

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; О.П. ЖИРНОВ, д.б.н., проф., член-корр. 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; Ю.В. ЛОБЗИН, д.м.н., проф., академик РАН; А.Н. ЛУКАШЕВ, д.м.н., проф., член-корр. РАН; Р.А. МАКСЮТОВ, д.б.н.; 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.; В.П. СЕРГИЕВ, д.м.н., проф., академик РАН; Арег А.ТОТОЛЯН, д.м.н., проф., академик РАН; Л.В. УРЫВАЕВ, д.м.н., проф., член-корр. 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.

6

ноябрь—декабрь

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, г. Москва, М. Казенный пер., 5А, НИИВС им. И.И. Мечникова,
mech.inst@mail.ru

Зав. редакцией Курушина Т. М.

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

Подать статью можно на e-mail: jmei@crie.ru

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Востров А.В.** Протективные эффекты катионов цинка в отношении бактерий *Staphylococcus aureus*, подвергающихся воздействию антибиотиков 5
- Караулов А.В., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Воропаева Е.А., Борисова О.Ю., Воропаев А.Д., Борисова А.Б.** Микробные патогены при урогенитальной инфекции беременных 13
- Кост В.Ю., Сухова О.А., Аколова И.И., Горбачёва Е.О., Лисовская К.В., Ртищев А.А., Маркушин С.Г.** Включение сайт-специфических мутаций в РВ1-ген вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) вируса гриппа А меняет его фенотипические характеристики 21
- Махмудова Н.Р., Ленёва И.А., Ларионова Н.В., Поддубиков А.В., Фалынскова И.Н., Карташова Н.П., Свитич О.А.** Безопасность аттенуированной и рекомбинантной интраназальных гриппозных вакцин в условиях развития вторичной бактериальной суперинфекции 30
- Смирнова Д.И., Петруша О.А., Грачёва А.В., Волынская Е.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б.** Быстрая диагностика генитального герпеса методом петлевой изотермической амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией 40
- Ларионова Н.В., Киселёва И.В., Руденко Л.Г.** Эволюция вирусов гриппа по признаку чувствительности к температуре репродукции 47
- Крылова Н.В., Ленёва И.А., Федореев С.А., Эбралидзе Л.К., Мищенко Н.П., Васильева Е.А., Фалынскова И.Н., Иунихина О.В., Лавров В.Ф., Свитич О.А.** Активность препаратов, содержащих эхинохром А, в отношении вируса простого герпеса 2-го типа *in vitro* и *in vivo* 56
- Николев Г.С., Тодорова Я.Д., Николова М.Х., Емилова Р.Г., Христова Д.М., Костова-Шахид П.И., Петрунов Б.Н.** Субпопуляции Т-регуляторных клеток у пациентов с IgE-обусловленной аллергией 65
- Флуер Ф.С., Панова Я.А., Азанова А.А., Мамычева Е.В.** Обнаружение энтеротоксигенных штаммов *Staphylococcus aureus*, продуцирующих SEC I и SEI, выделенных у больных с пневмонией, сепсисом и ожогами 72

ОБЗОРЫ

- Иванова И.А., Труфанова А.А., Филиппенко А.В., Беспалова И.А., Омельченко Н.Д.** Бактериофаги и иммунная система макроорганизма 79

ИСТОРИЯ НАУКИ

- Сомова Л.М., Андрюков Б.Г.** К 60-летию открытия и изучения дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки 85

ХРОНИКА

- Акимкин В.Г.** Резолюция Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 17–18 октября 2019 г.) 90

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCH

Cheknev S.B., Vostrova E.I., Sarycheva M.A., Vostrov A.V. Protective effects of zinc ions towards *Staphylococcus aureus* bacteria exposed with antibiotics. 5

Karaulov A.V., Afanasiev M.S., Nesvizhsky Yu.V., Afanasiev S.S., Voropaeva E.A., Borisova O.Yu., Voropaev A.D., Borisova A.B. Microbial pathogens in urogenital infection in pregnant women 13

Kost V.Yu., Sukhova O.A., Akopova I.I., Gorbacheva E.O., Lisovskaya K.V., Rtishchev A.A., Markushin S.G. Inclusion of site-specific mutations in the PB1-gene of a virulent A/WSN/33 (H1N1) strain of influenza A virus changes its phenotypic characteristics. 21

Makhmudova N.R., Leneva I.A., Larionova N.V., Poddubikov A.V., Falynskova I.N., Kartashova N.P., Svitich O.A. The safety of attenuated and recombinant nasal influenza vaccines in terms of the development of secondary bacterial superinfection 30

Smirnova D.I., Petrusha O.A., Gracheva A.V., Volynskaya E.A., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Rapid diagnostics of genital herpes by loop-mediated isothermal amplification method with fluorescent detection 40

Larionova N.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Evolution of influenza viruses based on sensitivity to temperature of replication 47

Krylova N.V., Leneva I.A., Fedoreev S.A., Ebralidze L.K., Mishchenko N.P., Vasileva E.V., Falynskova I.N., Iunikhina O.V., Lavrov V.F., Svitich O.A. Activity of compounds containing echinochrome A against herpes simplex virus type 2 *in vitro* and *in vivo* 56

Nikolov G.S., Todorova Y.D., Nikolova M.H., Emilova R.G., Hristova D.M., Kostova-Shahid P.J., Petrunov B.N. Subsets of T regulatory cells in patients with IgE-mediated allergy 65

Fluer F.S., Panova Ya.A., Azanova A.A., Mamycheva E.V. Detection of enterotoxigenic strains *Staphylococcus aureus*, producing SEC and SEI, isolated in patients with pneumonia, sepsis and burns 72

REVIEWS

Ivanova I.A., Trufanova A.A., Filippenko A.V., Bespalova I.A., Omelchenko N.D. Bacteriophages and the immune system of the macroorganism 79

HISTORY OF SCIENCE

Somova L.M., Andryukov B.G. On the 60th anniversary of discovery and study of the far eastern scarlet-like fever 85

CHRONICLE

AKIMKIN V.G. Resolution of the All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation «Modern immunization: challenges, opportunities, prospects», Moscow, October 17-18, 2019. 90

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

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

ПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ КАТИОНОВ ЦИНКА В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИЙ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ПОДВЕРГАЮЩИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ АНТИБИОТИКОВ

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия

Цель работы – оценка чувствительности бактерий *Staphylococcus aureus* к стандартному набору антибиотиков при нанесении на диск с антибиотиком катионов цинка или в условиях предобработки катионами цинка газона бактерий.

Материалы и методы. Суспензию бактерий *S. aureus*, содержащую 10^8 КОЕ/мл, засеивали газоном на чашки Петри с питательным агаром. Спустя 30 мин на поверхность газона по стандартному шаблону помещали диски с антибиотиками. Катионы цинка применяли в виде водного сульфата $ZnSO_4 \times 7H_2O$ в 0,15 М растворе NaCl. Раствор в объёме 5 мкл наносили на диски с антибиотиками непосредственно после их размещения на поверхности газона или предварительно на поверхность газона с 10-минутной экспозицией на местах последующей установки дисков с антибиотиками. Затем чашки с культурой бактерий инкубировали в течение суток при 37 °С, после чего определяли диаметр зоны задержки роста бактерий.

Результаты и обсуждение. В присутствии на диске с антибиотиком 1,0 мкг/мл катионов цинка снижение чувствительности *S. aureus* к действию антибиотиков отмечено в 2,9% наблюдений. В присутствии одного, четырёх или восьми катионов цинка на молекулу антибиотика на диске протекция бактерий зарегистрирована в 1,4–5,7% случаев. После предобработки газона катионами цинка защита бактерий от последующего воздействия антибиотиков определена в 27,3–45,5% наблюдений.

Заключение. В условиях предобработки газона катионы цинка оказывают выраженное протективное действие на бактерии *S. aureus*, подвергающиеся последующему воздействию антибиотиков.

Ключевые слова: *S. aureus*; антибиотики; протекция; катионы цинка.

Для цитирования: Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Востров А.В. Протективные эффекты катионов цинка в отношении бактерий *Staphylococcus aureus*, подвергающихся воздействию антибиотиков. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6): 5-12.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-5-12>

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

PROTECTIVE EFFECTS OF ZINC IONS TOWARDS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BACTERIA EXPOSED WITH ANTIBIOTICS

Federal State Budgetary Institution «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F.Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098, Russia

Objective. The work was performed with the purpose to study susceptibility of *S. aureus* bacteria to the action of the standard spectrum of antibiotics in presence of zinc ions used on the disks with antibiotics or on the lawn of the bacterial culture preliminarily to antibiotics treatment.

Materials and methods. Suspensions of *S. aureus* bacteria which contained 10^8 CFU/ml were sown by the lawns into the standard Petri dishes coated with the supplemented Nutrient Agar. 30 min later the standard disks with antibiotics were passed on the surface

Для корреспонденции: Чекнёв Сергей Борисович, д-р мед. наук, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: cheknev@gamaleya.org

of the lawn, and zinc sulfate was added by the drops of the volume of 5 µl on the surface of the disk. 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. In some tests preliminarily to the disks with antibiotics passing the places of following disks application were treated with the zinc sulfate for 10 min at the room temperature.

Results and discussion. In presence of 1.0 µg/ml of zinc ions on the disk with antibiotics protective action of the metal towards the bacteria was registered at 2.9 per cent observations. In presence of one, four or eight zinc ions per one molecule of antibiotic protective action was registered at 1.4-5.7 per cent observations. Treatment with zinc ions of the surfaces of lawns followed by the disks installation resulted in 27.3-45.5 per cent observations of reducing diameter of the area of bacterial growth inhibition.

Conclusion. The treatment of the surface of the lawn of *S. aureus* bacteria with zinc ions cause protection of the bacteria from the following inhibitory antibiotics action.

Keywords: *S. aureus*; antibiotics; protection; zinc ions.

For citation: Cheknev S.B., Vostrova E.I., Sarycheva M.A., Vostrov A.V. Protective effects of zinc ions towards *Staphylococcus aureus* bacteria exposed with antibiotics. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6): 5-12. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-5-12>

For correspondence: Sergey B. Cheknev, Doctor of Medical Sciences, Deputy Director for Science, Head of the Lab. of Cell to Cell Interactions, N.F. Gamaleya NRCEM of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098, Russia.

E-mail: cheknev@gamaleya.org

Information about authors:

Cheknev S.B., <http://orcid.org/0000-0002-9512-7148>

Vostrova E.I., <http://orcid.org/0000-0002-9214-0590>

Sarycheva M.A., <http://orcid.org/0000-0003-0250-1581>

Vostrov A.V., <http://orcid.org/0000-0003-2834-537X>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 17 July 2019

Accepted 20 October 2019

Введение

Антибактериальные свойства катионов цинка, специфически проявляющиеся, в частности, на клинических изолятах *Streptococcus pyogenes* [1], *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [2], на шига-токсигенных *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* [3], а также способность металла блокировать развитие SOS-реакций, ведущих посредством индукции гипермутагенеза к формированию устойчивости бактерий к действию антибиотиков [3], определяют методологию комбинирования цинка с антибактериальными препаратами. По мнению исследователей, это должно повышать эффективность последних в терапии хронических инфекций, поскольку применение классических антибиотиков не позволяет достичь полной элиминации возбудителя и купирования инфекционного процесса [4–6].

Действительно, комплексы цинка с соединениями группы фторхинолонов – левофлоксацином и ципрофлоксацином – за счёт изменения проницаемости клеточной мембраны обладают более высокой антимикробной активностью в отношении бактерий *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *Bacillus dysenteriae*, чем исходные антибиотики [4, 5]. Связавший цинк и полимеризованный им ванкомицин реализует повышенную активность против резистентных к самому ванкомицину бактерий [6]. В составе эритромицин-цинкового комплекса цинк предотвращает развитие бактериальной резистентности к эритромицину.

В то же время образование антибиотиками комплексов с цинком может приводить не только к повышению, но и к снижению их антимикробного потенциала, что позволяет трактовать взаимодействие металлов с антибиотиками в качестве фактора, в определённой мере препятствующего достижению эффекта антимикробной химиотерапии.

Целью работы стала оценка чувствительности бактерий *S. aureus* к действию стандартного набора антибиотиков при нанесении на диск с антибиотиком катионов цинка или в условиях предобработки катионами цинка газона бактерий.

Материалы и методы

Первичные культуры бактерий *S. aureus* получены принятым методом посева патологического биоматериала человека на элективные и селективные питательные среды. В работе использовали 10 клинических изолятов *S. aureus*, предварительно охарактеризованных по чувствительности к антибактериальным препаратам с использованием диско-диффузионного метода и стандартных условий.

Для постановки реакций стандартизованную суспензию бактерий, полученную из суточных культур *S. aureus* и содержащую 10^8 КОЕ/мл, засеивали газонем из объёма 1,0 мл суспензии в физиологическом растворе на стандартные стерильные чашки Петри диаметром 90 мм с питательным агаром Мюллера–Хинтона (ООО «НИЦФ», Санкт-Петербург). Спустя 30 мин на поверхность газона по стандартному шаблону помещали бумажные диски, пропитанные антибиотиками. Использовали расширенный набор из 14 дисков для определения чувствительности стафилококков к противомикробным лекарственным средствам (№011214, ООО «НИЦФ», Санкт-Петербург).

Катионы цинка применяли в виде водного сульфата $ZnSO_4 \times 7H_2O$ в 0,15 М растворе NaCl (pH 7,16–7,62). Раствор в объёме 5 мкл наносили на диски с антибиотиками непосредственно после их размещения на поверхности газона, добиваясь полного смачивания диска. Искомая концентрация катионов цинка на диске составляла 1,0 мкг/мл или соответствовала одному, четырём или восьми катионам на молекулу антибиотика. В отдельных экспериментах содержащий катионы цинка в искомых концентрациях 0,15 М раствор NaCl (pH 7,6–7,8) в объёме 5 мкл наносили непосредственно на поверхность газона по стандартному шаблону и выдерживали 10 мин экспозиции при комнатной температуре, после чего на местах нанесения катионов цинка размещали диски с антибиотиками.

Чашки Петри, содержавшие размещённые на газоне культуры бактерий *S. aureus* диски с антибиотиками и катионы цинка, инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. По истечении срока инкубации результат учитывали, определяя диаметр зоны задержки роста культуры с использованием угловой линейки Partigen (Behringwerke AG, Германия).

Для каждого клинического изолята бактерий использовали не менее двух параллельных постановок.

На препаративном этапе исследования маточный раствор сульфата цинка в 0,15 М NaCl стерилизовали методом мембранной фильтрации с использованием насадок для водно-солевых растворов Millex с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США), после чего готовили образцы с искомой концентрацией катионов металла в 0,15 М растворе NaCl.

