, кто получил ранее 23-валентную пневмококковую полисахаридную вакцину (ППВ23), ПКВ13 следует вводить не ранее чем через год после последней дозы ППВ23. Через год после ПКВ13 может быть введена ППВ23, вторую дозу ППВ23 вводят через пять лет [5 — 8, 11, 29, 31, 32].

Вакцинация против вируса гриппа пациентов, больных туберкулезом, проводится в соответствии с инструкциями по применению препаратов. Использовать живые противогриппозные вакцины не рекомендуется, разрешается применение всех зарегистрированных инактивированных противогриппозных вакцин [27,36].

Возможно одновременное введение инактивированной противогриппозной и пневмококковой вакцин или других вакцин, особенно при возникновении неблагоприятных эпидемических ситуаций, разными шприцами в разные участки тела [18].

Вакцинация показана лицам, не имеющим острого заболевания, а также находящимся в ремиссии имеющихся хронических заболеваний (2—4 недели). Возможна вакцинация пациентов с инфильтративными и диссеминированными формами туберкулеза (очаговым, фиброзно-кавернозным и т.д.). В любом случае, при принятии решения об иммунизации врач должен самостоятельно сравнить риск и пользу как от введения вакцин, так и от наступающих вследствие отказа от вакцинации последствий.

Вакцинацию проводят ежегодно в осенний период с применением инактивированных субъединичных и сплит-вакцин на фоне базисной терапии туберкулеза, а также применения иммунокорректирующих препаратов в комплексе лечения основного заболевания [2]. Наилучший эффект иммунизации достигается при проведении перед началом эпидемического сезона гриппа, хотя ее можно делать круглогодично.

Анализ литературы по вакцинации больных туберкулезом против респираторных инфекций показал безопасный и эффективный путь защиты от присоединения инфекционных заболеваний. Однако, недостаточное информирование о последних научных достижениях вызывает у специалистов сомнение в рациональности приме-

нения современных профилактических прививок. Вероятно, изложенный материал послужит дальнейшему усовершенствованию лечебно-профилактических мероприятий с использованием современных вакцин против респираторных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аверьянов А.В., Бабкин А.П., Барт Б.Я., Волчецкий А. Л., Е. С. Минина, Козырев О.А., Костинов М.П., Петров Д.В., Селькова Е.П., Путиловский М.А., Нечаев В. Б., Эпштейн О.И., Андрианова Е.Н. Эргоферон и осельтамивир в лечении гриппа — результаты многоцентрового сравнительного рандомизированного клинического исследования. Антибиотики и химиотерапия. 2012, 57 (7-8), 23-30.
2. Анохина Е.В., Костинов М.П., Аксенова В.А., Магаршак О.О. Применение иммунокорригирующего препарата Виферон в комплексной терапии детей и подростков, больных туберкулезом органов дыхания. Вопросы современной педиатрии. 2006, 5 (1): 28-29.
3. Брико Н.И., Симонова Е.Г., Костинов М.П., Жирова С.Н., Козлов Р.С., Муравьева А.А. Иммунопрофилактика пневмококковых инфекций. Н.И. Брико (ред.) Фемедиум Приволжье, Нижний Новгород, 2013.
4. Бусленко А. И. Влияние гриппозной инфекции на течение туберкулеза легких. Автореф. дис. канд. мед. наук. Киев, 1963.
5. Вакцинация взрослых с бронхолегочной патологией. М.П. Костинов (ред.) Арт студия Созвездие, М., 2013.
6. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. М.П. Костинов (ред.) Медицина для всех, М., 1996.
7. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. 2-е изд. М.П. Костинов (ред.) Медицина для всех, М., 2000.
8. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья. 4-е изд. М.П. Костинов (ред.) Медицина для всех, М., 2013.
9. Вакцинация против гепатита В, гриппа и краснухи взрослых пациентов с хроническими заболеваниями: Руководство. М.П. Костинов, В.В. Зверев (ред.). М., 2009.
10. Вакцинопрофилактика гриппа у беременных: Руководство для врачей. Черданцев А.П., Костинов М.П., Кусельман А.И. (ред.). М., 2013.
11. Вакцины нового поколения в профилактике инфекционных заболеваний. М.П. Костинов, В.Ф. Лавров (ред.). 2-е изд. М., МДВ, 2010.
12. Дрозденко Т.С., Харит С.М., Довгалюк И.Ф. Тактика вакцинации детей с различными проявлениями туберкулезной инфекции. Педиатрическая фармакология. 2011, 4: 60-63.
13. Иванова З.А., Глебова В.Ю., Пасечник А.В., Абдулхаев В.В., Арсентьева Н.В. Сопутствующая туберкулезу патология как причина, осложняющая течение и лечение туберкулеза. Успехи современного естествознания. 2011, 4: 124-25.
14. Иванова З.А., Кошечкин В.А., Якушева И.Ю. Туберкулез легких и хронические болезни органов дыхания. Вестник Российского Университета Дружбы Народов. М., Медицина, 2004, 26(2): 114-116.
15. Иммунокоррекция в педиатрии. М.П. Костинов (ред.). М., Медицина для всех, 1997.
16. Иммуномодуляторы и вакцинация. М.П. Костинов, И.Л. Соловьева (ред.). Мпресс, М., 2013.
17. Клинико-иммунологическая эффективность иммунобиологических препаратов. М.П. Костинов, Н.А. Озерецковский (ред.). М., Миклош, 2004.
18. Костинов М.П. Клинико-иммунологические особенности вакцинации АКДС-М и АДС-М препаратами детей с аллергическими заболеваниями. Автореф. дисс. док. мед. наук. М., 1993.
19. Костинов М.П., Пахомов Д.В. Эффективность и безопасность вакцины Превенар у детей и взрослых групп риска. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 3(52): 68-71.
20. Костинов М.П., Пахомов Д.В., Магаршак О.О. Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции как одной из причин осложнений и летальности при гриппе. Вопросы современной педиатрии. 2010, 6 (9): 25-28.

21. Костинов М.П., Чучалин А.Г., Коровкина Е.С. Инновационная вакцина против пневмококковой инфекции в профилактике обострений хронических заболеваний у взрослых. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2015, 5 (59):52-56.
22. Костяная И.Е., Мейснер А.Ф., Аксенова В.А. и др. Опыт применения вакцин Пневмо 23 и Ваксигрипп у инфицированных микобактериями туберкулеза детей групп риска. *Вакцинация*. 2002, 1(19):10-12.
23. Кошечкин В.А., Иванова З.А., Глебова В.Ю. Туберкулез и сопутствующие заболевания. *Вестник РУДН. Медицина*, 2006, 34 (2):120-124.
24. Кучко И.В., Семенов В.М., Будрицкий А.М. Клинико-иммунологическое обоснование вакцинопрофилактики гриппа у больных туберкулезом легких, *Вестник ВГМУ*. 2010, 9(1): 117-126.
25. Медицинские противопоказания к проведению профилактических прививок препаратами национального календаря прививок: Методические указания. М., Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002.
26. Новое в клинике, диагностике и вакцинопрофилактике управляемых инфекций. М.П. Костинов (ред.). М., Медицина для всех, 1997: 110.
27. От профилактического к терапевтическому эффекту вакцин против пневмококковой и гемофильной типа b инфекций у пациентов с бронхолегочной патологией. М.П. Костинов (ред.). М., 2007:182
28. Профилактическое лечение детей с латентной туберкулезной инфекцией в комплексе с вакцинопрофилактикой неспецифической инфекционной патологии верхних и нижних отделов респираторного тракта: Пособие для врачей. Аксенова В.А., Карпова О.В., Медведев М.Ю. (ред.). Министерство Здравоохранения РФ, М., 2002.
29. Респираторная медицина. А.Г. Чучалин (ред.). 2-е изд. М., Литтера, 2017.
30. Рудакова А.В., Баранов А.А., Лобзин Ю.В., Брико Н.И., Намазова-Баранова Л.С., Таточенко В.К., Харит С.М., Сидоренко С.В., Королева И.С., Козлов Р.С., Маянский Н.А., Костинов М.П., Снегова Н.Ф. Фармакоэкономические аспекты вакцинации детей 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакциной в Российской Федерации. *Вопросы современной педиатрии*. 2014, 13(1) (13): 51-59.
31. Руководство по клинической иммунологии в респираторной медицине. М.П. Костинов, А.Г. Чучалин (ред.). М., ООО АТМО, 2016.
32. Руководство по клинической иммунологии в респираторной медицине. 2-е изд. М.П. Костинов, А.Г. Чучалин (ред.). М., Группа МДВ, 2018.
33. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Шаповал И.М., Костинов М.П. Вакцины Гриппол и Инфлювак — индукторы генов факторов врожденного и адаптивного иммунитета в клетках крови человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014, 5: 37-43.
34. Туберкулез. Клинико-диагностические и лечебно-профилактические аспекты. Серия Социально значимые заболевания. Под ред. М.П. Костинова, В.А. Аксеновой. М., 2004.
35. Туберкулез: Руководство для врачей. А.Г. Хоменко (ред.). М., 1996.
36. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). А.Г. Чучалин, А.Л. Хохлов (ред.). Вып. XVIII. М., 2017.
37. Хромова Е.А., Ахматова Э.А., Сходова С.А., Семочкин И.А., Хоменков В.Г., Ахматова Н.К., Костинов М.П. Влияние противогриппозных вакцин на субпопуляции дендритных клеток крови. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016, 5: 23-28.
38. Хромова Е.Е., Семочкин И.А., Ахматова Э.А., Столпникова В.Н., Сходова С.А., Сорокина Е.В., Ахматова Н.К., Костинов М.П. Сравнительная активность вакцин против гриппа: влияние на субпопуляционную структуру лимфоцитов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016, 6: 61-65.
39. Чебыкина А.В., Костинов М.П. Поствакцинальный иммунитет против гриппа у пациентов с хронической бронхолегочной патологией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011, 4: 76-80.