В ходе экспериментов кислотность 0,15 М раствора NaCl контролировали с помощью базового электронного pH-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

В присутствии на диске с антибиотиком катионов цинка в физиологической концентрации 1,0 мкг/мл зона задержки роста *S. aureus* увеличилась в диаметре на 3,0 мм и более в 8 (5,7%) из 140 наблюдений и уменьшилась на 3,0 мм и более – в 4 (2,9%). Тенденция к повышению чувствительности *S. aureus* проявилась на газоне бактерий, подверженных воздействию клиндамицина, линезолида и левомецетина (по 2 наблюдения); тенденция к снижению чувствительности обнаружилась при обработке газона (другие изоляты) левомецетином (2 наблюдения).

Из наиболее показательных по средним значениям эффектов катионов цинка следует отметить увеличение диаметра зоны задержки роста *S. aureus* в присутствии клиндамицина на 4,1% ($p > 0,1$), в присутствии ванкомицина – на 4,0% ($p < 0,1$).

В присутствии на диске эквимольных по отношению к антибиотику количеств катионов цинка зона задержки роста *S. aureus* увеличилась в диаметре в 10 (7,1%) из 140 наблюдений и уменьшилась в 2 (1,4%). Тенденция к повышению чувствительности *S. aureus* проявилась на газоне бактерий, подверженных воздействию линезолида и ко-тримоксазола (по 2 наблюдения), левомицетина (4 случая).

Наиболее показательно увеличение диаметра зоны задержки роста *S. aureus* в присутствии рифампицина на 3,15% ($p > 0,1$), в присутствии левомицетина – на 11,5% ($p < 0,1$) и уменьшение в присутствии ванкомицина – на 3,4% ($p > 0,1$).

В присутствии на диске четырёх катионов цинка на молекулу антибиотика зона задержки роста *S. aureus* увеличилась в 1 (0,7%) из 140 наблюдений и уменьшилась в 3 (2,1%). В присутствии линезолида диаметр зоны задержки роста *S. aureus* увеличился на 4,5% ($p > 0,1$), доксициклина – на 2,7%, левомицетина – на 2,2%, а в присутствии фузидина натрия уменьшился на 2,9%.

В присутствии на диске восьми катионов цинка на молекулу антибиотика зона задержки роста *S. aureus* увеличилась в 3 (2,1%) из 140 наблюдений и уменьшилась в 8 (5,7%). Тенденция к повышению чувствительности *S. aureus* проявилась на газоне бактерий, подверженных воздействию доксициклина, – 2 наблюдения. Тенденция к снижению чувствительности обнаружилась при обработке газона бензилпенициллином, оксациллином и гентамицином – по 2 наблюдения.

Диаметр зоны задержки роста *S. aureus* в присутствии доксициклина увеличился на 5,4%, в присутствии левомицетина – на 4,4% ($p > 0,1$), тогда как в присутствии бензилпенициллина уменьшился на 4,0%, оксациллина – на 5,6%, эритромицина – на 3,3% ($p > 0,1$), ципрофлоксацина – на 3,3%, левофлоксацина – на 4,2%, фузидина натрия – на 3,5% ($p > 0,1$).

Предобработка газона бактерий в области последующей установки диска с антибиотиком катионами цинка (8 катионов на молекулу антибиотика) способствовала увеличению диаметра зоны задержки роста *S. aureus* на 1,0 мм и более в 4 (12,1%) из 33 проведённых наблюдений и уменьшению на 1,0 мм и более – в 9 (27,3%). Тенденция к повышению чувствительности *S. aureus* проявилась на газоне бактерий, подверженных воздействию оксациллина, – 3 случая. Тенденция к снижению чувствительности обнаружилась при обработке газона ципрофлоксацином, левофлоксацином и фузидином натрия – по 2 наблюдения.

Как показывают данные **табл. 1**, по сравнению с действием катионов цинка, нанесённых на диск с антибиотиком, предобработка газона катионами цинка оказывает на 7,2% ($p < 0,05$) более выраженное протективное действие на бактерии *S. aureus*, которые становятся при этом на 10,5% ($p < 0,01$) более устойчивыми к действию применённого спектра антибиотиков по сравнению с контролем без металла.

Предобработка газона бактерий катионами цинка, применёнными в эквимольном отношении к антибиотику, способствует увеличению диаметра зоны задержки роста *S. aureus* в 1 (3,0%) из 33 наблюдений и уменьшению – в 15 (45,5%). Тенденция к снижению чувствительности обнаружилась при обработке газона оксациллином, левофлоксацином и фузидином натрия – по 3 наблюдения.

Как показывают данные **табл. 2**, по сравнению с действием катионов цинка, нанесённых на диск с антибиотиком, предобработка газона катионами цинка оказывает на 10,4% ($p < 0,05$) более выраженное протективное действие на бактерии *S. aureus*, которые становятся при этом на 9,3% ($p > 0,1$) более устойчивыми к действию применённого спектра антибиотиков, чем в контроле без металла.

Обсуждение

Эволюционная динамика бактериальных популяций в контексте их адаптации к условиям окружающей среды и персистенции в организме хозяина формирует ряд ме-

Таблица 1

Зоны задержки роста *S. aureus* в условиях локальной 10-минутной предобработки газона бактерий катионами цинка ($M \pm m, n = 9$). Восемь катионов цинка на молекулу антибиотика

Группы наблюдения	Зона задержки роста, мм	Протективный эффект, %
Контроль	25,7 ± 0,33	–
Цинк на диске	24,8 ± 0,40	3,5
Цинк – предобработка	23,0 ± 0,44*	7,2
Цинк – предобработка по сравнению с контролем	23,0 ± 0,44**	10,5

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с цинком на диске; ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Таблица 2

Зоны задержки роста *S. aureus* в условиях локальной 10-минутной предобработки газона бактерий катионами цинка ($M \pm m, n = 13$). Один катион цинка на молекулу антибиотика

Группы наблюдения	Зона задержки роста, мм	Протективный эффект, %
Контроль	23,7 ± 0,70	–
Цинк на диске	24,0 ± 0,51	–
Цинк – предобработка	21,5 ± 0,63*	10,4
Цинк – предобработка по сравнению с контролем	21,5 ± 0,63	9,3

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с цинком на диске.

ханизмов, позволяющих бактериям поддерживать режимы продуктивного развития, даже подвергаясь воздействию неблагоприятных факторов макро- и микроокружения. К числу таких механизмов правомерно отнести на первый взгляд не связанные между собой тонкие настройки гомеостаза тяжёлых металлов, в первую очередь цинка, содержание которого в клетках разных видов бактерий поддерживается на достаточно близком уровне при относительно невысоком диапазоне варибельности [7, 8], способность к образованию биоплёнок, существенно повышающих устойчивость микробов к действию токсичных соединений и антибиотиков [9, 10], генерацию популяций персистеров, обеспечивающих бактериям переживание неблагоприятных условий окружения и восстановление в последующем процессов персистенции [11, 12].

Поскольку металлы не синтезируются и не подлежат деградации в биологических системах, поддержание их гомеостаза определяется регуляцией транспортных и обменных процессов между клеткой и окружающей её средой [7]. На ограничение доступности металлов бактериальная клетка отвечает дерепрессией высокоаффинных систем импорта, заменой металлозависимых белков и ферментов на металлонеинdependимые, мобилизацией металла из внутриклеточных депо, перепрограммированием протеома на трансляционную репрессию синтеза менее важных для её жизнеобеспечения ферментов [7].

Первостепенная роль цинка в процессах деления бактериальной клетки и поддержания её жизнедеятельности в ходе инфекционного процесса обуславливает экспрессию бактериями *Streptococcus pneumoniae* специфических импортёров цинка AdcA и AdcAII, продукцию *S. aureus* металлофора стафилолина и высокоаффинных специфических транспортёров, наличие в протеоме *Bacillus subtilis* белков, связывающих цинк с константами порядка 10^{-15} М, которые определяют содержание у бактерий, соответствующих по размерам *B. subtilis*, не более 10^6 атомов цинка на клетку и отсутствие в физиологических условиях полностью гидратированного (свободного) цинка в цитозоле [8].

Активное потребление бактериями катионов цинка, даже в условиях применения относительно низких сублетальных концентраций металла, вызывает форсирование мутагенеза и обогащение *de novo* мутантов, селекционируемых под давлением механизмов отбора на проявление множественной устойчивости к антибиотикам. Одновременно физиологические концентрации цинка (но не кальция или магния) спо-

способствуют формированию биоплёнок *S. aureus*, образующихся с участием фибронектин-связывающих белков [13] и переводящих бактерии в семидормантное состояние. Микроорганизмы оказываются недоступными для распознавания и не подлежат элиминации нейтрофилами и макрофагами организма хозяина, обретая при этом устойчивость к антибиотикам [13].

Биоплёнки *S. aureus*, формирующиеся у бактерий в условиях повышенной агрегации из подобных биоплёнкам кластеров, которые образуются вследствие снижения активности регуляторной системы Agr, ответственной за диспергирование биоплёнок посредством синтеза фенол-растворимых модулинов [9], совокупностью химических, физических и физиологических механизмов, включая факторы фенотипической диверсификации популяций, создают условия для защиты бактерий от антибиотиков, дезинфектантов и тяжёлых металлов [10]. Даже высокие концентрации антибиотиков не эффективны в отношении бактерий *S. aureus*, переведённых в состояние биоплёнки [9, 10].

Вместе с тем биоплёнки стафилококков, как и других патогенных плёнокообразующих бактерий – стрептококков, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, создают условия для проявления генерации или собственно генерации клеток-персистеров, метаболически неактивных клеточных форм, находящихся в дормантном состоянии, близком к некультивируемому, с заблокированными на активную реализацию процессами биосинтеза РНК, ДНК, белков, пептидогликанов и фолиевой кислоты, служащими мишенями воздействия классических антибиотиков [11, 12]. В силу особенностей метаболизма и физиологического состояния персистеры защищены от действия классических антибиотиков и тяжёлых металлов [11, 12, 14, 15], активно экспрессируют энергозависимый экспортирующий белок TolC, способствующий эффективному выведению токсичных соединений из клетки [14], гены шаперонов, регулоны множественной устойчивости к антибиотикам, белки холодового шока [10], определяются в клеточных биоплёнках в количествах, в тысячи раз превышающих содержание этих клеточных форм в планктонных популяциях [10]. Для разработки средств борьбы с такими персистентными инфекциями требуются принципиально иные, нежели основанные на воздействии на активные метаболические процессы в популяции возбудителей, подходы к антимикробной химиотерапии [11, 12, 15].

В контексте описанных механизмов переживания бактериями неблагоприятных условий существования даже кратковременная экспозиция с катионами цинка индуцирует переход возбудителей в некультивируемое состояние, связанное с генерацией клеток-персистеров. Реализация эффектов катионов в ходе образования биоплёнок *S. aureus* с участием фибронектин-связывающих белков происходит на стадии, следующей сразу за первичным прилипанием [13]. В полностью сформированных биоплёнках *E. coli* цинк не проникает глубоко и действует по поверхности матрикса [10].

Следовательно, обменные процессы, связанные с транспортом катионов цинка, образование биоплёнок и генерация персистеров обоснованно представляются механизмами обеспечения переживания бактериальных популяций, имеющими глубокие, последовательно реализуемые причинно-следственные связи, в совокупность которых катионы цинка вовлечены на инициальных и ранних постинициальных этапах [10, 13].

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о протективном действии катионов цинка, нанесённых на диск с антибиотиком, в отношении бактерий *S. aureus*, подвергающихся воздействию этого антибиотика. Эффект реализуется при использовании физиологической концентрации цинка (протекция бактерий в 2,9% наблюдений) и в присутствии на диске одного, четырёх или восьми катионов цинка на молекулу антибиотика (последовательное нарастание от 1,4 до 5,7% случаев протекции). При этом наиболее выраженное протективное действие катионов (от 27,3 до 45,5% наблюдений в селекционированных по чувствительности изолятах) отмечено в условиях 10-минутной предобработки газона бактерий катионами цинка на местах последующей установки диска с антибиотиком. В этих опытах до половины наблюдений демонстрировали очевидное протективное действие определённой концентрации катионов цинка (см. табл. 1 и 2).

Можно спорить о том, насколько правомерны сравнение начальных этапов формирования газона бактерий с инициальными стадиями образования биоплёнок и рассмотрение краткосрочной экспозиции катионов цинка с клетками на формирующемся газоне в качестве подобия дисперсии катионов по поверхности плёнки [10, 13], но не подлежит сомнению высочайшая скорость реагирования микробов на присутствие тяжёлого металла, отражающая быстрое включение механизмов стрессовых реакций в условиях реализации токсического воздействия. Произведённые расчёты показывают, что концентрации цинка в местах предобработки газона бактерий, ответивших на воздействие металла снижением чувствительности к антибиотикам, по отношению к которым они и были подобраны, варьировали в диапазоне от 0,25 до 2,0 мг/мл, а в отдельных наблюдениях достигали 8,0 мг/мл, т.е. более чем на 3 порядка превышали физиологические и следовательно могут оцениваться в качестве токсичных.

Снижение чувствительности бактерий к антибиотикам выступает естественным следствием немедленного включения *S. aureus* механизмов протекции популяции от токсического воздействия тяжёлого металла, общность которых с механизмами защиты бактерий от других неблагоприятных воздействий хорошо документирована в научной периодике [10].

Заключение

В совокупности современных представлений о природе и путях возникновения множественной лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний человека, связывающих динамическое нарастание количества резистентных к антибиотикам и другим антимикробным препаратам бактерий с наличием в экосистеме доступных микробам меди и цинка в условиях продолжающегося нарастания содержания тяжёлых металлов в окружающей среде, появляется важнейшая временная категория, определяющая эволюционную динамику резистентности как процесс, запускаемый импульсным воздействием тяжёлых металлов, конкретно – цинка, и, не исключено, не контролируемый в дальнейшем для подвергшейся такому воздействию популяции бактерий меняющимися условиями окружения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3-15 см. REFERENCES)

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. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; (3): 26-35.
2. Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Аapresова М.А., Писковская Л.С., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии катионов меди и цинка. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; (2): 9-17.

REFERENCES

1. Cheknev S.B., Vostrova E.I., Sarycheva M.A., Kasil' S.V., Anisimov V.V., Vostrov A.V. Inhibition of the bacterial growth in the cultures of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* in presence of copper and zinc ions. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; (3): 26-35. (in Russian)
2. Cheknev S.B., Vostrova E.I., Apresova M.A., Piskovskaya L.S., Vostrov A.V. Deceleration of bacterial growth in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* cultures in the presence of copper and zinc cations. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; (2): 9-17. (in Russian)
3. Bunnell B.E., Escobar J.F., Bair K.L., Sutton M.D., Crane J.K. Zinc blocks SOS-induced antibiotic resistance via inhibition of RecA in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2017; 12(5): e0178303. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178303>
4. Chohan Z.H., Supuran C.T., Scozzafava A. Metal binding and antibacterial activity of ciprofloxacin complexes. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2005; 20(3): 303-7. Doi: <https://doi.org/10.1080/14756360310001624948>
5. Uivarosi V. Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update. *Molecules*. 2013; 18(9): 11153-97. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules180911153>
6. Zarkan A., Mackline H.R., Chirgadze D.Y., Bond A.D., Hesketh A.R., Hong H.J. Zn(II) mediates vancomycin polymerization and potentiates its antibiotic activity against resistant bacteria. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 4893. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04868-2>

7. Chandrangsu P., Rensing C., Helmann J.D. Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* 2017; 15(6): 338-50. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.15>
8. Ma Z., Chandrangsu P., Helmann T.C., Romsang A., Gaballa A., Helmann D. Bacillithiol is a major buffer of the labile zinc pool in *Bacillus subtilis*. *Molec. Microbiol.* 2014; 94(4): 756-70. Doi: <https://doi.org/10.1111/mmi.12794>
9. Dastgheyb S.S., Villaruz A.E., Le K.Y., Tan V.Y., Duong A.C., Chatterjee S.S., et al. Role of phenol-soluble modulins in formation of *Staphylococcus aureus* biofilms in synovial fluid. *Infect. Immun.* 2015; 83(7): 2966-75. Doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.00394-15>
10. Harrison J.J., Ceri H., Turner R.J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5(12): 928-38.
11. Hurdle J.G., Deshpande A. Bacterial persister cells tackled. *Nature.* 2018; 556(7699): 40-1. Doi: <https://doi.org/10.1038/d41586-018-03440-w>
12. Hurdle J.G., O'Neill A.J., Chopra I., Lee R.E. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9(1): 62-75. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2474>
13. Geoghegan J.A., Monk I.R., O'Gara J.P., Foster T.J. Subdomains N2N3 of fibronectin binding protein A mediate *Staphylococcus aureus* biofilm formation and adherence to fibrinogen using distinct mechanisms. *J. Bacteriol.* 2013; 195(11): 2675-83. Doi: <https://doi.org/10.1128/JB.02128-12>
14. Gerdes K., Semsey S. Pumping persisters. *Nature.* 2016; 534(7605): 41-2. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature18442>
15. Kim W., Zhu W., Hendricks G.L., Van Tyne D., Steele A.D., Keohane C.E., et al. A new class of synthetic retinoid antibiotics effective against bacterial persisters. *Nature.* 2018; 556(7699): 103-7. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature26157>

Поступила 17.07.19

Принята в печать 20.10.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Караулов А.В.¹, Афанасьев М.С.¹, Несвижский Ю.В.¹, Афанасьев С.С.²,
Воропаева Е.А.², Борисова О.Ю.², Воропаев А.Д.², Борисова А.Б.²

МИКРОБНЫЕ ПАТОГЕНЫ ПРИ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ БЕРЕМЕННЫХ

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), 119991, г. Москва, Россия;

²Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, 125212, г. Москва, Россия

Введение. При беременности часто активизируются хронические и латентные инфекции. **Цель** – установление патогенетической роли микробных патогенов при урогенитальной инфекции (УГИ) беременных.

Материалы и методы. Проводили общеклиническое обследование 89 беременных с исследованием мазков, бактериологическим посевом вагинального содержимого; иммуноферментный анализ, полимеразную цепную реакцию и определение антител для верификации вируса простого герпеса (ВПГ) I и II типа, цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) и возбудителей УГИ беременных в крови и соскобах слизистых.

Результаты. Превалировали *Herpesviridae* (в 90–100% случаев – ВЭБ, ВПГ I и II типа, ЦМВ), в 41% случаев выявлены возбудители бактериальной природы, в 57% случаев – микоплазмы, уреоплазмы.

Обсуждение. При преждевременных родах и прерывании беременности чаще выявлялись микоплазмы и уреоплазмы, а при прерывании беременности – ассоциация ВПГ I и II типа по сравнению со срочными родами; при последних одинаково часто – ВПГ I типа и ассоциация ВПГ I и II типа; при срочных родах (инфицированность) чаще ВПГ I типа, чем ассоциация ВПГ I и II типа; при преждевременных родах чаще ВПГ I типа, чем ассоциация ВПГ I и II типа, и реже, чем сочетание ВПГ I типа и ассоциации ВПГ I и II типа при прерывании беременности; при последней чаще – ассоциация ВПГ I и II типа, чем ВПГ I типа. Повышение уровней экспрессии генов TLRs зависит от ВПГ I типа меньше, чем от ассоциации ВПГ I и II типа, меньше чем от сочетания ВПГ I типа и ассоциации ВПГ I и II типа (определяет клинические проявления генитального герпеса).

Заключение. Микробные патогены определяют характер развития беременности, а ВПГ I и II типа – триггеры инфекционного процесса, прогнозирующие его развитие.

Ключевые слова: микробные патогены; характер развития беременности; клинические проявления; триггеры; инфекционный процесс.

Для цитирования: Караулов А.В., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Афанасьев С.С., Воропаева Е.А., Борисова О.Ю., Воропаев А.Д., Борисова А.Б. Микробные патогены при урогенитальной инфекции беременных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6): 13-20.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-13-20>

Karaulov A.V.¹, Afanasiev M.S.¹, Nesvizhsky Yu.V.¹, Afanasiev S.S.²,
Voropaeva E.A.², Borisova O.Yu.², Voropaev A.D.², Borisova A.B.²

MICROBIAL PATHOGENS IN UROGENITAL INFECTION IN PREGNANT WOMEN

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991, Russia;

²G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, 125212, Russia

Introduction. Chronic and latent infections are often activated during pregnancy.

Aim - to assess the pathogenetic role of microbial pathogens in urogenital tract infection (UTI) in pregnant women.

Для корреспонденции: Караулов Александр Викторович, академик РАН, заведующий кафедрой клинической аллергологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), 119991, г. Москва. E-mail: drkaraulov@mail.ru

Materials and methods. 89 pregnant women underwent general clinical examination, examination of smears from urethra, vagina, cervical canal; bacteriological analysis of vaginal contents; enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction and determination of specific antibodies for verification of herpes simplex virus (HSV) type I and II, cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr (EBV) and UTI pathogens in pregnant women in blood and mucosal scrapes.

Results. Prevalence of *Herpesviridae* was revealed (90-100% -EBV, HSV type I and II, CMV); in 41% of cases - bacterial pathogens, in 57% of cases - Mycoplasma, Ureaplasma.

Discussion. In preterm birth and pregnancy termination mycoplasma and ureaplasma were more often revealed, and in pregnancy termination - association of HSV type I and II in comparison with urgent birth; in the last equally often - HSV type I and association of HSV type I and II; in urgent birth (infection) more often - HSV type I, than association of HSV type I and II; in preterm birth more often - HSV type I, than the association of HSV types I and II, and less often than combination of HSV type I and association of HSV types I and II in pregnancy termination; in the last, the association of HSV types I and II is more common than HSV type I. Increase of TLRs genes expression levels depends on HSV type I less than from association of HSV types I and II, less than from combination of HSV type I and association of HSV types I and II (it determines the clinical manifestations of genital herpes).

Conclusion. Microbial pathogens determine the character of pregnancy course, and HSV types I and II- are the triggers of the infectious process, prognosing its course.

Keywords: *microbial pathogens; pregnancy course character; clinical manifestations; triggers; infectious process.*

For citation: Karaulov A.V., Afanasiev M.S., Nesvizhsky Yu.V., Afanasiev S.S., Voropaeva E.A., Borisova O.Yu., Voropaev A.D., Borisova A.B. Microbial pathogens in urogenital infection in pregnant women. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6): 13-20. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-13-20>

For correspondence: Alexandr V. Karaulov, Academician of RAS, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Clinical Allergy and Immunology of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russia. E-mail: drkaraulov@mail.ru

Information about authors:

Karaulov A.V. <https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

Afanasiev M.S. <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>

Nesvizhsky Y.V. <http://orcid.org/0000-0003-0386-3883>

Afanasiev S.S. <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>

Voropaeva E.A. <http://orcid.org/0000-0002-0463-0136>

Borisova O.Y. <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>

Voropaev A.D. <https://orcid.org/0000-0002-6431-811X>

Borisova A.B. <https://orcid.org/0000-0003-4425-8428>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 04 June 2019

Accepted 24 September 2019

Введение

Женщины чаще являются бессимптомными носителями микоплазм, уреаплазм, хламидий, хотя в некоторых случаях у них развиваются бактериальные циститы, вагиниты и сальпингиты. Бессимптомное носительство этих инфекций оценивается как состояние риска. Во многих случаях уреаплазмы и хламидии вызывают латентную инфекцию, которая под влиянием различных стрессовых факторов может перейти в хроническую рецидивирующую форму или в острую инфекцию [1, 2]. Значительное распространение хронических инфекционно-воспалительных заболеваний у женщин фертильного возраста, снижение неспецифической резистентности приводят к длительной персистенции патогенных возбудителей в организме беременных и к росту частоты внутриутробной инфекции (ВУИ), которая обуславливает срывы адаптации у новорождённых и способствует увеличению у них числа инфекционных осложнений.

Не существует ярко выраженных специфических симптомов, свойственных данной патологии, и отсутствует корреляция между тяжестью инфекционной патологии беременной и поражением плода [3, 4]. При беременности на фоне физиологического иммунодефицита и гормональных изменений часто активизируются хронические и латентные инфекции [5, 6]. С инфекционной патологией женских половых органов тесно связаны воспалительные заболевания гениталий, хронические тазовые боли, осложнённое течение беременности, в том числе привычное невынашивание, преждевременные роды, плацентарная недостаточность, задержка развития плода, ВУИ плода и новорождённого. Известно, что организм беременной предрасположен к инвазии патогенных микроорганизмов и последующему их развитию. Инфекционные заболевания, встречающиеся во время гестационного процесса, можно подразделить на инфекции, передаваемые половым путём, воспалительные заболевания органов малого таза, инфекционные осложнения послеродового периода, а также экстрагенитальные и нозокомиальные инфекции. Генитальные инфекции являются основными факторами риска преждевременного разрыва плодных оболочек, хориоамнионита и, соответственно, преждевременных родов, а также ВУИ плода [7–10].

Цель исследования – установление патогенетической роли микробных патогенов при урогенитальной инфекции (УГИ) беременных.

Материалы и методы

Обследованы 89 женщин на сроке I, II триместров гестации в возрасте от 18 до 35 лет (средний возраст $27,5 \pm 5,6$ года). *Критерии включения* пациенток в исследовательскую когорту: физиологическое наступление беременности, сроки гестации 8–20 нед, письменное согласие на проведение клинического лабораторного исследования и обработку персональных данных, отсутствие эндокринных, аутоиммунных и генетических заболеваний. Всем пациенткам помимо стандартного общеклинического обследования проводили микроскопическое исследование мазка отделяемого половых путей (из трёх точек: уретра, влагалище, цервикальный канал), бактериологический посев вагинального содержимого, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с наборами ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия) для определения титров специфических антител к вирусу простого герпеса (ВПГ) I и II типа, цитомегаловирусу (ЦМВ) и вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ). Для определения ВПГ I и II типа, ЦМВ, ВЭБ, изучения спектра возбудителей УГИ беременных в крови и соскобах со слизистых урогенитального тракта применяли полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием коммерческих тест-систем ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва, Россия).

Математическую обработку полученных данных проводили с использованием методов вариационной статистики (пакет Statistica 8.0 и MS Office Excel 2010). По каждому признаку в сравниваемых группах определяли среднюю арифметическую величину (M) со средним квадратическим отклонением изученных показателей или с вычислением ошибки средней арифметической (m). Группы количественных и порядковых признаков сравнивали с помощью двустороннего t -критерия Стьюдента для независимых переменных с вероятностью $p < 0,05$. Группы номинальных признаков сравнивали с помощью критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса, и если хотя бы одна частота была менее 5 – точного метода Фишера. Нулевую гипотезу отвергали при критическом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

У 62% из 89 обследованных (табл. 1) зарегистрированы инфицирование и клинические проявления (КПР) УГИ беременных (острые инфекционно-воспалительные заболевания, лабиальный герпес и другие проявления генитального герпеса рецидивирующего и нерецидивирующего характера), а у 39% – только инфицирование (различия по частоте встречаемости КПР достоверны, $\chi^2 = 7,28$ при $p < 0,01$). С учётом наличия или отсутствия КПР, а также характера развития беременности среди обследо-

дованных выделили несколько групп: срочные роды (инфицированность) и срочные роды (инфицированность, КПП), преждевременные роды (инфицированность, КПП и их рецидивы), прерывание беременности (инфицированность, КПП и их рецидивы). При инфекционно-воспалительных заболеваниях урогенитального тракта у 36% из 89 беременных регистрируются срочные роды (инфицированность), у 26% – срочные роды, у 27% – преждевременные роды, у 11% – прерывание беременности. При сравнении частоты регистрации получены следующие данные: срочные роды (инфицированность) со срочными родами – $\chi^2 = 0$; срочные роды (инфицированность) со срочными родами (инфицированность) и срочными родами – $\chi^2 = 10,88, p < 0,001$; срочные роды (инфицированность) с преждевременными родами – $\chi^2 = 0$; срочные роды (инфицированность) с прерыванием беременности – $\chi^2 = 13,74, p < 0,001$. При сравнении частоты регистрации срочных родов с частотой регистрации срочных родов (инфицированность) и срочных родов – $\chi^2 = 21,93, p < 0,001$; срочных родов с преждевременными родами – $\chi^2 = 0$; срочных родов и прерывания беременности – $\chi^2 = 5,36, p < 0,05$. Различия между частотой регистрации у беременных групп срочные роды (инфицированность) и срочные роды – преждевременные роды: $\chi^2 = 20,48, p < 0,001$, группы срочные роды (инфицированность) и срочные роды – прерывание беременности $\chi^2 = 46,92, p < 0,001$; преждевременные роды – прерывание беременности $\chi^2 = 15,76, p < 0,001$. Следовательно, различия по частоте регистрации между выделенными группами достоверны за исключением срочные роды (инфицированность) – срочные роды, срочные роды (инфицированность) – преждевременные роды, срочные роды – преждевременные роды. При срочных родах (инфицированность) частота регистрации у беременных рецидивов КПП (0%, $n = 28$) была ниже таковой при преждевременных родах (92%, $n = 25$) – $\chi^2 = 41,84$ при $p < 0,001$, не отличалась от частоты регистрации при срочных родах (0%, $n = 20$) и при прерывании беременности (10%, $n = 10$). При срочных родах частота регистрации у беременных рецидивов КПП (0%, $n = 20$) не отличалась от таковой при срочных родах (инфицированность; 0%, $n = 28$) и при прерывании беременности (10%, $n = 10$), но была ниже, чем при преждевременных родах (92%, $n = 25$; $\chi^2 = 34,00$ при $p < 0,001$). При преждевременных родах частота регистрации у беременных рецидивов КПП УГИ (92%, $n = 25$) выше таковой при срочных родах (инфицированность) (0%, $n = 28$) – $\chi^2 = 41,84$ при $p < 0,001$, при срочных родах (0%, $n = 20$) – $\chi^2 = 34,00$ при $p < 0,001$, при прерывании беременности (10%, $n = 10$) – $\chi^2 = 18,64$ при $p < 0,001$. При прерывании беременности частота регистрации у беременных рецидивов КПП (10%, $n = 10$) ниже таковой при преждевременных родах (92%, $n = 25$) – $\chi^2 = 18,64$ при $p < 0,001$, не отличалась от таковой при срочных родах (0%, $n = 20$) и срочных родах (инфицированность; 0%, $n = 28$). Следовательно, при срочных родах (инфицированность) отсутствуют КПП, при срочных родах регистрируются нерецидивирующие КПП, при преждевременных родах – рецидивирующие КПП. Различия по частоте регистрации рецидивов КПП между выделенными группами достоверны; низкая частота регистрации рецидивирующего характера КПП при прерывании беременности объясняется краткосрочностью беременности.