40. 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.
41. Чучалин А.Г., Биличенко Т.И., Зверев В.В., Семенов Б.Ф., Костинов М.П., Таточенко В.К., Учайкин В.Ф., Аксенова В.А., Игнатова Г.Л. Иммунизация полисахаридной поливалентной вакциной для профилактики пневмококковой инфекции. Методические рекомендации. М., 2008.
42. Atkinson W.L., Larry K.P. Centers for Disease Control and Prevention. General Recommendations on Immunization. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and the American Academy of Family Physicians (AAFP). MMWR. Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports 51, вып. RR-2 (8 февраль 2002 г.): 1-35.
43. Chenry P. Quand les aconomistes s'emparent de la santy. J. Damocr. sanit. 2002, 143: 25-28.
44. Collins C.H. Tuberculosis today. A brief review. Brit. J. Biomed. Sci. 2001, 58(3):137-138.
45. Drozdenko T., Dovgaluk I., Starshinova A. et al. Vaccinal Prevention of Controlled Infections in Children with Tuberculosis . Translational Medicine and Biotechnology. 2014, 2(1): 35-40.
46. Dye C., Williams B.G., Espinal M.A. et al. Erasing the world's slow stain: strategies to beat MDR-TB. Science. 2002, 295(5562): 2042-2046.
47. Enserink M. Driving a stake into resurgent TB. Science. 2001, 293(5528): 234-235.
48. Floyd K., Blanc M., Ravigliione M. et al. Resources required for global tuberculosis control. Science. 2002, 295(5562): 2040-2041.
49. Graham S.M. Impact of HIV on childhood respiratory illness: Differences between developing and developed countries. Pediat. Pulmonol. 2003, 36(6): 462-468.
50. Grange J.M., Zumla A. The global emergency of tuberculosis: What is the cause? J. Roy. Soc. Promot. Health. 2002, 122(2): 78-81.
51. Kalou M., Sassin-Morokro M., Abouya L. et al. Changes in HIV RNA viral load, CD4+ T-cell counts, and levels of immune activation markers associated with anti-tuberculosis therapy and cotrimoxazole prophylaxis among HIV-infected tuberculosis patients in Abidjan. J. Med. Virol. 2005, 75(2): 202-208.
52. Mouzinho A. Pulmonary complications of HIV. Pediat. Pulmonol. 2004, 26: 57-58.
53. Murray M. Determinants of cluster distribution in the molecular epidemiology of tuberculosis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2002, 99(3): 1538-1543.
54. Sander P., De Rossi E., Boddinhaus B. et al. Contribution of the multidrug efflux pump to innate mycobacterial drug resistance. FEMS Microbiol. Lett. 2000, 193(1): 19-23.
55. Synne J. Mycobacterium tuberculosis infection and disease — a contribution to the understanding of immunological diagnostics in children. PhD thesis, Department of Pathology and Center for Immune Regulation Institute of Clinical Medicine Faculty of Medicine University of Oslo & Department of Clinical Science Faculty of Medicine and Dentistry University of Bergen, 2014.
56. Vaz P., Elenga N., Fassinou P. et al. Infection par le VIH-1 de l'enfant dans les pays africains. Med. trop. 2003, 63(45): 465-472.
57. Walaza S., Tempia S., Dawood H. et al. Influenza virus infection is associated with increased risk of death amongst patients hospitalized with confirmed pulmonary tuberculosis in South Africa, 2010—2011. BMC Infection Disease. 2015, 15(1): 26-39.

Поступила 03.11.18

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

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ЖИРНЫХ КИСЛОТ КАК ОДИН ИЗ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ/ПЕРСИСТЕНЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

В обзоре изложена основная информация, имеющаяся в литературе об изменении композиции жирных кислот у различных микроорганизмов в ответ на воздействие различных факторов (стрессоров) окружающей среды. Обсуждены вопросы, затрагивающие значимость жирных кислот как биомаркеров патогенетического и адаптационно-персистентного потенциала бактерий. Отмечена перспективность изучения спектра жирных кислот в области биохимии, в частности, липидомики возбудителей инфекционных заболеваний.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 109—118

Ключевые слова: жирные кислоты, адаптация, стресс

E.S.Shipko, O.V.Duvanova

CHANGING THE SPECTRUM OF FATTY ACIDS AS ONE OF THE MECHANISMS OF ADAPTATION/PERSISTENCE OF MICROORGANISMS

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

The review presents the basic information available in the literature on changes in the composition of fatty acids in various microorganisms in response to various environmental factors (stressors). The issues affecting the importance of fatty acids as biomarkers of pathogenetic and adaptive-persistent potential of bacteria are discussed. The prospects of studying the spectrum of fatty acids in the field of biochemistry, in particular, lipidomics of infectious diseases are noted.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 109—118

Key words: fatty acids, adaptation, stress

Микроорганизмы существуют в условиях нестабильной окружающей среды, где происходят такие флуктуации, как изменения температуры, рН, осмотического давления, воздействие антимикробных агентов, токсических веществ и т.д. Изменения привычных условий существования оказывают стрессирующее воздействие на бактериальные клетки.

Выделяют две группы приспособительных реакций у организмов к действию стрессирующих факторов (стрессоров): с изменением и без изменения стратегии жизни [2]. В первом случае организмы переходят от активного роста к переживанию (образованию покоящихся форм), во втором организмы адаптируются к изменившимся условиям среды и продолжают свое развитие. В связи с этим, изучение механизмов, лежащих в основе персистенции/адаптации прокариот, относят к важнейшим аспектам фундаментальной биологии.

Первичный контакт любой клетки с внешней средой или другими клетками осуществляется посредством биологических мембран. Бактериальные мембраны являются не только мишенями для внешних сигналов, но также первичными сенсорами и предшественниками вторичных мессенджеров при запуске адаптационного ответа [36]. Бактериальные адаптации к экологическим стрессам часто сопровождаются реконструкцией клеточной мембраны, которая включает измене-

ния в структуре липополисахарида, в содержании белков наружной и внутренней мембран, а также композиционными и внутримолекулярными перестройками мембранных липидов, направленными на поддержание ее жидкокристаллического состояния [30].

Жирные кислоты бактериальных липидов первыми вовлекаются в ответные реакции на стимулы внешней среды и могут служить маркерами физиологических изменений при воздействии тех или иных стрессовых факторов. В связи с этим, приоритетными являются исследования по оценке роли модификаций жирнокислотного состава мембранных липидов, в адаптационном/персистентном потенциале микробной клетки.

Жирные кислоты обнаружены у всех известных организмов — животных, растений, грибов, бактерий и даже у вирусов. Являясь структурными компонентами липидов, жирные кислоты обеспечивают их разнообразие, определяют их свойства и функции. Липидный состав прокариот представлен полярными липидами — фосфолипидами, гликолипидами, неполярными липидами — стеринами, каротиноидами, хинонами, углеводородами и липидами липополисахаридных комплексов грамотрицательных бактерий.

Фосфолипиды являются главным компонентом бактериальных мембран. В зависимости от типа спиртовой группы фосфолипиды классифицируют на фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин (содержат аминспирты) и фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит (содержат многоатомные спирты). Несмотря на многообразие фосфолипидов, набор их родо- и видоспецифичен. У грамположительных бактерий фосфолипиды представлены в основном фосфатидилглицерином, а у грамотрицательных преобладает фосфатидилэтаноламин [10]. Фосфолипиды как амфифильные молекулы могут формировать множество различных фаз. В зависимости от тех или иных условий, могут наблюдаться взаимные преобразования этих фаз (фазовые переходы). Фосфолипиды претерпевают два основных фазовых перехода: кристалл (гель) ↔ жидкий кристалл и жидкий кристалл изотропное состояние. При нормальных физиологических условиях большинство фосфолипидов находится в жидкокристаллическом состоянии, считающимся биологически активным. При экстремальных условиях возможен переход от оптимального жидкокристаллического состояния в фазу кристалл (гель) или в изотропное состояние. Переход в фазу кристалл (гель) приводит к ригидификации мембраны (увеличению ее толщины и плотности), которая сопровождается уменьшением ее проницаемости. Разупорядоченное — изотропное состояние характеризуется флюидизацией мембраны (ее разжижением и растяжением), что может привести к разделению липидной фазы и полному разрушению мембранных структур. В мембране могут наблюдаться также мезофазные превращения в пределах жидкокристаллического состояния. Различают следующие мезофазы: ламеллярная, кубическая и гексагональная [4].

Фосфолипиды мембран чрезвычайно лабильны, их состав в бактериальных клетках меняется под влиянием самых различных факторов и в различные фазы роста микроорганизмов. При этом наиболее чувствительной частью фосфолипидов являются их жирнокислотные остатки.

Жирные кислоты (ЖК) микробных полярных липидов могут быть насыщенными (НЖК) или мононенасыщенными (ННЖК) (редко полиненасыщенными) жирными кислотами с 12-24 атомами углерода, а ацильная цепь может содержать ответвления или кольцевые структуры, такие как циклопропиловое, пентиловое, и гексиловое кольца [10].

Линейно-цепочечные жирные кислоты бактерий, входящие в состав мембранных липидов, обычно относятся к тому же классу, что и кислоты, обнаруженные у эукариотических организмов. Бактериальные моноННЖК в первую очередь относятся к типу $\omega 7$ (двойная связь находится у седьмого углеродного атома относительно метилового конца ацильной цепи), хотя тип $\omega 9$, который характерен для высших организмов, также может присутствовать. У грамотрицательных бактерий, наиболее часто встречаются следующие насыщенные ЖК — 16:0 (пальмитиновая кислота), 18:0 (стеариновая кислота), и 14:0 (миристиновая кислота); наиболее важными ненасыщенными жирными кислотами являются 16:1 (пальмитолеиновая), 18:1 (олеиновая), и гидроксильные кислоты, входящие в состав липополисахаридов [21]. Грамположительные бактерии характеризуются наличием большого количества разветвленных ЖК; коринеформные бактерии и актиномицеты содержат туберкулостеариновые и миколовые кислоты (необычные высокомолекулярные, до 60-90 атомов углерода, разветвленные жирные кислоты, покрывающие всю поверхность клеточной стенки сплошным гидрофобным слоем), соответственно, являющиеся исключительными для обоих родов [29]. Важно отметить, что, хотя разветвленные жирные кислоты характерны для грамположительных бактерий, некоторые грамотрицательные бактерии, например, *Legionella* [11], *Cytophaga*, *Flavobacterium* и *Desulfobacter*, также содержат их в значительном количестве. Так, у *Flavobacterium* они составляют почти 99% от общего количества жирных кислот.

Одной из важнейших стратегий, имеющей решающее значение для выживания клеток при экстремальных условиях, является способность клеток модулировать степень текучести мембраны путем изменения качественного и количественного состава жирных кислот при помощи следующих механизмов: 1. Процессов пост-синтетической модификации (наиболее быстрый способ регулирования текучести мембраны). Включают в себя работу десатураз, изомеризацию двойной связи жирных кислот из *cis* в *trans* конфигурацию, образование циклопропановых жирных кислот. Эти изменения представляют первую линию защиты бактериальных клеток в условиях стресса; 2. Вторая линия защиты, обеспечивающая более долгосрочные изменения, включает изменение степени ненасыщенности, длины цепи и разветвления жирных кислот в синтезе *de novo*.

Известно, что изменения температуры, pH, осмотический шок, оксидативный стресс, действие органических и неорганических химических веществ являются одними из основных факторов окружающей среды, оказывающих воздействие на микробную популяцию.

Температура является основным фактором среды, определяющим характер метаболизма бактерий. Важную роль в приспособлении бактерий к смене температуры окружающей среды играют ЖК. У грамотрицательных бактерий адаптивная реакция на снижение температуры роста реализуется через повышение уровня ННЖК, снижение уровня циклопропановых и НЖК, и переходом к более короткоцепочечным жирным кислотам. Другим адаптационным процессом является изменение соотношения *iso*- к *anteiso*-разветвленным ЖК, в то время как доля *anteiso*-разветвленных жирных кислот возрастает с понижением температуры [10].

При холодовом стрессе благодаря синтезу десатураз *de novo* наблюдается увеличение числа двойных связей в ацильных цепях. Данный механизм поддержания жидкокристаллического состояния липидного матрикса препятствует фазовому переходу мембранообразующих липидов в гелевую фазу, при которой микроорганизмы погибают [18]. Десатуразы ЖК являются высокоспецифичными ферментами, катализирующими превращение одинарной связи между атомами углерода

в ацильных цепях (С-С) в двойные связи (С=С). Десатуразы ЖК были найдены практически во всех организмах. Исключение составляет *Escherichia coli*, обладающая уникальной синтазой, которая способна образовывать двойную связь в процессе синтеза цепи ЖК. Десатуразы ЖК делят на четыре типа, в зависимости от положения, в которое они вносят двойную связь. ННЖК — продукт деятельности десатураз не только регулируют сами десатуразы посредством принципа обратной связи, но и способны контролировать экспрессию других белков, как структурных, так и регуляторных [3].

При повышении температуры происходит, наоборот, увеличение средней длины цепи ЖК, увеличение доли разветвленных ЖК или же увеличение коэффициента iso- к anteiso-разветвленным ЖК. Чем длиннее цепь, тем выше точка плавления. Iso-разветвленные цепи имеют точки плавления существенно выше, чем anteiso-разветвленные как, например, точки плавления туберкулостеариновой кислоты (13,2°С) и стеариновой кислоты (69,6°С). Экстремальные термофилы, способные расти при температурах свыше 70°С, имеют уникальный липидный состав, представленный полярными фосфо — и гликолипидами на основе простых (ди- и тетра-) эфиров и сложных тетраэфиров, окруженных подобно мембранам, так называемыми «дьявольскими» кислотами, обуславливающими температуру фазового перехода 95°С [33].

При тепловом шоке в мембранах бактерий может отмечаться cis-trans изомеризация ненасыщенных жирных кислот. Такое изменение жирнокислотного состава способствует понижению жидкостности мембран и их стабилизации. В работе [17] приводятся данные, подтверждающие, что cis-trans изомеризация является экстренным механизмом, возникающим в ответ на резкое изменение условий, когда клетки не имеют возможности адаптироваться к новым условиям путем синтеза жирных кислот de novo. А сама реакция cis-trans изомеризации конкурирует с циклопропановой конверсией ненасыщенных ацильных цепей. Реакция катализируется cis-trans-изомеразы (Cti), которые конститутивно присутствуют в периплазме и не требуют для активности ни АТФ, ни любого другого кофактора, такого как NAD(P)H или глутатион. Небезынтересно отметить, что данный механизм присутствует не повсеместно у грамотрицательных бактерий, а лишь у тех организмов, которые способны жить в широком спектре экосистем, как, например, представители родов *Pseudomonas* и *Vibrio*. Псевдомонады, как известно, обладают высоким уровнем адаптации среди микроорганизмов, покориив все ниши в огромном количестве экосистем, включая почву, кожу человека и морскую воду. Вибрионы также освоили широкий диапазон экосистем, включая почвы и морские глубины. Данный механизм предоставляет клеткам, по-видимому, дополнительные возможности в достижении высокой адаптационной пластичности. Другие грамотрицательные бактерии, такие как *E. coli*, которые специализированы в отношении жизни в желудочно-кишечном тракте млекопитающих, не нуждаются в таком механизме срочной адаптации мембраны [19]. Механизм cis-trans изомеризации также активируется при воздействии на клетку токсичных веществ — фенола, толуола, крезола, метанола и др., осмотического шока, вызванного высокими концентрациями NaCl или сахарозы, тяжелыми металлами, мембранно-активными антибиотиками (тетрациклин, полимиксин В, левомицетин, пиперациллин и нигерицин) [20].

У грамотрицательных патогенных бактерий модификация липида А липополисахаридного комплекса при смене температурного режима оказывало влияние на патогенетические свойства. Так, *Yersinia pestis*, сохраняющийся в популяции грызунов и передающийся инфицированными блохами, синтезирует альтернативные

формы липида А при различной температуре роста — гексаацилированные липиды в процессе роста при «блошиной» температуре (21°C) и тетраацилированные липиды А при температуре млекопитающих (37°C). Каждый структурный вариант липида А играл особую роль на конкретных стадиях жизненного цикла патогена. В частности, увеличение степени ацилирования липида А при низкой температуре защищало бактерию от условий пищеварительного тракта блохи, тогда как снижение степени ацилирования позволяло бактерии избежать обнаружения иммунной системой хозяина [23]. Бактерии псевдотуберкулеза, выращенные при низкой температуре (4-6°C), в отличие от бактерий, выращенных при 37°C, имели более высокое общее содержание фосфолипидов и липополисахаридов. Причем липополисахариды бактерий, выращенных при понижении температуры, содержали липид А гексааацильной структуры и обладали более высокой токсичностью для теплокровных животных, по сравнению с липополисахаридами культур бактерий, выращенных при 37°C и синтезирующих тетраацильный липид А [1].

Одним из наиболее часто встречающихся стрессоров для микробных систем является кислый pH среды. Бактерии сталкиваются с сильно- и слабокислой средой как во внешней среде — в почве, при приготовлении и консервации пищи, так и внутри хозяина — в желудке, дистальном отделе кишечника, а в случае внутриклеточных патогенов — в макрофагальной фагосоме [16].

Концентрация ионов водорода в окружающей среде действует на микроорганизмы либо путем непосредственного воздействия H^+ , либо косвенно — через влияние на стабильность макромолекул, равновесие электрических зарядов. Поэтому при кислотном стрессе изменения в мембране направлены, прежде всего, на уменьшение ее проницаемости для протонов, с целью поддержания внутриклеточного pH близкого к нейтральному. Это достигается увеличением ригидности мембраны за счет изменения композиции фосфолипидов во внутренней мембране, понижением индекса ненасыщенности и увеличением содержания циклических ЖК путем конверсии ННЖК в циклопропановые ЖК через добавление метильной группы S-аденозилметионина к двойной связи ННЖК [25].

Так, у *Salmonella typhimurium* при снижении pH за счет добавления органических кислот в среду роста наблюдалось снижение индекса ненасыщенности и увеличение содержания циклических ЖК [6]. Клетки пищевого патогена *Listeria monocytogenes*, выращенные в присутствии различных кислот (соляной, уксусной, молочной и бензойной), изменяли свой жирнокислотный состав за счет введения более прямых (в основном пальмитиновой, стеариновой, миристиновой) ЖК и уменьшения количества разветвленных ЖК в мембране (независимо от используемых кислот) [11]. Однако, некоторые представители оральной микрофлоры, такие как, *Streptococcus mutans*, вызывающий кариес, реагируют на снижение pH среды альтернативным образом — сокращением количества насыщенных и увеличением доли ненасыщенных ЖК-18:1 (олеиновой) и 20:1 (эйкозеновой). При блокировании способности изменять состав мембранных ЖК с помощью церуленина (блокатора синтеза ЖК), микроорганизм был более чувствителен к кислым условиям среды. Таким образом, увеличение доли длинноцепочечных, мононенасыщенных жирных кислот было необходимо для выживания бактерий в зубном налете, где есть неоднократные циклы подкисления, и может быть важным элементом его патогенетического потенциала [14]. Интересно, что клетки листерий, подверженные воздействию слабой кислоты (pH 5,5), впоследствии были способны противостоять сильной кислоте (pH 3,5). Такое кислотное привыкание патогенов может повышать их выживаемость в кислой пище и в желудке человека, оказывая влияние на продовольственную безопасность [11].

Увеличение доли циклопропановых ЖК отмечалось и при других видах стресса — тепловом шоке, высоком давлении и окислительном стрессе, вызванном реактивными формами кислорода [8].