О состоянии и характере моно- или полиинфицированности (см. табл. 1) свидетельствуют высев бактерий (≥ 4 lg КОЕ/мл), положительные результаты ПЦР на наличие вирусов (в клиническом материале соскобе со слизистых и/или крови) и ИФА – IgM и IgG. В 100% случаев рецидивирующий характер КПП инфекционно-воспалительных заболеваний в сочетании с инфицированием регистрировался при преждевременных родах и прерывании беременности, а при срочных родах КПП нерецидивирующего характера отмечены в 42% случаев; достоверны различия между группами срочные роды + срочные роды (инфицированность) и преждевременные роды ($\chi^2 = 21,11$; $p < 0,001$), срочные роды + срочные роды (инфицированность) и прерывание беременности ($\chi^2 = 9,25$; $p < 0,01$). У 58% из 48 беременных со срочными родами и срочными родами (инфицированность) регистрировалась только инфицированность, а у 42% пациенток инфицированность сочеталась с КПП. При этом специфические диагностические IgM также достоверно чаще выявляются при преждевременных ро-

Таблица 1

Вирусно-бактериальная инфицированность при урогенитальной инфекции беременных

Показатель	СР (инфицированность) и СР	ПР	ПРБ	Всего пациенток
Количество пациенток, абс. (%)	55 (62)	24 (27)	10 (11)	89 (100)
Частота клинических проявлений, абс. (%)	20 (42)	24 (100)	10 (100)	54 (61)
Частота рецидивов клинических проявлений, абс. (%)	0	22 (92)	1 (10)	23 (26)
Инфицирование, абс. (%)	28 (58)	24 (100)	10 (100)	32 (36)
Полиинфицирование вирусно-бактериальной этиологии, абс. (%)	55 (100)	24 (100)	10 (100)	89 (100)
Инфицированность ВЭБ, абс. (%)	48 (87)	22 (92)	9 (90)	79 (89)
Инфицированность ЦМВ, абс. (%)	50 (91)	23 (96)	10 (100)	83 (93)
Инфицированность ВПГ I и II типа, абс. (%)	44 (80)	21 (87)	9 (90)	74 (83)
Бактериологические высевы, абс. (%)	Не проводили	Не проводили	Не проводили	36 (41)
Верификация микоплазм, уреоплазм в соскобном материале, абс. (%)	18 (33)	9 (38)	7 (70)	51 (57)
Бактериальные клетки в мазках из цервикального канала, абс. (%)	55 (100)	24 (100)	10 (100)	89 (100)
IgM и IgG	10 (18)	5 (21)	7 (70)	23 (26)

Примечание. Здесь и в табл. 2: СР – срочные роды (наличие инфицированности и клинических проявлений); СР (инфицированность) – срочные роды (инфицированность); ПР – преждевременные роды (наличие инфицированности, клинических проявлений и их рецидивов); ПРБ – прерывание беременности (наличие инфицированности, клинических проявлений и их рецидивов); ВПГ – вирус простого герпеса; ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; ЦМВ – цитомегаловирус.

дах – $\chi^2 = 9,23$ при $p < 0,01$, а также при прерывании беременности по сравнению с преждевременными родами ($\chi^2 = 5,47$ при $p < 0,05$). В 100% случаев у беременных регистрируется смешанная вирусно-бактериальная инфицированность. У 36 (41%) из 89 беременных высевались возбудители бактериальной природы, у 51 (57%) верифицировались патогены (бактерии, микоплазмы, уреоплазмы и т.д.) в соскобном материале из урогенитального тракта (различия между сравниваемыми группами достоверны: $\chi^2 = 4,41$ при $p < 0,05$), в 100% случаев бактериальные клетки патогенов выявлялись в мазках из цервикального канала (см. табл. 1). Интенсивность инфицированности (два патогена и более) не определяет выраженность инфекционного процесса. При срочных родах (инфицированность) и срочных родах, преждевременных родах и прерывании беременности в 87, 92 и 90% случаях соответственно регистрируется ВЭБ; в 80, 87 и 90% случаев – ВПГ I и II типа; в 91, 96 и 100% случаев – ЦМВ. При срочных родах и срочных родах (инфицированность) у 65% беременных зарегистрирован ВПГ I типа, у 35% беременных верифицирована ассоциация ВПГ I и II типа. При преждевременных родах у 71% беременных зарегистрирован ВПГ I типа, у 29% верифицирована ассоциация ВПГ I и II типа. Различия между группами срочные роды + срочные роды (инфицированность) и преждевременные роды достоверны: в случае регистрации ВПГ I типа ($\chi^2 = 8,18$ при $p < 0,01$), а в случае регистрации ассоциации ВПГ I и II типа $\chi^2 = 6,75$ при $p < 0,01$; при прерывании беременности ассоциация ВПГ I и II типа зарегистрирована в 90% случаев.

Ассоциация ВПГ I и II типа (табл. 2) достоверно чаще регистрируется у беременных с прерыванием беременности по сравнению с беременными с преждевременными родами ($\chi^2 = 3,94$ при $p < 0,05$) и со срочными родами (инфицированность) ($\chi^2 = 5,71$ при $p < 0,05$); также ассоциация ВПГ I и II типа достоверно чаще верифицируется у беременных со срочными родами по сравнению с беременными со срочными родами (инфицированность) ($\chi^2 = 4,37$ при $p < 0,05$). При срочных родах у беременных достоверно

Роль верификации вируса простого герпеса при урогенитальной инфекции беременных ($n=89$)

Группы беременных	ВПГ I типа, абс. (%)	Ассоциация ВПГ I и II типа, абс. (%)	ВПГ I типа и ассоциация вирусов ВПГ I и II типа, абс. (%)	ВПГ не верифицирован
СР ($n=20$)	8 (40)	11 (55)	19 (95)	1 (5)
ПР ($n=23$)	14 (61)	6 (26)	20 (87)	3 (13)
ПРБ ($n=10$)	2 (20)	7 (70)	9 (90)	1 (10)
СР (инфицированность) ($n=28$)	17 (61)	6 (21)	23 (82)	5 (18)
СР + СР (инфицированность) ($n=48$)	25 (52)	17 (35)	40 (83)	7 (15)
Всего...	37 (42)	41 (47)	78 (89)	10 (11)

чаще верифицировались ВПГ I типа и ассоциация ВПГ I и II типа в сопоставлении с беременными без верификации ВПГ ($\chi^2 = 5,16$ при $p < 0,05$) и ($\chi^2 = 9,64$ при $p < 0,01$ соответственно). При срочных родах (инфицированность) у беременных достоверно чаще верифицировался ВПГ I типа в сопоставлении с аналогичными показателями беременных без верификации ВПГ ($\chi^2 = 9,06$ при $p < 0,01$), а также при верификации ассоциации ВПГ I и II типа ($\chi^2=7,38$ при $p<0,01$). При преждевременных родах достоверно чаще верифицировался ВПГ I типа в сопоставлении с аналогичными показателями беременных без верификации ВПГ ($\chi^2 = 9,33$ при $p < 0,01$), а также при верификации ассоциации ВПГ I и II типа ($\chi^2 = 4,33$ при $p < 0,05$). При прерывании беременности чаще верифицировалась ассоциация ВПГ I и II типа в сопоставлении с аналогичными показателями беременных без верификации ВПГ ($\chi^2 = 5,21$ при $p < 0,05$). При преждевременных родах и прерывании беременности достоверно чаще верифицировались ВПГ I типа и ассоциация ВПГ I и II типа в сопоставлении с аналогичными данными беременных без верификации ВПГ ($\chi^2 = 8,68$ при $p < 0,01$ и $\chi^2 = 5,07$ при $p < 0,05$ соответственно). Следовательно, при УГИ беременных превалировало инфицирование вирусными патогенами по сравнению с бактериальными. Из вирусных патогенов превалирует семейство *Herpesviridae*: в 90–100% случаев верифицируются ВЭБ, ВПГ I и II типа, ЦМВ; в 41% случаев высевались возбудители бактериальной природы, в 57% случаев верифицировались внутриклеточные микроорганизмы: микоплазмы, уреоплазмы. При преждевременных родах и прерывании беременности достоверно чаще выявлялись внутриклеточные бактериальные патогены, а при прерывании беременности чаще верифицировалась ассоциация ВПГ I и II типа по сравнению с беременными со срочными родами. Выявление КПП генитального герпеса у пациенток совпадает с выявлением у них ассоциации ВПГ I и II типа. Интересен факт частой верификации в клиническом материале со слизистой цервикального канала беременных ВПГ I типа, а также ассоциации ВПГ I и II типа.

При срочных родах (инфицированность) частота регистрации у беременных смешанного вирусно-бактериального инфицирования (68%, $n = 28$) выше частоты вирусного моноинфицирования (32%, $n = 28$) – $\chi^2 = 5,79$ при $p < 0,05$, не отличается от частоты регистрации при срочных родах (60%, $n=20$), при преждевременных родах (72%, $n = 25$) и при прерывании беременности (100%, $n = 10$). Частота вирусного моноинфицирования беременных не отличалась при срочных родах (40%, $n = 20$), срочных родах (инфицированность; 32%, $n = 28$), преждевременных родах (28%, $n = 25$) и прерывании беременности (0%, $n = 10$). При срочных родах частота регистрации у беременных вирусно-бактериального смешанного инфицирования (60%, $n = 20$) не отличается от частоты вирусного моноинфицирования (40%, $n = 20$), от частоты регистрации при срочных родах (инфицированность; 68%, $n = 28$), при преждевременных родах (72%, $n = 25$) и при прерывании беременности (100%, $n=10$). При преждевременных родах частота регистрации у беременных вирусно-бактериального смешанного

инфицирования (72%, $n = 25$) выше частоты регистрации вирусного моноинфицирования (28%, $n = 25$) – $\chi^2 = 8,00$ при $p < 0,01$, не отличается от частоты регистрации при срочных родах (инфицированность; 68%, $n=28$), при срочных родах (60%, $n=20$) и при прерывании беременности (100%, $n=10$). При прерывании беременности частота регистрации у беременных вирусно-бактериального смешанного инфицирования (100%, $n = 10$) выше частоты регистрации вирусного моноинфицирования (0%, $n = 10$) – $\chi^2 = 16,20$ при $p < 0,001$, не отличалась от таковой при срочных родах (инфицированность; 68%, $n = 28$), при срочных родах (60%, $n = 20$) и при преждевременных родах (72%, $n = 25$). Следовательно, при срочных родах (инфицированность) смешанное вирусно-бактериальное инфицирование превалировало над вирусным моноинфицированием, при срочных родах регистрировалось смешанное вирусно-бактериальное инфицирование, а при преждевременных родах и прерывании беременности смешанное вирусно-бактериальное инфицирование превалировало над вирусным моноинфицированием.

Обсуждение

При УГИ беременных регистрируется смешанная вирусно-бактериальная инфицированность с превалированием инфицирования вирусными патогенами по сравнению с бактериальными. Из вирусных патогенов превалирует семейство *Herpesviridae*: в 90–100% случаев верифицируются ВЭБ, ВПГ I и II типа, ЦМВ; в 41% случаев высевались возбудители бактериальной природы, в 57% случаев верифицировались внутриклеточные микроорганизмы – микоплазмы, уреаплазмы. При преждевременных родах и прерывании беременности достоверно чаще выявлялись внутриклеточные бактериальные патогены, а при прерывании беременности верифицировалась ассоциация вирусов ВПГ I и II типа по сравнению с показателями беременных со срочными родами. При срочных родах (инфицированность) достоверно чаще верифицировался ВПГ I типа, чем ассоциация ВПГ I и II типа; при срочных родах в одинаковом проценте случаев встречались ВПГ I типа и ассоциация ВПГ I и II типа; при преждевременных родах достоверно чаще верифицировался ВПГ I типа, чем ассоциация ВПГ I и II типа, и реже, чем сочетание ВПГ I типа и ассоциации ВПГ I и II типа при прерывании беременности; при прерывании беременности достоверно чаще выявлялась ассоциация ВПГ I и II типа, чем ВПГ I типа. Ранее нами установлено, что повышение уровней экспрессии генов TLRs зависит от типов ВПГ и их сочетания: ВПГ I типа меньше, чем ассоциация ВПГ I и II типа, и меньше, чем сочетание ВПГ I типа и ассоциации ВПГ I и II типа [11]. КПП генитального герпеса сочетаются с одновременной верификацией ассоциации ВПГ I и II типа. ВПГ (их наличие или отсутствие) у беременных с УГИ служат маркерами течения инфекционного процесса. Интересен факт частой верификации в клиническом материале со слизистой цервикального канала беременных ВПГ I типа, а также ассоциации ВПГ I и II типа.