Антибактериальные агенты, таргетирующие мембраны и ключевые этапы синтеза белка и ДНК, могут также рассматриваться в качестве стрессирующих факторов. Одним из механизмов устойчивости прокариотической клетки к сублетальному и летальному воздействию антимикробных соединений является снижение проницаемости мембраны, ограничивающее доступ антибиотиков к мишеням, что достигается значительными перестройками липидного состава мембран. Так, обработка *P. aeruginosa* тетрациклином и ципрофлоксацином приводила к увеличению содержания фосфолипидов с одновременным понижением уровня нейтральных липидов. При этом жирнокислотный состав липидов качественно оставался стабильным: из 13 основных ЖК 11 присутствовало во всех исследуемых образцах. Но изменялось соотношение ЖК. Индекс ненасыщенности ЖК уменьшался в обработанных антибиотиками клетках, что указывало на повышение ригидности липидного бислоя и, следовательно, на понижение проницаемости клеточной мембраны [37]. Ранее подобные наблюдения были зафиксированы в опытах с кишечной палочкой. Показано, что как у необработанных, так и у обработанных цефалоспоридами или канамицином штаммах пальмитиновая кислота составляла самый высокий процент из всего спектра ЖК. В то же время, было зафиксировано изменение в качественном составе ЖК — индукция синтеза миристиновой, миристоолеиновой и линолевой кислот и утрата линоленовой и эйкозодиеновой.

Профиль ЖК играл критическую роль в чувствительности *Legionella pneumophila* к антибактериальному пептиду варнерицину РК. Адаптированные к варнерицину штаммы обладали большим количеством разветвленных и короткоцепочечных ЖК в мембране по сравнению с чувствительными [35].

Антеизо-разветвленные ЖК *L. monocytogenes* повышали устойчивость микроорганизмов к фагосомальному киллингу в макрофагах. В частности, защищали от действия антимикробных пептидов и гидролазы пептидогликана — двух основных механизмов противомикробной защиты фагосом. Более того, продукция фактора вирулентности листеролизина О зависела от модуляции спектра ЖК, что играло ключевую роль в регуляции вирулентности [34].

В естественных условиях обитания микроорганизмы испытывают воздействие нескольких стрессоров одновременно. Например, сапрофиты сталкиваются с суточными и сезонными колебаниями температуры, влажности, солнечной радиации, солёности и пр. Факультативные паразиты, имеющие два стиля жизни — во внешней среде и в макроорганизме, подвергаются воздействию как абиотических факторов (при выходе из организма хозяина во внешнюю среду), так и биотических (при попадании из внешней среды в организм хозяина). Ответная реакция и состояние микробной клетки при комбинированном стрессе значительно отличаются от таковых при монострессе.

Обнаружено, что предварительное воздействие одного стрессора повышает устойчивость клеток к воздействию другого. Причем, одновременное воздействие нескольких стрессирующих факторов повышало толерантность к стрессу, к которому микроорганизм был ранее чувствителен, в несколько раз. Этот феномен известен как «перекрестная защита». Так, осмотический стресс (добавление 5% NaCl) увеличивал резистентность *Staphylococcus lugdensis* к гентамицину. А осмотический стресс в сочетании с изменением pH и температурного фактора увеличивал устойчивость *S. lugdensis* к аминогликозидам в 10-30 раз. Эти

проявления сопровождались понижением синтеза белков клеточной стенки и изменением в профилях ЖК (увеличением количества anteiso-пентадекановой кислоты). Повышенная устойчивость к антибиотикам данного ряда сохранялась и после отмены стресса, что свидетельствовало об измененном метаболизме [9]. Специалисты Institute of Science and Technology Austria, воздействуя на колонии *E. coli* слабым раствором антибиотика триметоприма, выявили, что вследствие стресса, в ответ на воздействие антибиотика, микроорганизмы формировали перекрестный иммунитет и дольше выживали в кислой среде. По мнению авторов, этот механизм может защищать бактерии от воздействия других антибиотиков [27]. И наоборот, инкубация кишечной палочки в присутствии ацетата натрия, ацетилсалицилата, салицилата и бензоата натрия приводило к толерантности клеток к ампициллину и налидиксовой кислоте [32]. Несмотря на то, что механизм перекрестной защиты в настоящее время изучен недостаточно, существует предположение, что он может способствовать возникновению полирезистентности бактерий к антибиотикам, которая, в свою очередь, может провоцировать возникновение «супербактерий».

Одним из экологических факторов, действующих на патогенные микробы, являются экзогенные жирные кислоты хозяина. Встраиваясь в липиды, они модифицируют биофизические параметры бактериальных мембран, такие как текучесть, проницаемость, формирование доменов, влияют на эндо/экзоцитоз, деление клетки, сигнальную трансдукцию, активность мембранных белков и экспрессию факторов вирулентности. Так, *Staphylococcus aureus*, взаимодействуя с тканями хозяина, сывороткой крови, назальным секретом, легочным сурфактантом и др., включает хозяйские cis-ННЖК (арахидоновую и линолевою) в свои биосинтетические пути за счет киназного комплекса ЖК (ФАК). В результате повышается вязкость мембраны, что, в свою очередь, стимулирует активацию секреции VII типа, мультибелкового комплекса, который участвует в экспорте некоторых факторов вирулентности (в транспорте эффекторных белков во внеклеточную среду). Данный путь секреции обеспечивает долгосрочную выживаемость бактерий в абсцессах, где они защищены от действия иммунных клеток хозяина [24]. Короткоцепочечные жирные кислоты (ацетат, пропионат, бутират) тонкого и толстого кишечника влияют на вирулентность энтерогеморрагической кишечной палочки (адгезию к эпителиальным клеткам), а также на формирование жгутиков и специфическую подвижность [22]. Возбудитель холеры включает длинноцепочечные полиненасыщенные ЖК, присутствующие в желчи, в свои мембранные фосфолипиды изменяя их структуру [14]. Так, помимо количественного увеличения кардиолипина, уменьшения фосфатидилглицерола и фосфатидилэтаноламина, отмечалось образование неизвестного фосфолипида, позднее идентифицированного как лизо-фосфатидилэтаноламин, характерного для морских вибрионов. Предполагают, что введение в состав мембраны экзогенных жирных кислот может способствовать гомеофазной адаптации холерных вибрионов к факторам внутренней среды хозяина-человека. Представляет интерес, что изменение профиля фосфолипидов у возбудителя холеры коррелировало с увеличением его подвижности и индукцией генов, ответственных за образование биопленки, что в совокупности может позволять патогену уклоняться от бактерицидного воздействия желчных кислот и способствовать колонизации тонкого кишечника [7].

Таким образом, индуцированное стрессом ремоделирование мембранных липидов приводит к изменению физического состояния мембраны — ее ригидификации или флюидизации. Изменение текучести мембраны является основным фактором

для генерации, трансдукции и дезактивации сигналов стресса за счет специфических взаимодействий липидных рафтов с сенсорными трансмембранными белками (прежде всего, гистидинкиназами, являющимися мультифункциональными сенсорами), ионными каналами, фосфолипазами [36]. В связи с этим, нельзя не упомянуть о липидных медиаторах, оксипипинах, продуцируемых исключительно патогенными грамотрицательными бактериями и являющихся аналогами эйкозаноидов (лейкотриенов и простаноидов) млекопитающих и жасмонат растительных организмов. Являясь дериватами, поли- и мононенасыщенных ЖК, оксипипины модулируют защиту хозяина, повышая способность бактерий к образованию биопленки *in vitro* и *in vivo*, способствуя их вирулентности [26]. Более того, оксипипины подобно ацилированным гомосеринлактонам, пептидам, хинолонам причастны к «бактериальным языкам» межклеточной коммуникации [28]. Так, оксипипин CAI-1, продуцируемый холерными вибрионами, является аутоиндуктором системы кворум-сенсинга, которая, как известно, регулирует экспрессию факторов вирулентности, формирование биопленок, секрецию VI типа и возникновение компетенций у клеток возбудителя холеры, что в совокупности необходимо для выживания и адаптации патогена как внутри, так и вне организма человека [31].

Учитывая изложенные выше данные литературы можно сделать заключение о том, что изучение изменения профиля жирных кислот бактериальных липидов в ответ на действие тех или иных факторов среды могут служить биомаркерами как патогенетического, так и адаптационного/персистентного потенциала у различных микроорганизмов. Данное направление исследований является важным и перспективным в области биохимии, в частности липидомики, возбудителей инфекционных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахолдина С.И., Соловьева Т.Ф. Экологические аспекты вирулентности бактерий псевдотуберкулеза. Вестник ДВО РАН. 2009, 3: 85-90.
2. Бухарин, О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М. Механизмы выживания бактерий. М., Медицина, 2005.
3. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот. Успехи биологической химии. 2001, 41: 163-198.
4. Лось Д.А. Восприятие сигналов биологическими мембранами: сенсорные белки и экспрессия генов. Сорковский образовательный журнал. 2001, 7(9): 14-22.
5. Платонова А.Г. Осипов Г.А., Бойко Н.Б., Кириллова Н.В., Родионов Г.Г. Хромато-масс-спектрометрическое исследование микробных жирных кислот в биологических жидкостях человека и их клиническая значимость. Клиническая лабораторная диагностика. 2015, 12: 46-55.
6. Alvarez-Ordóñez A., Fernandes A., Bernardo A. et al. Acid tolerance in *Salmonella typhimurium* induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. Food Microbiol. 2010, (1): 44-49.
7. Chatterjee A., Dutta P.K., Chowdhury R. Effect of fatty acids and cholesterol present in bile on expression of virulence factors and motility of *Vibrio cholera*. Infect. Immun. 2007, 75 (4): 1946-1953.
8. Chen Y., Gänzle M. Influence of cyclopropane fatty acids on heat, high pressure, acid and oxidative resistance in *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. 2016, 222: 16-22.
9. Crompton M.J., Dunstan R.H., Macdonald M.M. et al. Small Changes in Environmental Parameters Lead to Alterations in Antibiotic Resistance, Cell Morphology and Membrane Fatty Acid Composition in *Staphylococcus lugdunensis*. PLoS One. 2014, 9(4): e92296.
10. Denich T.J. Beaudette A., Lee H. et al. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membrane. J. of Microbiol. Methods. 2003, 52: 149-182.

11. Diakogiannis I., Berberi A., Siapi E. et al. Growth and membrane fluidity of food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* in the presence of weak acid preservatives and hydrochloric acid. *Front. Microbiol.* 2013, 4: 152.
12. Diogo A., Verissimo A., Nobre M.F. et al. Usefulness of fatty acid composition for differentiation of *Legionella* species. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37: 2248-2254.
13. Epanand R.M. Membrane lipid polymorphism: relationship to bilayer properties and protein function. *Methods in Mol. Biol.* 2007, 400: 15-26.
14. Fozo E.M., Quivey R.G. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70 (2): 929-936.
15. Giles D., Hankins J.V., Guan Z. et al. Remodeling of the *Vibrio cholerae* membrane by incorporation of exogenous fatty acids from host and aquatic environments. *Mol. Microbiol.* 2011, 79 (3): 716-728.
16. Guerzoni M., Lanciotti E.R., Cocconcelli P.S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology.* 2001, 147: 2255-22649.
17. Hartig C., Loffhagen N., Harms H. Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71: 1915-1922.
18. Hazel J.R. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 1995, 57 (1): 19-42.
19. Heipeiper H.J., Meinhard F., Segura A. The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 229 (1): 1-7.
20. Isken S., Santos P.M.A.C., de Bont J.A.M. Effect of solvent adaptation on the antibiotic resistance in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997, 48 (5): 642-647.
21. Janse J.D. Fatty acid analysis in the identification, taxonomy and ecology of (plant pathogenic) bacteria. *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens.* 1997: 63-70.
22. Lackraj T., Kim J.I., Tran S.I. et al. Differential modulation of flagella expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by intestinal short-chain fatty acid mixes. *Microbiology.* 2016, 162: 1761-1772.
23. Li Y., Powell D.A., Shaffer S.A. et al. LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012, 109 (22): 8716-8721.
24. Lopez S., Tan I.S., Yan D. Host-derived fatty acids activate type VII secretion in *Staphylococcus aureus*. *PNAS.* 2017, 114 (42): 11223-11228.
25. Lund P., Tramonti A., De Biase D. Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2014, 38: 1091-1125.
26. Martinez E., Campos-Gomez J. Oxylipins produced by *Pseudomonas aeruginosa* promote biofilm formation and virulence. *Nature Comm.* 2016. doi: 10.1038/ncomms13823.
27. Mitosch K., Rieckh G., Bollenbach T. Noisy response to antibiotics stress predict subsequent single-cell survival in an acidic environment. *Cell Syst.* 2017, 4 (4): 393-403.
28. Pappenfort K., Silpe A.J.E., Schramma K.R. et al. *Vibrio cholerae* autoinducer-receptor pair that controls biofilm formation. *Nat. Chem. Biol.* 2017, 13 (5): 551-557.
29. Ratledge C., Wilkinson S.G. *Microbial Lipids.* London., Academic Press, 1988.
30. Rowlett V.W., Mallampalli V.K., Karlstaedt A. et al. Impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function and bacterial stress adaptation. *J. Bacteriol.* 2017, 199 (13): e00849-16.
31. Rutherford S.T., Bassler B.L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence. <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/on August 24, 2018, Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press>.
32. Sengupta S., Chattopadhyay M. Antibiotic Resistance of Bacteria: A Global Challenge and Possibilities for Its Control. *Resonance.* 2012: 179-191.
33. Siliakus M.F., Oost J., Kengen S.W.M. Adaptations of archeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles.* 2017, 21: 651-670.

34. Sun Y., Wilkinson B.J., Standiford T.J. et al. Fatty acids regulate stress resistance and virulence factor production for *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 2012, 194 (19): 5274-5284.
35. Verdon J., Labanowski J., Sahr T. et al. Fatty acid composition modulates sensitivity of *Legionella pneumophila* to warnericin RK, an antimicrobial peptide. *Bioch. Bioph. Acta.* 2011, 1808: 1146-1153.
36. Vigh L., Landry J., Nakamoto H. Membrane regulation of the stress response from prokaryotic models to mammalian cells. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007, 1113 (1): 40-51.
37. Yehia H.M., Hassanein W.A., Ibrahim S.M. Studies on molecular characterizations of the outer membrane proteins, lipids profile, and exopolysaccharides of antibiotic resistant strain *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMed Research International.* 2015: Article ID 651464, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/651464>.

Поступила 12.09.18

Контактная информация: Шипко Елена Сергеевна,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863)240-91-13

© Н.В.БРЕНЁВА, С.В.БАЛАХОНОВ. 2019

Н.В.Бренёва, С.В.Балахонов

ВОПРОСЫ ЭНДЕМИЧНОСТИ И ЭНЗООТИЧНОСТИ ЛЕПТОСПИРОЗОВ

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока

В обзоре рассмотрены основные определения и критерии эндемичности и энзоотичности, относящиеся к природно-очаговым зоонозным инфекциям и, в частности, к лептоспирозам. Так как лептоспирозы распространены повсеместно, и практически все территории эндемичны по этому заболеванию, предлагается выделять высокую, среднюю и низкую степень эндемичности на основании нескольких критериев, в первую очередь — заболеваемости населения. Неравномерность эндемичности также имеет значение при эпидемиологическом анализе ситуации по лептоспирозам.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 118—125

Ключевые слова: эндемичность, энзоотичность, природно-очаговые зоонозы, лептоспирозы

N.V.Breneva, S.V.Balakhonov

ENDEMICITY AND ENZOOTICITY ASPECTS OF LEPTOSPIROSIS

Irkutsk Research Institute for Plague Control of Siberia and Far East, Russia

The review covers the main definitions and criteria for endemicity and enzooticity relating to natural focal zoonotic infections and, in particular, to leptospirosis. Since leptospirosis is widespread, and almost all territories are endemic for this disease, it is proposed to allocate a high, medium and low degree of endemicity on the basis of several criteria, primarily the population morbidity. The unevenness of endemicity is also important in the epidemiological analysis of the leptospirosis situation.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 118—125

Key words: endemicity, enzooticity, natural focal zoonoses, leptospirosis

В международной глоссарии определение эндемичности звучит следующим образом: «Постоянная приуроченность инфекционных (паразитарных) болезней или их групп к определенным территориям, обусловленная специфическими локальными природно-географическими условиями» [3]. В последнее время эндемичность часто связывают с заболеваемостью. Например, в одном из учебников по эпидемиологии есть следующее определение: «эндемия — постоянное наличие в данной местности заболеваемости людей определенной болезнью, обусловленное соответствующими социальными и природными условиями» [5]. Подобная трактовка встречалась и раньше: «эндемичность — территориальная ограниченность заболеваемости», то есть ареал болезни или нозоареал [15]. В подобных определениях отсутствуют важные моменты для природно-очаговых и зоонозных инфекций, а именно заболеваемость животных и способность возбудителей сохраняться во внешней среде. С понятием энзоотичности происходит такой же метаморфоз, его все больше связывают с заболеваемостью животных. «Заболеваемость животных, свойственную данной местности, называют энзоотической или энзоотией» [16]. При такой трактовке эти два понятия теряют взаимосвязь. Получается, что если болеют животные и не болеют люди, то территория энзоотична, но не эндемична, и наоборот. Часто на территориях активных природных очагов инфекций заболеваемость вообще не регистрируется, но риск развития эпидемических осложнений остается. Возбудители многих природно-очаговых болезней могут длительно сохраняться в воде и почве, при сапронозах существование возбудителей вообще может обеспечиваться без участия носителей или переносчиков постоянным размножением во внешней среде [11]. «Единственным обязательным и специфическим компонентом любого природного очага остается популяция возбудителя. Именно наличие возбудителя характеризует данную экосистему (совокупность экосистем) как природный очаг болезни. Потенциальные хозяева возбудителя ... могут быть сочленами и любых других экосистем, безопасных в отношении данного заболевания, и поэтому не являются специфическими компонентами природного очага» [6]. Поэтому, когда речь идет о природно-очаговых инфекциях, необходимо относить понятия эндемичности и энзоотичности не к заболеваемости, а к возбудителю. Этому полностью соответствует следующее определение: «Эндемические инфекционные болезни (эндемия) постоянно существуют на данной территории в силу ряда условий, обеспечивающих непрерывную циркуляцию возбудителя» [16]. Первая часть определения Б.Л. Черкасского (2001) соответствует международному, а вторая относится к возбудителю: «Эндемичность (эндемия) — постоянная приуроченность инфекционных (паразитарных) болезней или их групп к определенным территориям, обусловленная специфическими локальными природно-географическими условиями, необходимыми для постоянной естественной циркуляции возбудителя» [13]. Определения В.В. Кучерука (1984) более конкретизированы: «Эндемия — постоянная приуроченность инфекционной болезни людей (антропоноза или зооноза) к определенной местности, обусловленная природными и социальными факторами»; «Энзоотия — постоянная приуроченность болезни диких и домашних животных к определенной местности, обусловленная природными факторами» [7].

Различают инфекционные болезни с глобальным и региональным распространением [5, 16]. Мнение о «глобализации» лептоспирозов [34] выглядит не совсем убедительно потому, что для этой группы инфекций всегда было характерно широкое (повсеместное, убиквитарное) распространение [1, 8, 12, 32]. Но суть вопроса в том, какие территории считать эндемичными, если инфекция есть практически везде. Некоторые авторы выделяют территории с разной «степенью эндемичности»,

которая соответствует уровню заболеваемости [30, 34]. G. Pappas et al. [34], например, пишут о гиперэндемичности таких территорий, как Шри-Ланка и Гваделупа, кроме того, о «полной» эндемичности Бразилии и «частичной» — Уругвая. Исходя из определений эндемичности, логично обозначать ее степень с учетом динамики эпидемического процесса и существующего риска заражения населения на данной территории.