Заключение

Микробные патогены определяют характер развития беременности, а наличие или отсутствие ВПГ I и II типа у беременных с УГИ служат маркерами течения инфекционного процесса и могут рассматриваться как триггеры его утяжеления, определяющие прогноз и исход развития УГИ у беременных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 9, 10 см. REFERENCES)

1. Прозоровский С.В., Раковская И.В., Вульфвич Ю.В. *Медицинская микоплазмология*. М.: Медицина; 1995.
2. Ткачева И.И., Тареева Т.Г., Федотова А.В., Шугинин И.О., Микаелян А.В., Никольская И.Л. и др. Рациональные методы профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний матери, плода и новорожденного при акушерской и экстрагенитальной патологии. *Вестник Российской ассоциации акушеров-гинекологов*. 1999; (3): 80-4.
3. Караулов А.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В. и

- др. Роль реактивности организма и мукозального иммунитета в модулировании патогенности и вирулентности условно-патогенной микрофлоры в динамике инфекционного процесса, а также в поддержании генофондов макро- и микроорганизмов. *Инфекционные болезни*. 2017; 15(2): 41-8. Doi: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2017-2-41-48>
5. Джобава Э.М., Степанян А.В., Артизанова Д.П., Бояр Е.А., Хейдар Л.Х., Доброхотова Ю.Э. Особенности течения беременности в группах риска. современные подходы к терапии вагинальных дисбиозов. *Гинекология*. 2008; (6): 36-9.
 6. Савченко Т.Н., Доброхотова Ю.Э., Алёшкин В.А., Макаров О.В., Агаева М.И., Афанасьев С.С. и др. Особенности нарушений микробиоценоза влагалища во время беременности у женщин с герпесвирусной инфекцией. *Лечащий врач*. 2016; (12): 8.
 7. Макарова О.В., Алешкина В.А., Савченко Т.Н., ред. *Инфекции в акушерстве и гинекологии*. М.: МЕДпресс-информ; 2009.
 8. Минкина Г.Н., Манухин И.Б., Франк Г.А. *Предрак шейки матки*. М.: Аэрограф-медиа; 2001.
 11. Караулов А.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Бондаренко Н.Л., Агаева М., Воропаева Е.А. и др. Роль TLR в патогенезе и диагностике урогенитальных инфекций женщин. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2017; 16(4): 32-8. Doi: <https://doi.org/10.20953/1726-1678-2017-4-35-41>

REFERENCES

1. Hodak L.A. Pharmacological treatment of herpesvirus infections. *International medical journal*. 1997; (4): 57-9.
2. Prozorovskiy S.V., Rakovskaya I.V., Vul'fovich Yu.V. *Medical Mycoplasmatology [Meditsinskaya mikoplazmologiya]*. Moscow: Meditsina; 1995. (in Russian)
3. Tkacheva I.I., Tareeva T.G., Fedotova A.V., Shuginin I.O., Mikaelyan A.V., Nikol'skaya I.L., et al. Rational methods of prevention and treatment of infectious-inflammatory diseases of mother, fetus, and newborn in obstetric and extragenital pathology. *Vestnik Rossiyskoy assotsiatsii akusherov-ginekologov*. 1999; (3): 80-4. (in Russian)
4. Karaulov A.V., Afanas'ev S.S., Aleshkin V.A., Voropaeva E.A., Afanas'ev M.S., Nesvizhskiy Yu.V., et al. Role of organism reactivity and mucosal immunity in modulating of pathogenicity and virulence of opportunistic microflora in dynamics of infectious process and also in macro- and microorganisms gene pools maintenance. *Infektsionnye bolezni*. 2017; 15(2): 41-8. Doi: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2017-2-41-48> (in Russian)
5. Dzhobava E.M., Stepanyan A.V., Artizanova D.P., Boyar E.A., Kheydar L.Kh., Dobrokhotova Yu.E. Peculiarities of pregnancy in high-risk groups. Modern approaches to the treatment of vaginal dysbiosis. *Ginekologiya*. 2008; (6): 36-9. (in Russian)
6. Savchenko T.N., Dobrokhotova Yu.E., Aleshkin V.A., Makarov O.V., Agaeva M.I., Afanas'ev S.S., et al. Features of microbiocenosis of the vagina during pregnancy in asymptomatic and latent herpes viral infection. *Lechashchiy vrach*. 2016; (12): 8. (in Russian)
7. Makarova O.V., Aleshkina V.A., Savchenko T.N., eds. *Infections in Obstetrics and Gynecology [Infektsii v akusherstve i ginekologii]*. Moscow: MEDpress-inform; 2009. (in Russian)
8. Minkina G.N., Manukhin I.B., Frank G.A. *Precancer of the Cervix [Predrak sheyki matki]*. Moscow: Aero-graf-media; 2001. (in Russian)
9. Georgijevic A., Cjukic-Ivancevic S., Bujko M. Bacterial vaginosis. Epidemiology and risk factors. *Srp. Arh. Celok. Lek*. 2000; 128(1-2): 29-33. (in Serbian)
10. Nam K.H., Kim Y.T., Kim S.R., Kim S.W., Kim J.W., Lee M.K., et al. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *J. Gynecol. Oncol*. 2009; 20(1): 39-43. Doi: <https://10.3802/jgo.2009.20.1.39>
11. Karaulov A.V., Afanas'ev S.S., Aleshkin V.A., Bondarenko N.L., Agaeva M., Voropaeva E.A., et al. TLR role in pathogenesis and diagnosis of urogenital infections in women. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii*. 2017; 16(4): 32-8. Doi: <https://doi.org/10.20953/1726-1678-2017-4-35-41> (in Russian)

Поступила 04.06.19

Принята в печать 24.09.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Кост В.Ю., Сухова О.А., Аكوпова И.И., Горбачёва Е.О., Лисовская К.В.,
Ртищев А.А., Маркушин С.Г.

ВКЛЮЧЕНИЕ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В PB1-ГЕН ВИРУЛЕНТНОГО ШТАММА A/WSN/33 (H1N1) ВИРУСА ГРИППА А МЕНЯЕТ ЕГО ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 115088, г. Москва, Россия

Цель – изучение изменений фенотипических характеристик вирулентного штамма A/WSN/33 вируса гриппа А под влиянием включения сайт-специфических мутаций в его PB1-гене.

Материалы и методы. С помощью двухступенчатой полимеразной цепной реакции в PB1-гене штамма A/WSN/33(H1N1) были включены ts-мутации, взятые из генома холодоадаптированных (ХА) штаммов – доноров аттенуации А/Энн Арбор/6/60 (H2N2), А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и А/Краснодар/101/35/59 (H2N2). Исследовали ts- и att-фенотип полученных сайт-специфических мутантов, иммуногенность, а также снижение массы тела у инфицированных мышей.

Результаты. Показано, что включение ts-мутаций из генома ХА штаммов – доноров аттенуации в PB1-ген вирулентного штамма A/WSN/33 (H1N1) приводит к различным изменениям его фенотипических характеристик.

Обсуждение. Анализ генома ХА штаммов – доноров аттенуации вируса гриппа указывает на исключительно важное значение функциональных дефектов в PB1-белке для формирования аттенуационного фенотипа вируса.

Заключение. Технологию сайт-специфического мутагенеза можно использовать для модификации PB1-гена вирулентного штамма вируса гриппа А с целью конструирования живых гриппозных вакцин нового поколения.

Ключевые слова: вирус гриппа А; аттенуация; холодоадаптированные штаммы – доноры аттенуации; сайт-специфический мутагенез; ts-фенотип; att-фенотип; иммуногенность.

Для цитирования: Кост В.Ю., Сухова О.А., Аكوпова И.И., Горбачёва Е.О., Лисовская К.В., Ртищев А.А., Маркушин С.Г. Включение сайт-специфических мутаций в PB1-ген вирулентного штамма A/WSN/33 (H1N1) вируса гриппа А меняет его фенотипические характеристики. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6): 21-29. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-21-29>

Kost V.Yu., Sukhova O.A., Akopova I.I., Gorbacheva E.O., Lisovskaya K.V.,
Rtishchev A.A., Markushin S.G.

INCLUSION OF SITE-SPECIFIC MUTATIONS IN THE PB1-GENE OF A VIRULENT A/WSN/33 (H1N1) STRAIN OF INFLUENZA A VIRUS CHANGES ITS PHENOTYPIC CHARACTERISTICS

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 115088, Russia

Aim. Study of changes in the phenotypic characteristics of the virulent A/WSN/33 (H1N1) strain of influenza A virus under the influence of the inclusion of site-specific mutations in the PB1-gene of this strain.

Materials and methods. Using a two-step polymerase reaction in the PB1 gene of A/WSN/33 (H1N1) strain were included ts mutations taken from the genome of attenuated CA donors-strains: A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/Leningrad 134/17/57 (H2N2) and A/Krasnodar/101/35/59. Ts-phenotype, att-phenotype, immunogenicity, as well as weight loss in mice infected with these mutants were studied in the obtained site-specific mutants.

Results. It was shown that the inclusion of ts mutations from the genome of CA donors-strains of attenuation in the PB1 gene of the virulent A/WSN/33 (H1N1) strain leads to a change in the phenotypic characteristics of this strain to different degrees.

Для корреспонденции: Маркушин Станислав Георгиевич, д-р мед. наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 115088, г. Москва. E-mail: s.g.markushin@rambler.ru

Discussion. Analysis of the genome of CA strains- donors of attenuation of influenza virus indicates the crucial importance of the presence of functional defects in the PB1-protein for the formation of the attenuation phenotype of the virus.

Conclusion. The technology of site-specific mutagenesis can be successfully used to modify the PB1 gene of a virulent influenza A virus strain in order to construct a new generation of live influenza vaccines.

Keywords: *influenza virus; cold-adapted (CA) strains-donors of attenuation; site-specific mutagenesis; ts- phenotype; att-phenotype; immunogenicity.*

For citation: Kost V.Yu., Sukhova O.A., Akopova I.I., Gorbacheva E.O., Lisovskaya K.V., Rtishchev A.A., Markushin S.G. Inclusion of site-specific mutations in the PB1-gene of a virulent A/WSN/33 (H1N1) strain of influenza A virus changes its phenotypic characteristics. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6): 21-29. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-21-29>

For correspondence: Stanislav G. Markushin, Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher, the Head of Laboratory of RNA-viruses genetics. I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 115088, Russia. E-mail: s.g.markushin@rambler.ru

Information about authors:

Kost V.Y., <https://orcid.org/0000-0003-1703-2685>

Sukhova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5299-003X>

Akopova I.I., <https://orcid.org/0000-0003-1795-4356>

Gorbacheva E.O., <https://orcid.org/0000-0002-4347-1684>

Lisovskaya K.V., <https://orcid.org/0000-0002-5119-877X>

Rtishchev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

Markushin S.G., <https://orcid.org/0000-0003-0994-5337>

Acknowledgments. This study was financially supported by I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 11 July 2019

Accepted 24 September 2019

Введение

Использование генно-инженерных подходов при получении гриппозных живых вакцин значительно расширяет возможности их конструирования. В последнее время значительный интерес среди исследователей вызывает генно-инженерный подход, предполагающий прямое включение заранее изученных и охарактеризованных мутаций, взятых из геномов холодаадаптированных (ХА) штаммов – доноров аттенуации, в геном вирулентного штамма вируса гриппа с целью его трансформации в аттенуированный вакцинный вариант. Эта стратегия теоретически должна обеспечить лучшую иммунную защиту по сравнению с используемыми в настоящее время реассортантными живыми гриппозными вакцинами на базе стандартных ХА доноров аттенуации.

Цель данной работы – изучение изменений фенотипа вирулентного штамма А/WSN/33 вируса гриппа под влиянием включения в его геном отдельных ts-мутаций, локализованных в PB1-гене ХА штаммов – доноров аттенуации.

Данные литературы в последнее время свидетельствуют о том, что использование технологии сайт-специфических мутаций может значительно продвинуть разработку живых гриппозных вакцин как в медицине, так и в ветеринарии. Вместе с тем прогресс в этой области обозначил наличие серьёзных нерешённых проблем. Согласно данным литературы, основным источником сайт-специфических ts-мутаций является ХА штамм А/Энн Арбор/6/60, полученный д-ром Х. Маассабом более полувека назад [1]. Три мутации из PB1-гена данного штамма (K391E, E581G, A661T), одна мутация из PB2-гена (N265S) и одна из NP-гена (D34G) составляют стандартный набор для модификации генома подавляющего количества вирулентных штаммов вируса гриппа человека, животных и птиц [2–5]. Однако использование этого набора мутаций не позволяет полностью аттенуировать не только пандемический штамм, но и некоторые вирулентные сезонные варианты вируса гриппа человека [2, 3]. Для полной аттенуа-

ции пандемического штамма NY-1681 (H1N1) потребовалось включение 7 ts-мутаций в PB1- и PB2-гены, включая ts-мутации из генома штамма А/Энн Арбор/6/60 [6].

По данным литературы, включение сайт-специфических мутаций даже в геном серологически близкородственного вируса не всегда бывает удачным. В этой связи для получения новых вакцинных гриппозных штаммов целесообразно увеличить арсенал аттенуирующих мутаций и провести сравнительное исследование ts-мутаций, взятых из генома других ХА штаммов вируса гриппа человека. В России в течение многих лет в качестве донора аттенуации для живых гриппозных вакцин используется ХА штамм А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [7–9]. Генетические детерминанты, ответственные за аттенуацию этого штамма, главным образом сосредоточены в PB1-гене (K265N, V591I) и PB2-гене (V478L). В другом недавно полученном ХА штамме А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) ts-мутация, ответственная за ts-фенотип, локализована в PB1-гене (I147T) [10]. Потенциал данных ts-мутаций, а также ts-мутаций в PA- и NP-генах этих штаммов в плане влияния на модификацию фенотипических характеристик вирулентных штаммов вируса гриппа изучен достаточно поверхностно. Исследования в этом направлении дали бы возможность сравнить эффективность описанных выше мутаций, а также расширить арсенал сайт-специфических мутаций, что весьма полезно для дальнейшего конструирования живых гриппозных вакцин. Основной мишенью для включения сайт-специфических мутаций остаются гены, кодирующие белки полимеразного комплекса, состоящего из трёх субъединиц: PB1, PB2 и PA. В данной работе мы попытались провести сравнительное исследование аттенуационного потенциала отдельных ts-мутаций, локализованных в PB1-гене отечественных ХА штаммов-доноров А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и канонического штамма А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) при включении в их геном гетерологичного вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1).

Материалы и методы

Вирусы. В работе был использован генно-инженерный штамм А/WSN/33, полученный методом обратной генетики с помощью набора плазмид рНW2000 [11], содержащих отдельные гены данного вируса.

Куриные эмбрионы (КЭ). Все использованные в работе сайт-специфические мутанты поддерживали путём пассажей в 10–11-дневных КЭ. Активность репродукции вирусов гриппа оценивали по результатам титрования в КЭ, инкубированных при 34, 37, 38 и 39 °С, и выражали в RCT (reproductive capacity at different temperatures). $RCT_{39} = (\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл при } 34^\circ\text{C} - \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл при } 39^\circ\text{C})$. Вирусы считали температурочувствительными (ts-фенотип), если $RCT_{39} > 5,0 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$.

Культуры клеток. В опытах по трансфекции использовали клетки НЕК293Т и линию клеток MDCK, полученных из Института Пастера (Франция). Все клетки выращивали при 37 °С в CO₂-инкубаторе.

Мутагенез. Для генно-инженерных работ с вирусом гриппа штамма А/WSN/33 (H1N1) использовали 8-плазмидную трансфекционную систему на основе вектора рНW2000. Каждая из 8 плазмид содержала соответствующий ген вируса гриппа, фланкированный необходимыми регулируемыми элементами для сборки вируса на клеточной культуре при трансфекции [11].