Количественные характеристики эндемичности для лептоспирозов отсутствуют. В данном случае можно ориентироваться на другие природно-очаговые инфекции, в частности, в действующих санитарных правилах СП 3.1.7.2614-10 «Профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом» эпидемическая активность очаговой территории ГЛПС определяется уровнем заболеваемости людей: высокий — от 10,0 и более, средний — от 1,0 до 9,0 и низкий — менее 1,0 на 100 тысяч населения. Можно следующим образом разделить территории по заболеваемости лептоспирозами: эндемичные страны с высокими показателями заболеваемости — Сейшелы, Малайзия, Новая Каледония, Суринам (20,0-100,0 на 100 тысяч населения); Тринидад и Тобаго, Барбадос, Бразилия (10,0-20,0); Ямайка, Коста-Рика, Шри-Ланка, Таиланд, Сальвадор, Новая Зеландия (2,5-10,0); Уругвай, Куба, Никарагуа, Хорватия, Украина, Доминиканская Республика, Эквадор (1,0-2,5); Аргентина, Румыния, Австралия, Португалия, Дания, Латвия, Словения, Филиппины, Словакия, Тайвань (0,4-1,0); с невысокими показателями — Китай, Индия, Иран (0,1-1,0); с низким уровнем заболеваемости — США, Канада, Великобритания, Италия, Испания, Германия (0,01-0,1) [14, 22, 34, 39]. Заболеваемость — это основной показатель для вывода о степени эндемичности, но не единственный. С. Lau et al. [30] выделяют регионы с высокими рисками заболевания лептоспирозами — Индия, Шри-Ланка, Таиланд, Вьетнам, Малайзия, Китай, Сейшелы, страны Карибского бассейна, Бразилия и страны Тихоокеанского бассейна. Эти же страны можно назвать высоко эндемичными. Для них характерен широкий диапазон уровней заболеваемости — от 2,5 до 200 на 100 тыс. населения. Этот уровень может значительно колебаться на одной и той же территории в зависимости от погодных условий. Чаще всего наводнения провоцируют развитие крупных вспышек и резкие скачки заболеваемости [30, 32, 34].

Если понятие эндемичности больше применимо к административным территориям, странам и даже континентам, то понятие энзоотичности, наоборот, — к географически узко очерченным территориям и областям, а именно к конкретным очагам заболевания животных. Можно сказать, что Приморский край эндемичен по лептоспирозу, но нельзя сказать, что он энзоотичен. Неправильно также сказать, что Приморский край или даже Спасский район — это энзоотичная территория. Правильно будет сказать, что в Приморском крае или Спасском районе есть энзоотичные территории, то есть устойчивые очаги заболеваний животных. И в то же время, нельзя сказать, что в Приморском крае или даже в России есть эндемичные территории. И если вполне логично, что Краснодарский край эндемичен, Южный федеральный округ эндемичен по лептоспирозам, то Российскую Федерацию в целом трудно назвать эндемичной.

Если ориентировочно выделить критерии эндемичности и энзоотичности, относящиеся к лептоспирозам, то первым будет заболеваемость населения, вторым — заболеваемость животных. Речь идет об официально регистрируемой заболеваемости, которая, как известно, является «верхушкой айсберга», а у животных охватывает только отдельные виды. Поэтому третий критерий — обнаружение возбудителя или его специфических нуклеиновых кислот в различных объектах, тоже будет одним из основных. При определении энзоотичности территории по туляремии согласно

МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией» упоминания о заболеваемости животных нет вообще, в качестве критериев приводятся местные случаи заболевания людей, изоляция культур возбудителя или регулярное выявление туляремийного антигена в объектах внешней среды (погадки птиц, помет хищных млекопитающих, подснежные гнезда грызунов, вода, фураж и т.п.). Интересно, что критерием энзоотичности считается заболеваемость людей. На самом деле, если территория эндемична по природно-очаговому зоонозу, то она априори и энзоотична, и наоборот. И еще один критерий, который уже можно взять из МУ 3.1.3.2355-08 «Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации» — это «потенциальная эпидемическая опасность», что применимо к возможному в будущем развитию эпидемических событий. Этот критерий вытекает из первых трех с учетом природно-географических и социально-экономических факторов, которые и есть первопричина формирования очагов инфекции и эндемичности территории. Критерий по сути представляет собой краткосрочный и долгосрочный прогноз развития эпидемиологической ситуации и выражает риск ориентированный подход в эпидемиологическом надзоре за инфекционными болезнями.

Так как природно-географические условия определяют возникновение и дальнейшее существование очага, природно-очаговые инфекции называют «климат зависимыми» [17]. Природные очаги лептоспирозов обычно приурочены к влажным биотопам, заболеваемость значительно выше в регионах с теплым влажным климатом (тропики и субтропики), ее динамика часто связана с количеством осадков [30, 32, 34]. Изменения климата влияют также на рост численности и активности мелких млекопитающих — основных носителей патогенных лептоспир. Социальные факторы в основном определяют возможность заражения людей в природных и хозяйственных очагах [9].

Таким образом, эндемичной по лептоспирозам можно считать любую территорию. Степень эндемичности можно условно разделить на высокую, среднюю и низкую. Территории с высокой степенью эндемичности обычно называют высоко эндемичными, со средней степенью — эндемичными, с низкой — никак не упоминают об эндемичности [22, 34]. На территориях с высокой степенью эндемичности преобладает влажный жаркий климат, характерен низкий уровень гигиенической грамотности населения и его тесный контакт с очагами лептоспирозов животных, постоянно или периодически регистрируется заболеваемость населения, эпизоотии, при лабораторных исследованиях ДНК-РНК патогенных лептоспир можно обнаружить не только у основных носителей, но и в воде или влажной почве [30]. На таких территориях существует высокий риск заражения возбудителем. Сюда можно отнести большинство стран экваториального и тропического климатических поясов.

Несмотря на то, что данные по заболеваемости лептоспирозами в Африке до недавнего времени не были известны [34, 44], этот континент без сомнения высоко эндемичен [22]. Здесь как нельзя более применим термин «незамечаемая» инфекция [19, 23], лептоспирозы теряются на фоне массы вирусных и риккетсиозных лихорадок, бактериальных инфекций и протозойных инвазий, распространенных в Африке [45]. Лабораторная диагностика в большинстве случаев отсутствует. В последние годы появились сообщения о заболеваниях людей и находках лептоспир у животных и в абиотических объектах. Allan K.J. et al. нашли 97 публикаций о случаях лептоспирозов у людей и животных в 26 странах Африки [19]. Наиболее эндемичные по лептоспирозам территории расположены к югу от Сахары, это так называемая «Sub-Saharan Africa» [22, 24], или Центральная и Восточная Африка [19, 22]. Интересно, что в Демократической Республике Конго в 2014 г. лептоспироз был вы-

явлен у шахтеров во время вспышки легочной чумы, в которую были вовлечены 130 человек, 57 из них умерли, 54 реконвалесцента были обследованы на лептоспироз с положительным результатом в 29 случаях (53,7 %), у двух больных оказалась микст-инфекция [20]. На самом деле неудивительно, что лептоспирозы в Африке находят только ученые, специально занимающиеся этой проблемой, потому что для самой Африки актуальны другие более опасные заболевания, такие как чума, холера, лихорадка Эбола, желтая лихорадка, СПИД и т.д. [45].

Латинская Америка высоко эндемична по лептоспирозам [36, 42], высокая заболеваемость регистрируется в Бразилии, где основным источником инфекции остаются сельскохозяйственные животные [27]. В Мексике лептоспирами инфицированы даже дикие крокодилы [35].

Высокая эндемичность стран Юго-Восточной Азии связана не только с климатом, но и с особенностями сельского хозяйства [29, 31, 41]. Возделывание риса и тростника создает идеальные условия и для сохранения возбудителя во внешней среде, и для размножения потенциальных носителей [1]. Известно, что лептоспиры лучше сохраняются в малопроточных теплых водоемах [1], однако в Таиланде они обнаружены даже в водопаде [21]. Высокий риск заражения лептоспирозами представляют природные очаги Малайзии, где проведение в 2000 году экстремальных гонок «Eco-Challenge-Sabah» осложнилось крупной вспышкой с 80 заболевшими из 27 стран [37].

Ситуация по лептоспирозам во Вьетнаме остаётся неясной из-за отсутствия их официальной регистрации [34, 41], по неофициальным данным показатель заболеваемости до недавнего времени превышал 10,0 на 100 тыс. населения [41]. Появившиеся в последние десятилетия публикации посвящены, в основном, очагам лептоспироза в дельте реки Меконг, считающейся наиболее эндемичной территорией Вьетнама по данной инфекции [33, 40]. Высокая эндемичность Вьетнама по лептоспирозам подтверждается также регистрацией завозных случаев заболевания, в том числе на территории Сибири и Дальнего Востока [4]. Растущий туристический и миграционный поток в связи с укреплением экономических и политических связей с Вьетнамом требует принятия соответствующих мер профилактики распространённых в этой стране инфекционных заболеваний.

Для многих стран характерно неравномерное распределение заболеваемости лептоспирозами по административным районам. Например, в Китае при общем среднемноголетнем показателе заболеваемости (СМП) за 1991-2010 гг. 0,7 на 100 тыс. населения [14, 46] в округе Beijing он составил 2,43, Chengdu — 2,31, Fuzhou — 204,0, Wuhan — 19,5 ‰; в Индии заболеваемость по округам также отличалась более, чем в 10 раз: Chennai — 0,4, Kerala — 2,54, Madras — 8,25, Mumbai — 0,17, Tamil Nadu — 7,3 ‰ [14, 43]. Такую эндемичность нельзя назвать «частичной» или «неполной» [34], сюда подходит сочетание «неравномерная эндемичность», высокая на одних территориях страны, средняя и низкая — на других. Эта же особенность была характерна и для России, по данным Референс-центра по мониторингу за природно-очаговыми болезнями ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора СМП за 1992-2009 гг. в Южном Федеральном округе был в 15 раз выше, чем в Сибирском — 2,18 и 0,14 ‰, соответственно. В настоящее время на фоне общего снижения заболеваемости в Российской Федерации территориальные различия сохраняются, в 2015 г. уровень заболеваемости в ЮФО был в 20 раз выше, чем в СФО — 0,20 и 0,01 ‰, соответственно. Китай и Индию можно отнести к странам как со средней, так и с высокой эндемичностью. Россия в настоящее время по показателям заболеваемости населения ближе к странам с низкой эндемичностью, однако эпизоотическая ситуация среди сельскохозяйственных

и домашних животных и высокая активность отдельных природных очагов [2, 10] позволяет говорить и о средней степени эндемичности.

Территории со средней степенью эндемичности расположены во влажных субтропиках (климат муссонный, средиземноморский или с равномерным увлажнением) и граничащим с ними умеренном климатическом поясе (климат муссонный или умеренно континентальный). Сюда можно отнести часть стран Европы, Западной и Южной Африки, Южной Америки, Австралию и США [22, 39], хотя эндемичность здесь тоже будет неравномерной. В Европе лептоспирозы широко распространены, особенно на Балканском полуострове, самые высокие показатели заболеваемости отмечены в Хорватии, Румынии и Словении [25, 26, 28]. В США наиболее эндемичны территории, примыкающие к Атлантическому океану (Юго-Восточная Америка) [22, 38, 39].

Зоны низкой эндемичности — пустынные тропики, континентальные субтропики, области континентального и морского умеренного климата. Это, прежде всего, Гренландия и Скандинавия [22, 39], отличающиеся суровым холодным морским климатом. Сюда относятся также Юго-Западная Азия и Северная Африка, для которых характерен засушливый (пустынный тропический) климат [22, 24, 39]. Заболеваемость здесь низкая, хотя циркуляция патогенных лептоспир подтверждена даже у верблюдов Саудовской Аравии [18].

Таким образом, неэндемичными по лептоспирозам можно назвать только Арктику и Антарктику, и то условно, потому что исследования на лептоспирозы там не проводились. Что касается других территорий, все они эндемичны в разной степени, ориентировочно можно выделить высокую, среднюю и низкую степень эндемичности. Кроме того, эндемичность в пределах отдельно взятого региона может быть равномерной и неравномерной. Применимо к природно-очаговым зоонозам эндемичность и энзоотичность — неразделимые понятия, несмотря на то, что они по-разному укладываются в географические рамки. Эти понятия тесно связаны, прежде всего, с ареалом возбудителя инфекции, а также с эпидемиологическим риском для населения и животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьин В.В. Лептоспирозы людей и животных. М.: Медицина; 1971.
2. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы в Российской Федерации: современные особенности эпидемиологического проявления природных и техногенных очагов. Ветеринарная патология. 2004, 4: 54-57.
3. Англорусский глоссарий основных терминов по вакцинологии и иммунизации. Всемирная организация здравоохранения, 2009.
4. Бренёва Н.В., Балахонов С.В., Алленов А.В., Борзов В.П., Громова Т.В., Демьянова Н.А., Медведева Н.В. Клинико-эпидемиологические особенности лептоспироза в Сибири и на Дальнем Востоке. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018, 7 (3): 62-67. doi: 10.24411/2305-3496-2018-13009.
5. Брико Н.И., Покровский В.И. Эпидемиология: учебник. М., ГЭОТАР-Медиа, 2015.
6. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С.. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. Под ред. А.Л. Гинцбурга, В.Н. Злобина. М., Наука, 2013.
7. Кучерук В.В. Избранные труды по природной очаговости болезней. Сост.: Э.И. Коренберг, Л.А. Хляп. М., РУСАКИ, 2006.
8. Малахов Ю.А. Лептоспироз животных. М., Агропромиздат, 1992.
9. Природноочаговые болезни человека. Под ред. акад. Е.Н. Павловского. М., Медгиз, 1960.
10. Соболева Г.Л., Ананьина Ю.В., Непоклонова И.В. Актуальные вопросы лептоспироза людей и животных. Российский ветеринарный журнал. 2017, 8: 13-17.

11. Сомов Г.П., Литвин В.Ю. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий: Экологические аспекты. Новосибирск, Наука. Сиб. отд-ние, 1988.
12. Терских В.И., Коковин И.Л. Лептоспирозные заболевания людей. М., Медицина, 1964.
13. Черкасский Б.Л. Эпидемиологический словарь. М., Научно-методический центр ГВКГ им. Н.Н. Бурденко, 2001.
14. Шаракшанов М.Б., Бренева Н.В., Носков А.К., Киселева Е.Ю., Косилко С.А., Шкаруба Т.Т., Чеснокова М.В. Современные тенденции распространения лептоспироза за рубежом. Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2012, 87 (5, Часть 1): 389-392.
15. Эпидемиология. Учебник для студентов медвузов. Под ред. Д.В. Виноградова-Волжинского. Ленинград, Медицина, 1973.
16. Ющук Н.Д., Мартынов Ю.В., Кухтевич Е.В., Гришина Ю.Ю. Эпидемиология инфекционных болезней: учебное пособие. 3-е изд., перераб. и доп. М., ГЭОТАР-Медиа, 2014.
17. Ясюкевич В.В., Титкина С.Н., Попов И.О., Давидович Е.А., Ясюкевич Н.В. Климатозависимые заболевания и членистоногие переносчики: возможное влияние наблюдаемого на территории России изменения климата. Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. М., ИГКЭ. 2013, 25: 314-359.
18. Al-Busadah K.A., El-Bahr S.M., Khalafalla A.I. Serum biochemical profile and molecular detection of pathogens in semen of infertile male dromedary camels (*Camelus dromedarius*). Anim. Reprod. Sci. 2017, 180: 58-65. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.03.003.
19. Allan K.J., Biggs H.M., Halliday Jo E.B. et al. Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for «One Health» in Africa. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003899.
20. Bertherat E., Mueller M.J., Shako J.C., Picardeau M. Discovery of a leptospirosis cluster amidst a pneumonic plague outbreak in a miners' camp in the Democratic Republic of the Congo. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2014, 11(2): 1824-33. doi: 10.3390/ijerph110201824.
21. Chaiwattanarungruengpaisan S., Suwanpakdee S., Sangkachai N. et al. Potential pathogenic *Leptospira* species isolated from waterfall in Thailand. Jpn. J. Infect. Dis. 2018, 71(1): 65-67. 2017. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.363.
22. Costa F., Hagan J.E., Calcagno J. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003898.
23. Cutler S.J., Fooks A.R., van der Poel W.H.M. Public Health Threat of New, Reemerging, and Neglected Zoonoses in the Industrialized World. Emerg. Infect. Dis. 2010, 16 (1): 1-7.
24. De Vries S.G., Visser B.J., Nagel I.M. et al. Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: a systematic review. Int. J. Infect. Dis. 2014, 28: 47-64.
25. Dupouey J., Faucher B., Edouard S. et al. Human leptospirosis: An emerging risk in Europe? Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2014, 37: 77-83.
26. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 — Leptospirosis. Stockholm: ECDC 2016. <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/leptospirosis/Pages/Annualepidemiologicalreport2016> (дата обращения 18.09.2018).
27. Fávero J.F., de Araújo H.L., Lilenbaum W. et al. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. Microb. Pathog. 2017. pii: S0882-4010(17)30179-1. doi: 10.1016/j.micpath.2017.03.032.
28. Habus J., Persic Z., Spicic S. et al. New trends in human and animal leptospirosis in Croatia, 2009-2014. Acta Trop. 2017, 168: 1-8. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.01.002.
29. Laras K., Cao B.V., Bounlu K. et al. The importance of leptospirosis in Southeast Asia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2002, 67(3): 278-86.
30. Lau C., Smythe L., Weinstein P. Leptospirosis: an emerging disease in travelers. Travel. Med. Infect. Dis. 2010, 8: 33-39.
31. Leptospirosis situation in the WHO South-East Asia Region. http://www.searo.who.int/entity/emerging_diseases/topics/leptospirosis/en/ (дата обращения 18.09.2018).
32. Levett P. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 2001, 14 (2): 296-326.
33. Loan H.K., Van Cuong N., Takhampunya R. et al. How important are rats as vectors of leptospirosis in the Mekong Delta of Vietnam? Vector Borne Zoonotic Dis. 2015, 15 (1): 56-64. doi: 10.1089/vbz.2014.1613.
34. Pappas G., Papadimitriou P., Siozopoulou V. et al. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends (review). Int. J. Infect. Dis. 2008, 12: 351-357.

35. Pérez-Flores J., Charruau P., Cedeño-Vázquez R., Atilano D. Evidence for Wild Crocodiles as a Risk for Human Leptospirosis, Mexico. *Ecohealth*. 2017, 14 (1): 58-68.
36. Pinto P.S., Libonati H., Lilenbaum W. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. *Trop. Anim. Health Prod.* 2017, 49 (2): 231-238.
37. Sejvar J., Bancroft E., Winthrop K. et al. Leptospirosis in «Eco-Challenge» athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 2003, 9 (6): 702-707.
38. Stern E.J., Galloway R., Shadomy S.V. et al. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. *Clin. Infect. Dis.* 2010, 50 (6): 843-849.
39. Torgerson P.R., Hagan J.E., Costa F. et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0004122.
40. Van C.T., Thuy N.T., San N.H. et al. Human leptospirosis in the Mekong delta, Vietnam. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1998, 92 (6): 625-628.
41. Victoriano A.F., Smythe L.D., Gloriani-Barzaga N. et al. Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infectious Diseases*. 2009, 9: 147. doi: 10.1186/1471-2334-9-147.
42. Vieira A.S., Pinto P.S., Lilenbaum W. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. *Trop. Anim. Health Prod.* 2018, 50 (2): 229-238. doi: 10.1007/s11250-017-1429-y.
43. *Weekly. Epidemiol. Rec. WHO.* 1990-2011.
44. WHO. *Weekly Epidemiol. Rec.* <http://www.who.int/wer/en/> (дата обращения 18.09.2018).
45. WHO. Africa. *Weekly bulletins on outbreaks and other emergencies.* <http://www.afro.who.int/health-topics/disease-outbreaks/outbreaks-and-other-emergencies-updates> (дата обращения 18.09.2018).
46. Zhang C., Wang H., Yan J. Leptospirosis prevalence in Chinese populations in the last two decades. *Microbes. Infect.* 2012, 14 (4): 317-323.