Мутагенез PB1-гена проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) за 2 раунда. Для ПЦР использовали стандартный протокол по набору реактивов Tersus PCR Kit (кат. номер PK021). Для контроля длины ПЦР продукта проводили аналитический фореуз в 1,5% агарозном геле с добавлением буфера ТАЕ. Клонирование проводили с помощью так называемой Golden Gate реакции [12]: совмещение рестрикции-лигирования вставки с вектором в одной реакции. Для этого была получена линейная форма вектора рНW2000 с помощью ПЦР с праймеров, на 5'-концах которых находились сайты рестрикции BsmBI. Реакцию Golden Gate ставили в 10 мкл. Использовали рестриктазу Esp3I (BsmBI) (Fermentas/ThermoScientific), которую добавляли до 0,25 ед./мкл, 10× Fermentas Tango Buffer, T4 ДНК лигаза (Сибэнзим, Россия) до 5 ед./

мкл, дитиотреитол до 1 mM, АТФ до 1 mM и линейный вектор со вставкой по 50 нг (молярное соотношение вектор/вставка = 1/3). Реакцию проводили в амплификаторе с программой: 15 циклов каждый по 5 мин при 37 °C и 5 мин при 17 °C.

Трансформацию проводили на рубидиевых компетентных бактериальных клетках (комп. $10^{7.0}$) штамма DH5a. После разморозки во льду к клеткам добавляли ½ часть лигазной смеси. Далее суспензию клеток инкубировали 1 ч во льду, проводили «хит шок» (2 мин при 42 °C на водяной бане), инкубировали во льду 2 мин, добавляли среду LB без антибиотика и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Клетки высевали на чашки Петри с 1,5% агаром и средой LB с ампициллином (200 мкг/мл), инкубировали 16 ч при 37 °C. Скрининг удачных клонов, в которых плазида содержала вставку нужной длины, проводили при помощи ПЦР с последующим электрофоретическим анализом. Контроль нуклеотидной последовательности осуществляли с помощью секвенирования.

Для выделения плазмиды из бактериальных клеток использовали Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit (кат. номер K0503). Концентрацию и чистоту (отношение 260/280 $\geq 1,8$) измеряли на «NanoDrop 2000».

Рекомбинантная ДНК и обратнo-генетические методы. В экспериментах использовали плазмиду pHW2000 [11], разработанную для получения вируса гриппа методом обратной генетики. Плазида pHW2000, а также плазмиды со вставками генов штамма вируса гриппа A/WSN/33 были любезно предоставлены д-ром Р. Вебстером (Мемфис, США). Для накопления плазмид использовали штамм *E. coli* DH5alpha.

Накопление и концентрирование вирусов. Вирусы накапливали в КЭ по стандартной методике. Для последующего выделения РНК вирусы концентрировали центрифугированием.

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

Полимеразная цепная реакция в обратной транскрипции. Обратную транскрипцию ставили отдельно от ПЦР при помощи ревертазы М-MuLV (НПО «СибЭнзим», Новосибирск) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР ставили с высокоточной полимеразой Tersus (ЗАО «Евроген», Москва) в соответствии с рекомендациями производителя. Очистку полученных ПЦР-продуктов из легкоплавкой агарозы осуществляли при помощи набора (Thermo Fisher Scientific, США).

Клонирование в E. coli. Опыты по клонированию (работа с бактериями, рестрикция, лигирование и т.п.) проводили по стандартным методикам или в соответствии с рекомендациями производителя для соответствующих ферментов (T4 ДНК лигаза, рестриктазы Esp3I и Eco31I).

Секвенирование вставок в полученных плазидах проводило ЗАО «Евроген» на автоматическом секвенаторе «MegaBACE-500».

Трансфекцию проводили при помощи реагента Lipofectamine LTX (Invitrogen, США) либо в кокультуре клеток 293Т и MDCK, либо в однодневном монослое клеток 293Т (плотность клеточного монослоя около 70%) в соответствии с методическим протоколом, прилагаемым к реагенту Lipofectamine LTX.

Репродукция вирусов в лёгких мышей. Изучали att-фенотип по следующей методике: группы самок беспородных мышей (по 5 голов на группу) инфицировали интраназально под лёгким эфирным наркозом анализируемыми вирусами в инфекционном титре $10^{5.0}$ ЭИД₅₀ (в дозе 50 мкл на мышью). Через 72 ч мышью усыпляли и извлекали лёгочную ткань. Из лёгочной ткани готовили 10% суспензию в ступках с тёртым стеклом. Инфекционный титр вируса в 10% суспензии лёгких определяли в КЭ и выражали в Ig ЭИД₅₀/0,2 мл. Все реассортанты были исследованы в трёх независимых опытах.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программы Excel. Измерения проводили в трёх пробах, подсчитывали среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD). Данные представляли как $M \pm SD$. Достоверность различий оценивали с помощью t -критерия Стьюдента.

Результаты

Сравнительное изучение *ts*-фенотипа вариантов штамма А/WSN/33 вируса гриппа, имеющих сайт-специфические мутации в гене *PB1*. *Ts*-маркёр является важнейшим маркёром аттенуации для штаммов – кандидатов в живые гриппозные вакцины. Поэтому на первом этапе был исследован данный генетический признак у полученных сайт-специфических мутантов. Как видно из данных **табл. 1**, включение мутаций из *PB1*-гена ХА штаммов – доноров аттенуации в геном вирулентного штамма А/WSN/33 приводило к снижению или к резкому снижению размножения при повышенной температуре (38–39 °С). Следует отметить, что выраженность *ts*-фенотипа сайт-специфических мутантов варьировала в широком диапазоне в зависимости от включения *ts*-мутаций из *PB1*-гена того или иного ХА штамма – донора аттенуации и количества включённых мутаций. Так, включение единичных *ts*-мутаций К391Е, Е581G, Е457D или А661Т из *PB1*-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) в геном исходного вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) приводило к незначительному изменению *ts*-фенотипа вируса. С другой стороны, включение большего количества *ts*-мутаций из *PB1*-гена ХА штаммов А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) вызывало резкое снижение способности вируса реплицироваться при температуре 39 °С. Включение единичных *ts*-мутаций из генома ХА штамма А/Ленинград/134/17/57 в геном штамма А/WSN/33 также вызывало недостаточно глубокое изменение *ts*-фенотипа вирулентного штамма. Однако совместное включение двух мутаций из *PB1*-гена А/Ленинград/134/17/57 в геном штамма А/WSN/33 приводило к резкому падению размножения вирулентного штамма в КЭ при 38–39 °С. Интересно отметить, что единичная *ts*-мутация из *PB1*-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) при включении в геном штамма А/WSN/33 (H1N1) способствовала резкой утрате способности к размножению вируса-реципиента в КЭ при непермиссивных условиях. Следует отметить, что субъединица *PB1* содержит каталитический центр полимеразного комплекса, что делает структуру данного белка более ригидной. Это обстоятельство затрудняет включение *ts*-мутаций из генома разных ХА штаммов – доноров аттенуации. Многократные попытки включить в *PB1*-ген штамма А/WSN/33 (H1N1) *ts*-мутации из разных ХА штаммов – доноров аттенуации были безуспешными.

Изучение вирулентности полученных сайт-специфических мутантов для мышей. Анализ вирулентности исследованных трансфектантов для мышей свидетельствует о

Таблица 1

Изучение *ts*-фенотипа трансфектантов на базе штамма А/WSN/33, содержащих сайт-специфические мутации в *PB1*-гене

Исходный вирус и трансфектант	Титр вируса в куриных эмбрионах при разной температуре инкубации (lg ЭИД ₅₀ /0,2 мл)			
	34 °С	37 °С	38 °С	39 °С
А/WSN/33	6,5 ± 0,5	6,5 ± 0,5	6,25 ± 0,4	6,25 ± 0,4
№ 1 А/Энн Арбор/6/60* (К391Е, Е581G, Е457D**)	6,5 ± 0,32	4,5 ± 0,74	2,5 ± 0,5	2,0 ± 0,2
№ 2 А/Ленинград/134/17/57 (К265N, V591I)	6,5 ± 0,4	5,0 ± 0,25	2,5 ± 0,2	< 1,0
№ 3 А/Краснодар/101/35/59 (I147T)	6,5 ± 0,5	4,0 ± 0,7	2,0 ± 0,5	< 1,0
№ 4 А/Энн Арбор/6/60 (Е581G)	6,75 ± 0,25	6,5 ± 0,25	5,5 ± 0,75	4,5 ± 0,5
№ 5 А/Энн Арбор/6/60 (К391Е)	6,5 ± 1,0	6,5 ± 0,5	5,0 ± 0,56	4,0 ± 0,4
№ 6 А/Энн Арбор/6/60 (Е457D)	7,0 ± 0,2	7,0 ± 1,0	5,5 ± 0,32	4,5 ± 1,0
№ 7 А/Ленинград/134/17/57 (К265N)	7,0 ± 0,5	7,0 ± 0,25	5,0 ± 0,4	3,5 ± 0,4
№ 8 А/Ленинград/134/17/57 (V591I)	7,0 ± 1,0	6,5 ± 0,25	6,0 ± 0,5	5,5 ± 0,75
№ 9 А/Энн Арбор/6/60 (А661Т)	7,0 ± 1,0	7,0 ± 0,75	6,5 ± 0,56	5,5 ± 1,0

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: * – название ХА штамма, из генома которого были использованы мутации; ** – в скобках указано количество мутаций и их локализация в *PB1*-белке трансфектанта.

том, что включение ts-мутаций из PB1-гена ХА штаммов в геном вирулентного штамма А/WSN/33 приводит к снижению вирулентности данного штамма. В частности, как видно из данных **табл. 2**, включение двух ts-мутаций из PB1-гена ХА штаммов А/Ленинград/134/17/57 (K265N, V591I) или одной ts-мутации из PB1-гена (I147T) штамма А/Краснодар/101/35/59 в геном штамма А/WSN/33 значительно подавляло размножение этого штамма в лёгких мышей. С другой стороны, в лёгких мышей, инфицированных трансфектантами № 4 или 5, унаследовавшими единичные мутации из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60, наблюдалось сниженное, но заметное размножение вируса. Как видно из наших данных, включение единичных ts-мутаций из PB1-гена ХА штаммов в геном вирулентного штамма А/WSN/33, как правило, незначительно снижает его вирулентность. Исключением является ts-мутация I147T из PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59. Включение этой мутации в геном вирулентного штамма А/WSN/33 значительно подавляло размножение вируса в лёгких мышей. Интересно отметить, что при заражении мышей реассортантом между ХА штаммом А/Краснодар/101/36/59 и штаммом А/WSN/33, который содержал мутантный PB1-ген от штамма А/Краснодар/101/35/59, наблюдалось более заметное подавление размножения вирулентного вируса в лёгких, при одинаковой дозе интраназального заражения (**см. табл. 2**). Данное явление можно рассматривать как влияние фенотипического окружения на проявление эффекта мутации.

Изучение иммуногенности сайт-специфических мутантов. Проведён сравнительный анализ способности отдельных сайт-специфических мутантов индуцировать гуморальный иммунитет у мышей в ответ на интраназальное заражение. В качестве объектов изучения были выбраны трансфектант № 1, имеющий в геноме 3 мутации из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60, трансфектант № 2, унаследовавший 2 мутации из PB1-гена ХА штамма А/Ленинград/134/17/57, и трансфектант № 3 с единичной мутацией в геноме из PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59. Исследование гуморального ответа было проведено с целью оценить иммуногенность вирусов, реплицирующихся в пределах верхнего респираторного тракта мышей. Как видно из **табл. 3**, наивысший титр гуморальных антител (1 : 1280) был обнаружен у мышей, иммунизированных трансфектантом № 1, содержащим в геноме мутации из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60. Этот факт можно было объяснить размножением остаточного вируса в лёгких мышей. Трансфектанты № 2 и 3, содержащие в геноме ts-мутации из PB1-гена ХА штаммов А/Ленинград/134/17/57 и А/Краснодар/101/35/59, при интраназальной иммунизации мышей индуцировали умеренный уровень гуморального иммунного ответа (1 : 320, 1 :

Таблица 2

Изучение att-фенотипа трансфектантов на базе штамма А/WSN/33, содержащих сайт-специфические мутации в PB1-гене

Исходный вирус и трансфектанты	Титр вируса в лёгких мышей (lg ЭИД ₅₀ /1,0 г лёгочной ткани)
А/WSN/33	5,3 ± 0,4
№ 1 А/Энн Арбор/6/60* (K391E, E581G, E457D**)	2,5 ± 0,4
№ 2 А/Ленинград/134/17/57 (K265N, V591I)	2,5
№ 3 А/Краснодар/101/35/59 (I147T)	< 1,0
№ 4 А/Энн Арбор/6/60 (E581G)	3,5 ± 0,4
№ 5 А/Энн Арбор/6/60 (K391)	4,5 ± 0,4
№ 7 А/Ленинград/134/17/57 (K265N)	2,5 ± 0,5
№ 8 А/Ленинград/134/17/57 (V591I)	4,0 ± 1,0
Реассортант А/Краснодар/101/35/59 х А/WSN/33, имеющий мутантный PB1-ген от штамма А/Краснодар/101/35/59	1,3 ± 0,3

160). Важно отметить, что в сыворотке крови иммунизированных мышей наблюдались антитела, способные реагировать с дрейфовыми вариантами.

Изучение весовых характеристик мышей, инфицированных интраназально вариантами штамма А/WSN/33 вируса гриппа, содержащими сайт-специфические мутации в гене PB1. Как показано на **рисунке**, у мышей, инфицированных интраназально вариантами штамма А/WSN/33, содержащими в гене PB1 сайт-специфические мутации, унаследованные от различных ХА штаммов – доноров аттенуации, наблюдались различные темпы снижения массы тела. У мышей, инфицированных исходным вирулентным штаммом А/WSN/33, отмечено быстрое и значительное снижение массы тела (20–25%) к 6-му или 7-му дню с момента заражения. Масса тела мышей, инфицированных трансфектантом, имевшем в PB1-гене 3 мутации из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 (K391E, E581G, E457D), не снижалась столь значительно. Наблюдалось снижение массы тела в пределах 10–12%. Этот факт свидетельствует о том, что наличие трёх мутаций из пяти, формирующих ts-фенотип ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 в геноме вирулентного штамма А/WSN/33, значительно снижает его вирулентный потенциал. Трансфектанты, имеющие в PB1-гене единичные мутации из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60, по динамике снижения массы тела занимали среднее положение между трансфектантом с тремя мутациями из ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 и исходным вирулентным штаммом А/WSN/33. Интересно отметить, что у мышей, инфицированных трансфектантом, имеющим в PB1-гене только одну мутацию Pе147Thг из PB1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), отмечено наименьшее снижение массы тела на протяжении всего срока наблюдения: не более 3–5% на 7–8-е сутки. Минимальное снижение массы тела наблюдалось и у мышей, инфицированных трансфектантом, содержащем в геноме две ts-мутации из PB1-гена ХА штамма А/Ленинград/134/17/59 (K265N, V591I). Как видно из наших данных, интенсивность уменьшения массы тела у животных не коррелировала с количеством мутаций, включённых в геном вирулентного штамма.

Обсуждение

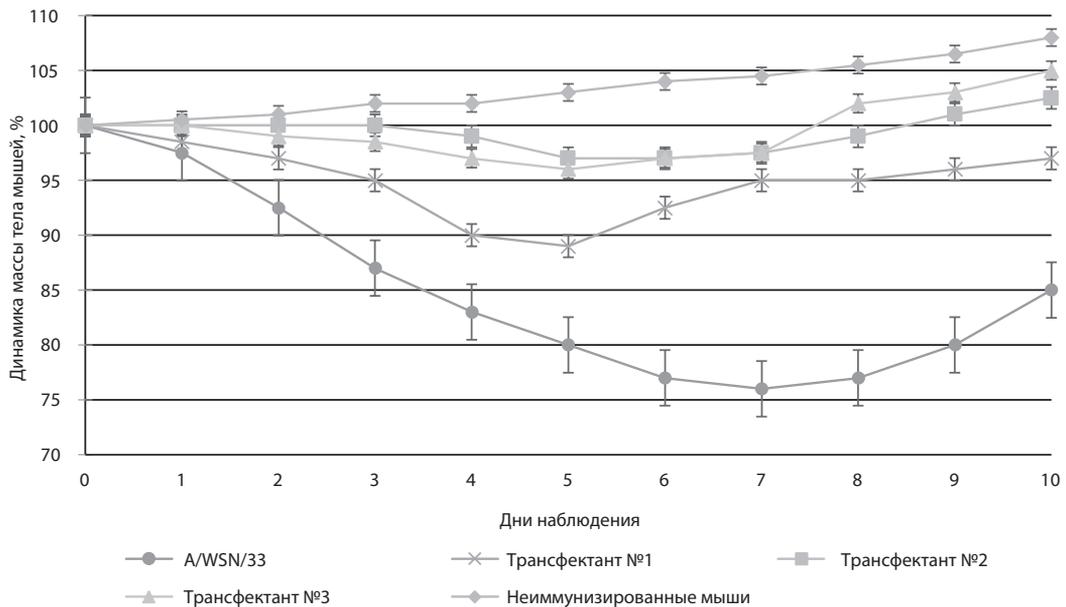
Согласно данным литературы, PB1-белок функционирует в качестве полимеразной каталитической субъединицы, вовлечённой в элонгацию вирусспецифической РНК [13]. Он включает консервативные мотивы и субдомены («пальцы» и «ладонь»), характерные для РНК-зависимых РНК-полимераз, ассоциированных с промоторными последовательностями вирионной и комплементарной РНК. Первые 15 аминокислотных остатков PB1-белка связаны с С-концевым доменом PA-белка. Внешняя поверхность субдоменов («пальцы» и «ладонь») PB1-белка тесно примыкает к линкерной последовательности PA-белка (аминокислотные последовательности 197–257), формируя многочисленные гидрофобные и полярные взаимодействия [14]. Специфическая область PB1-белка взаимодействует с N-концевым доменом PB2-белка. Каталитический центр PB1-белка содержит три консервативных аминокислотных остатка (Asp 305, Asp 444,

Таблица 3

Изучение иммуногенности трансфектантов на базе штамма А/WSN/33, содержащих сайт-специфические мутации в PB1-гене

Трансфектанты	Титр сывороточных антител в РЗГА*** при взаимодействии вирусов с антисыворотками		
	антигены		
	А/WSN/33	А/Брисбен/07	А/Калифорния/09
№ 1 А/Энн Арбор/6/60* (K381E, E581G, E457D**)	1 : 1280	1 : 40	< 1 : 10
№ 2 А/Ленинград/134/ 17/57 (K265N, V591I)	1 : 320	1 : 40	< 1 : 10
№ 3 А/Краснодар/101/35/59(I147T)	1 : 160	1 : 40	< 1 : 10

Примечание. *** РЗГА – реакция задержки геммагглютинирующей активности.



Динамика снижения массы тела мышей, инфицированных штаммом A/WSN/33 и трансфектантами № 1, 2, 3 на базе этого штамма, содержащими мутации в PB1-гене.

Группы самок беспородных мышей (по 5 голов в каждой) инфицировали интраназально под лёгким эфирным наркозом анализируемыми вирусами в инфекционном титре $10^{5.0}$ ЭИД₅₀ (в объёме 50 мкл на мыш). Массу тела мышей измеряли ежедневно и рассчитывали в процентах от массы тела каждого животного в день заражения (0-й день). По оси абсцисс – дни наблюдения; по оси ординат – снижение массы тела мышей в процентах от массы тела каждого животного в день заражения (0-й день).

Asp 445), связанных с двумя ионами двухвалентных металлов, важных для синтеза вирусспецифической РНК [15].

Анализ генома ХА штаммов – доноров аттенуации вируса гриппа свидетельствует о постоянном наличии ts-мутаций в различных доменах PB1-гена в этих штаммах, что указывает на исключительно важное значение функциональных дефектов в PB1-белке для формирования аттенуационного фенотипа вируса [4, 7, 10, 16]. В этой связи изучение возможности включения ts-мутаций из генома различных ХА штаммов в PB1-ген вирулентного штамма с целью его аттенуации представляет теоретический и практический интерес. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что включение ts-мутаций, локализованных в PB1-гене ХА штаммов-доноров А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), в геном вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) приводит к изменению его ts- и att-фенотипа, при этом практически не влияя на снижение массы тела иммунизированных мышей, превращает его в аттенуированный вариант. При проведении сайт-специфического мутагенеза мы не наблюдали влияния нового фенотипического окружения на эффективность фенотипического проявления включенных мутаций. Мы объясняем это принадлежностью как ХА штаммов-доноров, так и штамма-реципиента к вирусам гриппа человека, обладающим сходным температурным оптимумом активности вирусной РНК-полимеразы. В связи с этим PB1-субъединица, как часть полимеразного комплекса, выполняющая в инфицированных клетках каталитическую функцию, характеризуется повышенной ригидностью, что создаёт определённые трудности для одновременного включения ts-мутаций из генома различных ХА штаммов-доноров. Наши многократные попытки включить одновременно в PB1-ген ts-мутации из генома различных ХА штаммов-доноров не приводили к успеху. С другой стороны, в PB2-ген штамма А/WSN/33, облада-

дающий большей пластичностью, были одновременно успешно включены ts-мутации трёх ХА штаммов – доноров аттенуации.

Заключение

Технология сайт-специфического мутагенеза может быть успешно использована для модификации PB1-гена вирулентных штаммов вируса гриппа А с целью получения живых гриппозных вакцин нового поколения.

Финансирование. Исследования были проведены при финансовой поддержке ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-6, 9, 11-16 см. REFERENCES)

7. Алексадрова Г.И., Климов А.И. *Живая вакцина против гриппа*. СПб.: Наука; 1994.
8. Рекстин А.Р., Дешева Ю.А., Лу Х., Алексадрова Г.И., Климов А.И., Кац Д.М. и др. Гетеросубтипический иммунный ответ и защита от высокопатогенного вируса гриппа А (H5N1) у мышей, иммунизированных холодоадаптированным вирусом гриппа А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). *Медицинская иммунология*. 2005; 7(5-6): 503-10.
10. Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Цфасман Т.М., Акопова И.И., Ахматова Н.К., Коптяева И.Б. Новые холодоадаптированные штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(1): 11-7.

REFERENCES

1. Maassab H. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees. *C. Nature*. 1967; 213(5076): 612-4. Doi: <https://doi.org/10.1038/213612a0>
2. Jin H., Zhou H., Lu B., Kemble G. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/PuertoRico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J. Virol*. 2004; 78(2): 995-8. Doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.995-998.2004>
3. Solórzano A., Ye J., Pérez D.R. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modifications in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virol*. 2010; 84(9): 4587-96. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00101-10>
4. Cox A., Dewhurst S. A single mutation at PB1 residue 319 dramatically increases the safety of PR8 live attenuated influenza vaccine in a murine model without compromising vaccine efficacy. *J. Virol*. 2015; 90(5): 2702-5. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02723-15>
5. Song H., Nieto G., Perez D. A new generation of modified live-attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J. Virol*. 2007; 81(17): 9238-48. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00893-07>
6. Zhou B., Li Yo., Speer S., Subba A., Lin X., Wentworth D.E. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine*. 2012; 30(24): 3691-702. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.025>
7. Aleksandrova G.I., Klimov A.I. *Live Influenza Vaccine [Zhivaya vaksina protiv grippa]*. St. Petersburg: Nauka; 1994. (in Russian)
8. Rekstin A.R., Desheva Yu.A., Lu Kh., Aleksandrova G.I., Klimov A.I., Kats D.M., et al. Heterosubtypic immune response and cross-protection against a highly pathogenic a (H5N1) influenza virus in mice immunized with cold-adapted a/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus. *Meditsinskaya immunologiya*. 2005; 7(5-6): 503-10. (in Russian)
9. Rudenko L.G., Arden N.H., Grigorieva E., Naychin A., Rekstin A., Klimov A.I., et al. Immunogenicity and efficacy of Russian live attenuated and US inactivated influenza vaccines used alone and in combination in nursing home residents. *Vaccine*. 2000; 19(2-3): 308-18. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00153-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00153-5)
10. Gendon Yu.Z., Markushin S.G., Tsfasman T.M., Akopova I.I., Akhmatova N.K., Koptyaeva I.B. New Cold-Adapted Donor Strains for Live Influenza Vaccine. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(1): 11-7. (in Russian)
11. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97(11): 6108-13. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.100133697>
12. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*. 2008;3(11):e3647.
13. Pflug A., Guilligay D., Reich S., Cusack S. Structure of influenza A polymerase bound to the viral RNA promoter. *Nature*. 2014; 516(7531): 355-60. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature14008>
14. Da Costa B., Sausset A., Munier S., Ghounaris A., Naffakh N., Le Goffic R., et al. Temperature sensitive mutants in the influenza A virus RNA polymerase: alterations in the PA linker reduce nuclear targeting of the PB1-PA dimer and result in viral attenuation. *J. Virol*. 2015; 89(12): 3802-5. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00589-15>
15. Biswas S.K., Nayak D.P. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J. Virol*. 1994; 68(3): 1819-26.
16. Cox N.J., Kitame F., Kendal A.P., Maassab H.F., Naeve C. Identification changes in the cold-adapted live attenuated influenza vaccine strain A/Ann Arbor/6/60 1988 (H2N2). *Virology*. 1988; 167(2): 554-67.

Поступила 11.07.19

Принята в печать 24.09.19

Махмудова Н.Р.¹, Ленёва И.А.¹, Ларионова Н.В.², Поддубиков А.В.¹,
Фалынскова И.Н.¹, Карташова Н.П.¹, Свитич О.А.¹

БЕЗОПАСНОСТЬ АТТЕНУИРОВАННОЙ И РЕКОМБИНАНТНОЙ ИНТРАНАЗАЛЬНЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ВТОРИЧНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СУПЕРИНФЕКЦИИ

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,
105064, г. Москва, Россия;

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, г. Санкт-Петербург, Россия

Введение. Грипп – тяжёлое вирусное заболевание. Наиболее частым постгриппозным осложнением являются пневмонии. Ранее авторами разработана экспериментальная мышиная модель вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа и *Staphylococcus aureus*. В ней был выявлен летальный синергизм между патогенами, отмечаемый в эпидемиологических наблюдениях.

Цель настоящего исследования – изучение эффекта введения интраназальных вакцин с последующим заражением *Streptococcus pneumoniae* на развитие и исход заболевания.

Материалы и методы. Животные были иммунизированы интраназально штаммом аттенуированной холодоадаптированной живой гриппозной вакцины A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 и рекомбинантной вакциной на основе вирусоподобных частиц (ВПЧ) HA(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag. Животные экспериментальных групп были инфицированы вирулентными штаммами вируса гриппа A/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 или A/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1). На 5-е сутки после интраназальной иммунизации животных подвергали бактериальному заражению штаммом *St. pneumoniae*. Синергизм вакцинного или вирусного агента с бактериальной инфекцией оценивали по выживаемости и снижению массы тела животных, титру вируса и плотности бактерий в носоглоточных смывах и лёгких.

Результаты. Иммунизация вакцинными препаратами не способствовала повышению чувствительности мышей к бактериальному заражению. Элиминация бактерий из лёгких и носоглотки в группах мышей, иммунизированных вакцинными препаратами, соответствовала динамике в группе животных, иммунизированных фосфатно-солевым буфером.

Обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют о безопасности интраназальной иммунизации препаратами холодоадаптированного аттенуированного штамма вируса гриппа A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 и ВПЧ, несущих HA(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag вируса гриппа, с точки зрения усиления вторичной бактериальной суперинфекции, вызванной *St. pneumoniae*.

Заключение. Исследованные вакцинные препараты успешно блокировали инфекции в нижних отделах респираторного тракта.

Ключевые слова: вирус гриппа; живая гриппозная вакцина; вирусоподобные частицы; вторичные бактериальные пневмонии после гриппозной инфекции.

Для цитирования: Махмудова Н.Р., Ленёва И.А., Ларионова Н.В., Поддубиков А.В., Фалынскова И.Н., Карташова Н.П., Свитич О.А. Безопасность аттенуированной и рекомбинантной интраназальных гриппозных вакцин в условиях развития вторичной бактериальной суперинфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6): 30-39.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-30-39>

Makhmudova N.R.¹, Leneva I.A.¹, Larionova N.V.², Poddubikov A.V.¹,
Falynskova I.N.¹, Kartashova N.P.¹, Svitich O.A.¹

THE SAFETY OF ATTENUATED AND RECOMBINANT NASAL INFLUENZA VACCINES IN TERMS OF THE DEVELOPMENT OF SECONDARY BACTERIAL SUPERINFECTION

¹I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Moscow, 105064, Russia;

²Federal State Budgetary Research Institution «Institute of Experimental Medicine», Saint-Petersburg, 197376, Russia

Introduction. Influenza is a severe viral disease. The most common post-influenza complication is pneumonia. Earlier, we developed an experimental mouse model of viral-bacterial pneumonia induced by successive infection with influenza virus and *St. aureus*, in which lethal synergy between pathogens observed in epidemiological observations was detected.

Aim. To study the effect of the administration of intranasal vaccines, followed by infection with *St. pneumoniae* on the development and completion of the disease.