Поступила 20.02.19

Контактная информация: Бренёва Наталья Владимировна, к.м.н.,
664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р.т. (3952)22-01-43

РЕЦЕНЗИИ И КРИТИКА

© И.И.ДОЛГУШИН, 2019

О.В.БУХАРИН, А.А.СТАДНИКОВ, Н.Б.ПЕРУНОВА. РОЛЬ ОКСИТОЦИНА И МИКРОБИОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРО- И ЭУКАРИОТ ПРИ ИНФЕКЦИИ. ЕКАТЕРИНБУРГ, УРО РАН, 2019, 247 С.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 125—126

Предлагаемая вниманию книга представляет известный интерес для широкой медицинской аудитории как теоретиков-фундаменталистов, так и представителей клинических дисциплин.

Пожалуй, это яркий пример того, как фундаментальные разработки в области инфектологии «переплаваются» в инновационные медицинские (клинические) подходы в условиях различных нозоформ.

Фундаментальный раздел книги написан удачно, а главное — изложен «понятным» языком даже для неспециалиста — теоретика (иммунолога, микробиолога,

гистолога). Описана нонапептидная гипоталамогипофизарная нейросекреторная система как основа регуляции эффекторного звена гомеостаза организма и ее роль в защите хозяина от инфекции.

Сформулировано положение о позитивной (оптимизирующей) роли гипоталамических нонапептидов в обеспечении процессов пролиферации, роста и цитодифференцировки тканей различного генеза в качестве доказательства адаптагенной роли гипоталамических нонапептидов, в частности, окситоцина.

Авторами представлен оригинальный материал по роли окситоцина в качестве регулятора функционирования клеточных элементов, что важно для управления физиологическими процессами хозяина при инфекции.

Обсуждается проблема регуляции гормона — окситоцина на персистентный потенциал микроорганизмов, а в итоге оценивается результирующая взаимодействий про- и эукариотов.

Внимания заслуживает экспериментально-гистологическое обоснование целесообразности местного применения гормона в комплексной коррекции гнойно-некротических процессов. Этот раздел книги вкупе с материалами по изучению влияния окситоцина на прокариотическую клетку определяет ту новизну полученных знаний, которые ждет читатель от авторов.

Послужной список положительных эффектов от регуляторного воздействия окситоцина при инфекционной патологии впечатляет — это: острые гнойные заболевания мягких тканей, абдоминальный сепсис, «диабетическая стопа», острый деструктивный панкреатит, лактационный мастит, гнойный гайморит. В основе этих разработок для клиницистов кроется выявление способностей окситоцина оказывать иммуностропный, антимикробный и антиперсистирующий эффекты и его способность потенцировать действие антибиотиков при использовании окситоцин-антибактериального комплекса в лечении персистирующей инфекции. Именно эти экспериментально выявленные находки новых разработанных авторами комбинаций препаратов, включающие окситоцин, антибиотик и гидрофильную основу, позволили создать мазевые продукты для лечения хирургической инфекции в зависимости от стадии раневого процесса.

В заключение следует отметить, что обозначенное экспериментально-клиническое направление борьбы с инфекцией с использованием в комплексной терапии окситоцина четко определено и, вероятно, будет иметь продолжение.

Не вызывает сомнения, что книга будет полезна как для научных работников теоретического профиля, так и для клиницистов, имеющих дело с гнойной патологией.

Зав. каф. микробиологии
Челябинского государственного
медицинского университета,
академик РАН

И.И. Долгушин

СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Киреев М.Н., Шарипова Н.А., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Овчинникова М.В., Кириллова Т.Ю., Семакова А.П.* Разработка схемы получения антител к рибонуклеопротеину аттенуированного вируса бешенства 3
- Gavrilova Yu.K., Generalov S.V., Kireev M.N., Sharapova N.A., Abramova E.G., Savitskaya L.V., Ovchinnikova M.V., Kirillova T.Yu., Semakova A.P.* Development of the scheme of obtaining antibodies to the ribonucleoprotein of attenuated rabies virus
- Бондарева О.С., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Батулин А.А., Лемасова Л.В., Шпак И.М., Будченко А.А.* Разработка схемы генотипирования возбудителя сапа на основе мультилокусного анализа числа варибельных тандемных повторов 8
- Bondareva O.S., Tkachenko G.A., Ledeneva M.L., Baturin A.A., Lemasova L.V., Shpak I.M., Budchenko A.A.* Development of genotyping method of the glanders causative agent based on multiple locus variable-number tandem repeat analysis
- Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Востров А.В.* Ингибирование гемолитической активности *Streptococcus pyogenes* в механизмах антибактериального действия катионов цинка 16
- Cheknev S.B., Vostrova E.I., Sarycheva M.A., Vostrov A.V.* Inhibition of hemolytic activity of *Streptococcus pyogenes* in mechanisms of antibacterial action of zinc ions
- Ларионова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г.* Влияние биологических свойств сезонных вирусов гриппа на эффективность подготовки штаммов живой гриппозной вакцины 24
- Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., Grigorieva E.P., Rudenko L.G.* The influence of seasonal influenza viruses biological features on the effectiveness of development strains for live influenza vaccine
- Сорокина Е.В., Сивакова Н.Г., Ахматова Э.А., Митрофанова Н.Н., Сходова С.А., Ахматова Н.К.* Применение поливалентного бактериального лизата в комплексной терапии хронической крапивницы 34
- Sorokina E.V., Sivakova N.G., Akhmatova E.A., Mitrofanova N.N., Shodova S.A., Akhmatova N.K.* The use of a polyvalent bacterial lysate in a complex therapy of chronic urticaria
- Захарова Ю.В., Леванова Л.А., Иванов В.И., Быков А.С., Афанасьев С.С., Афанасьев М.С., Караулов А.В.* Энтеробактерии в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей 40
- Zakharova Yu.V., Levanova L.A., Ivanov V.I., Bykov A.S., Afanasiev S.S., Afanasiev M.S., Karaulov A.V.* Enterobacteria in the intestinal microbiocenosis of HIV-infected children
- Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г.* Образование биопленок свежeweделенными и вакцинными штаммами *Bordetella pertussis* разных сероваров 47
- Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G.* The biofilm formation of freshly isolated and vaccine strains of *Bordetella pertussis* of different serotypes

ОБЗОРЫ (REVIEWS)

- Акимкин В.Г., Захарова Ю.А., Игонина Е.П., Болгарова Е.В.* Нозокомиальные респираторные вирусные инфекции: современное состояние проблемы. 50

<i>Akimkin V.G., Zakharova Yu.A., Igonina E.P., Bolgarova E.V.</i> Nosocomial respiratory viral infections: state of the problems	
<i>Бойченко М.Н., Кравцова Е.О., Зверев В.В.</i> Механизмы внутриклеточного паразитизма бактерий	61
<i>Voichenko M.N., Kravtsova E.O., Zverev V.V.</i> Mechanism of intracellular bacterial parasitism	
<i>Костинов М.П., Костинов А.М., Пахомов Д.В., Полищук В.Б., Костинова А.М., Шмитько А.Д., Тарасова А.А.</i> Эффективность пневмококковой вакцины у иммунокомпетентных и иммунокомпроментированных пациентов	72
<i>Kostinov M.P., Kostinov A.M., Pakhomov D.V., Polishchuk V.B., Kostinova A.M., Shmitko A.D., Tarasova A.A.</i> Efficacy of pneumococcal vaccine in immunocompetent and immunocompromised patients	
<i>Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Мовсесянц А.А., Жулидов И.М.</i> Бешенство и антирабические иммунобиологические препараты: от прививки Пастера к современным биотехнологиям	83
<i>Abramova E.G., Nikiforov A.K., Movsesyants A.A., Zhulidov I.M.</i> Rabies and rabies immunobiological preparations: vaccinations Pasteur to the contemporary biotechnology	
<i>Чехляева Т.С., Шульга С.В., Ерохов Д.В., Тихонова Н.Т., Зверев В.В.</i> Генетическое разнообразие вируса краснухи на современном этапе реализации программы элиминации краснухи и предупреждения врожденной краснухи	95
<i>Chekhlyayeva T.S., Shulga S.V., Erokhov D.V., Tikhonova N.T., Zverev V.V.</i> Genetic diversity of rubella virus at the present stage of rubella elimination and congenital rubella prevention programs	
<i>Машилов К.В., Костинова Т.А.</i> Вакцинопрофилактика интеркуррентных инфекций дыхательных путей у больных туберкулезом	102
<i>Mashilov K.V., Kostinova T.A.</i> Vaccine prophylaxis of intercurrent infections of respiratory tract in patients with tuberculosis	
<i>Шипко Е.С., Дуванова О.В.</i> Изменение спектра жирных кислот как один из механизмов адаптации/персистенции микроорганизмов	109
<i>Shipko E.S., Duvanova O.V.</i> Changing the spectrum of fatty acids as one of the mechanisms of adaptation/persistence of microorganisms	
<i>Бренёва Н.В., Балахонov С.В.</i> Вопросы эндемичности и энзоотичности лептоспирозов	118
<i>Breneva N.V., Balakhonov S.V.</i> Endemicity and enzooticity aspects of leptospirosis	

РЕЦЕНЗИИ И КРИТИКА (REVIEWS AND CRITIQUE)

<i>Долгушин И.И.</i> О.В.Бухарин, А.А.Стадников, Н.Б.Перунова. Роль окситоцина и микробиоты в регуляции взаимодействий про- и эукариот при инфекции	125
---	-----