Materials and methods. The animals were immunized intranasal with a strain of attenuated cold-adapted live influenza vaccine A/17/California/2009/38 (H1N1)pdm09 (LAIV) and a recombinant vaccine based on virus-like particles HA(Puerto Rico/8/34)-Gag (VLPs). Control groups of animals were infected with virulent strains of influenza virus A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 or A/Puerto Rico /8/34 (H1N1). On the fifth day after intranasal immunization with the vaccine preparations and infection with pathogenic strains, animals were subjected to bacterial infection with a strain of *St. pneumoniae*. The presence of synergism of vaccine or viral agent with bacterial infection was assessed by survival and weight loss of animals, virus titer and density of bacteria in nasopharyngeal washes and lungs.

Results. It was shown that immunization with vaccine preparations did not lead to increased sensitivity of mice to bacterial infection. Elimination of bacteria from the lungs and nasopharynx in groups immunized with vaccine preparations corresponded to the dynamics in the group of animals immunized by PBS.

Discussion. The results obtained indicate the safety of intranasal immunization with LAIV A/17/California/2009/38 (H1N1)pdm09 and virus-like particles HA (Puerto Rico/8/34)-Gag (VLPs) in terms of enhancing secondary bacterial superinfection caused by *St. pneumoniae*.

Conclusion. The studied vaccines successfully blocked infections in the lower respiratory tract.

Keywords: *influenza virus; LAIV; VLP; secondary bacterial pneumonia after influenza infection.*

For citation: Makhmudova N.R., Leneva I.A., Larionova N.V., Poddubikov A.V., Falynskova I.N., Kartashova N.P., Svitich O.A. The safety of attenuated and recombinant nasal influenza vaccines in terms of the development of secondary bacterial superinfection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6):30-39. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-30-39>

For correspondence: Nailya R. Makhmudova, PhD. Leading Researcher of Laboratory of Experimental Virology I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Moscow, 105064, Russia. E-mail: makhmudova_nr@mail.ru

Information about authors:

Makhmudova N.R., <https://orcid.org/0000-0003-2614-5091>

Leneva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Larionova N.V., <https://orcid.org/0000-0003-1171-3383>

Poddubikov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Falynskova I.N., <https://orcid.org/0000-0001-9836-9620>

Kartashova N.P., <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>

Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Acknowledgments. This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant No. 18-45-05002 Virus-like particles for the control of post-influenza bacterial infections, 2018-2020)

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 01 August 2019

Accepted 24 September 2019

Введение

Грипп – тяжёлое острое вирусное заболевание, которым ежегодно в мире болеют около 1 млрд человек, при этом 300–500 тыс. умирают от гриппа или от его осложнений. Наиболее частым постгриппозным осложнением является пневмония. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире регистрируется 429 млн случаев пневмонии, из них 300 млн – это пневмонии, перенесённые после тяжёлых случаев гриппа и острой респираторной вирусной инфекции [1].

Основным средством борьбы с гриппозной инфекцией является вакцинация. Несмотря на то что эффективность вакцинации традиционно оценивается по прямому действию – способности предотвращать заболеваемость гриппом, снижение числа осложнений, в частности пневмоний, несомненно, также относится к её достоинствам.

В последние годы всё более широкое распространение в мире получают живые аттенуированные гриппозные вакцины (ЖГВ), которые обеспечивают полноценную защиту, имитируя инфекцию эпидемическим вирусом и стимулируя те же звенья иммунного ответа, что и патогенный вирус. Несмотря на то что современные ЖГВ имеют ряд неоспоримых достоинств (эффективность, безопасность, перекрёстный защитный эффект против дрейфовых вариантов возбудителей гриппа, назальное введение) [2, 3], их применение до сих пор дискутируется. Сомнения вызывает, в частности, факт, что гриппозная инфекция инициирует увеличение количества бактерий *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* в назофарингеальном тракте животных и человека, повышая риск инфицирования бактериальными патогенами верхнего и нижнего отделов респираторного тракта с дальнейшим развитием заболевания [4, 5]. Это вызывает вопрос о потенциальной опасности, поскольку интраназальная иммунизация ЖГВ также может приводить к увеличению плотности бактерий в назофарингеальном тракте с последующей трансмиссией в лёгкие [6]. Одним из инновационных подходов является использование вирусоподобных частиц (ВПЧ). Они представляют собой копию оболочки вируса в отсутствие генетического материала и используются как платформа для разработки противогриппозных вакцин, некоторые из них уже находятся на стадии клинических испытаний [7]. Такие вакцины благодаря скорости изготовления должны решить давнюю проблему своевременного появления вакцин против быстро мутирующего вируса гриппа. В частности, мы изучаем ВПЧ, полученные в клетках насекомых с помощью бакуловирусных векторов, несущие НА вируса гриппа – поверхностный белок, который играет значительную роль в адгезии вируса к клеткам респираторного эпителия назофарингеального тракта.

Ранее нами разработана экспериментальная мышьяная модель вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа и *St. aureus*, в которой был выявлен летальный синергизм между патогенами, отмечаемый в эпидемиологических наблюдениях [8].

Цель настоящей работы – изучение эффекта интраназальных вакцин холодоадаптированного аттенуированного штамма вируса гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) pdm09 и ВПЧ, несущих НА вируса гриппа, с последующим заражением *St. pneumoniae* на развитие пневмонии и исход заболевания.

Материалы и методы

Штамм живой гриппозной вакцины, вирусоподобные частицы и патогены. Для вакцинации животных использовали аттенуированный штамм ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) pdm09, предоставленный отделом вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург, Россия).

Штамм ЖГВ был получен путём классической реассортации вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1) pdm09 – возбудителя пандемии 2009 г. – и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). В вакцинном реассортанте присутствуют гены, кодирующие внутренние белки вириона PB2, PB1, PA, NP, M и NS от донора аттенуации, и гены НА и NA, ответственные за антигенную актуальность, от пандемического вируса [3]. Лиофилизированный штамм ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) pdm09 восстанавливали, добавляя 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), и определяя

ли его инфекционную активность титрованием в 9-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Далее аттенуированный штамм ЖГВ накапливали в РКЭ при 32–33 °С в течение 72 ч и использовали для иммунизации мышей.

Также для вакцинации был использован препарат, полученный с помощью конструирования бакуловирального вектора, экспрессирующего ВПЧ при заражении клеток насекомых. ВПЧ, образованные комбинацией ретровирусного Gag белка и НА вируса гриппа, происходящего от штамма А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), были наработаны в виде неочищенного препарата (НА-Gag ВПЧ), содержащего инфекционный бакуловирусный вектор. ВПЧ были получены и охарактеризованы М. Klausberger (Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna) в рамках совместного гранта Российского научного фонда.

Для заражения животных использовали вирус гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), полученный из музея ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, и адаптированный к мышам пандемический вирус гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09. Для адаптации вируса мышам заражали интраназально аллантаическим вирусом, после проявления признаков заболевания в стерильных условиях получали лёгочный гомогенат, который использовали для заражения 9-дневных РКЭ. Вирусы для заражения выращивали в 9-дневных РКЭ в течение 72 ч при 37 °С [9]. После определения инфекционной активности вирусов, выраженной в lg ЭИД₅₀/мл, их использовали для инфицирования животных.

Для бактериального заражения использовали штамм *St. pneumoniae* № 3405 из коллекции микроорганизмов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия).

Лёгочную суспензию разводили ФСБ, далее осуществляли посев на чашки Петри с плотной средой «Питательный агар» (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk, Россия) с добавлением 5% лошадиной крови. Культуру инкубировали при 37 °С в 5,5% CO₂ среде в течение 18–24 ч.

Животные. Мыши линии BALB/c массой тела 12–14 г получены из питомника ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, филиал «Андреевка» (Московская область).

Определение эффекта вакцинации в модели бактериальной пневмонии. Животных вакцинировали интраназально штаммом ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 в дозе 6 lg ЭИД₅₀/50 мкл, или ВПЧ в дозе 1,25 мкг НА/мышь. Через 5 сут проводили интраназально бактериальное заражение штаммом *St. pneumoniae* в дозе 1,25 · 10⁷ колониеобразующих единиц (КОЕ/мл).

Животных 1-й группы (n=30) инфицировали интраназально адаптированным патогенным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 дозой 10⁵ ТЦИД₅₀ с последующим бактериальным заражением. Животных 2-й группы (n=30) инфицировали интраназально вирусом гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34(H1N1) в дозе 10² ТЦИД₅₀ с последующим бактериальным заражением. Животным 3-й группы (n=30) вводили интраназально стерильный ФСБ и через 5 сут их заражали интраназально *St. pneumoniae* в дозе 1,25 · 10⁷ КОЕ/мл.

Патогенез бактериальной пневмонии после инфекции вирусами гриппа оценивали по выживаемости животных, средней продолжительности их жизни, а также по снижению массы тела.

Среднюю продолжительность жизни животных высчитывали по формуле:

$$MSD = \sum f(d-1)/n,$$

где *f* – количество мышей, умерших на день *d*, *n* – количество мышей в группе. Массу тела животных оценивали ежедневно. Её изменение рассчитывали отдельно для каждой мыши и выражали в процентах, при этом за 100% принимали массу тела животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определяли среднее значение снижения или увеличения массы тела (в процентах).

Изучение биологического материала животных. Животные были размещены и обработаны в соответствии с законодательством Европейского Союза и с Международ-

ными руководящими принципами этического обращения с лабораторными животными [10]. Использование протокола гуманного обращения с животными было одобрено локальным комитетом по биоэтике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия).

В каждой группе умерщвляли мышей до и после бактериального заражения для определения титра вируса. На 3-и и 5-е сутки после бактериального заражения животных умерщвляли для определения обсеменённости лёгких и носоглоточных смывов. В указанные дни в каждой группе умерщвляли по 3 мыши, в стерильных условиях извлекали лёгкие, гомогенизировали их и ресуспендировали в 1 мл холодного стерильного 0,01M ФСБ. Суспензию осветляли от клеточного дебриса центрифугированием при 2000g в течение 10 мин, 0,1 мл супернатанта отбирали для определения бактериальной плотности, а оставшийся супернатант использовали для определения инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK. Полученные образцы хранили при 4 °C не более 1 нед до постановки экспериментов.

Определение инфекционного титра вируса в лёгких мышей. Клетки MDCK рассаживали в 96-луночных планшетах фирмы Costar (США) со средней плотностью 30 000–35 000 клеток на лунку и выращивали в минимальной среде Игла (MEM) в присутствии 5% сыворотки телят, 10 mM глутамин и антибиотиков (пенициллин 100 ME/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) до полного монослоя. Готовили 10-кратные разведения каждой пробы вируса из лёгких (цельный до 10⁸) на среде с добавлением ТРСК-трипсина (2 мкг/мл). Полученными разведениями заражали монослой четырех лунок 96-луночного планшета. После инкубации при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 72 ч клетки трижды промывали ФСБ и фиксировали 10% раствором формальдегида при 18–23 °C в течение 5 мин. После удаления раствора формальдегида в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл 1% раствора кристаллического фиолетового и выдерживали при 18–23 °C в течение 5 мин. После промывки водой и высушивания планшета в лунку добавляли по 0,1 мл 96% спирта, инкубировали при покачивании (комнатная температура в течение 20 мин), а затем измеряли оптическую плотность при длине волны 570 нм. Лунки считали «положительными», если оптическая плотность была ниже таковой в клеточном контроле на 20%.

Определение обсеменённости респираторных путей. Для определения плотности бактерий *St. pneumoniae* образцы гомогенизированных лёгких или носоглоточные смывы разводили ФСБ, диапазон разведений определяли опытным путем. Осуществляли посев соответствующих разведений на чашки Петри с плотной средой «Питательный агар» (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Россия) с добавлением 5% лошадиной крови. Культуру инкубировали при 37 °C в 5,5% CO₂ среде в течение 18–24 ч. Чистоту выросшей культуры определяли визуально и микроскопически в мазках, окрашенных по Грамму.

Идентичность подтверждали фенотипически, тинкториально, по наличию α-гемолиза, в тестах с оптохином и желчью, а также в реакции латекс-агглютинации с соответствующими серотиповыми сыворотками (Statens Serum Inst., Дания).

Обсеменённость лёгочной ткани рассчитывали, умножая число выросших колоний на степень разведения и коэффициент, обратный объёму посеянного материала, и выражали в Ig КОЕ/мл.

Все манипуляции с патогенными материалами проводили в МСК класса АИИ на объекте БСЛ-2.

Статистическая обработка данных. Полученные цифровые данные были подвергнуты статистической обработке в программе Statistica 8.0. Выживаемость в группах мышей сравнивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программе Statistica 8.0. Для сравнения изменений массы тела мышей использовали однофакторный дисперсионный анализ для нелинейных моделей, четырёхпараметрическую log-логистическую модель. Анализ выполнен в приложении R-Studio (Version 1.0.136).

Результаты

Динамика массы тела и летальность у мышей после иммунизации и последующего бактериального заражения. Основной целью работы было изучение влияния интраназальной иммунизации мышей вакцинными препаратами ЖГВ и рекомбинантной вакцины на основе ВПЧ на развитие вторичной бактериальной инфекции при заражении сублетальной дозой *St. pneumoniae*. Группы положительного контроля были сформированы путём инфицирования мышей низкими дозами патогенных вирусов гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 или А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) с последующим заражением *St. pneumoniae* на 5-е сутки после инфекции вирусами гриппа, что приводило к развитию известного эффекта вирусно-бактериального синергизма. Наблюдалось прогрессирующее снижение массы тела животных на протяжении всего эксперимента, заканчивающееся 100% летальностью (рис. 1, рис. 2). В то же время животные, иммунизированные холодоадаптированным вакцинным вирусом гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 или препаратом НА(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag ВПЧ, не демонстрировали признаков заболевания после бактериального заражения, летальности не наблюдалось. Динамика показателей выживаемости в течение эксперимента (см. рис. 1), а также изменения массы тела экспериментальных животных соответствовали показателям группы животных, иммунизированных ФСБ (см. рис. 2). Таким образом, продемонстрировано отсутствие негативного влияния иммунизации ЖГВ и НА(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag ВПЧ на развитие вторичной бактериальной инфекции.

Титр вируса в лёгких мышей экспериментальных групп исследовали 2 раза: до и после бактериального заражения *St. pneumoniae*. В образцах, полученных от животных, вакцинированных холодоадаптированным штаммом ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09, выделения вируса из лёгких мышей не наблюдали, что закономерно подтверждает аттенуированный фенотип вакцинного штамма. А в группах животных, заражённых патогенным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 или вирусом гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), вирус выделялся из лёгких с титром $4,5 \pm 2,3$ и $3,5 \pm 0,5$ Ig ТЦИД₅₀/мл до бактериального заражения, $6,2 \pm 2,3$ и $7,5 \pm 1,5$ Ig ТЦИД₅₀/мл после бактериального заражения соответственно (см. таблицу). Таким образом, бактериальное заражение провоцировало размножение патогенных вирусов, но не сказывалось на репродукции аттенуированного штамма ЖГВ.

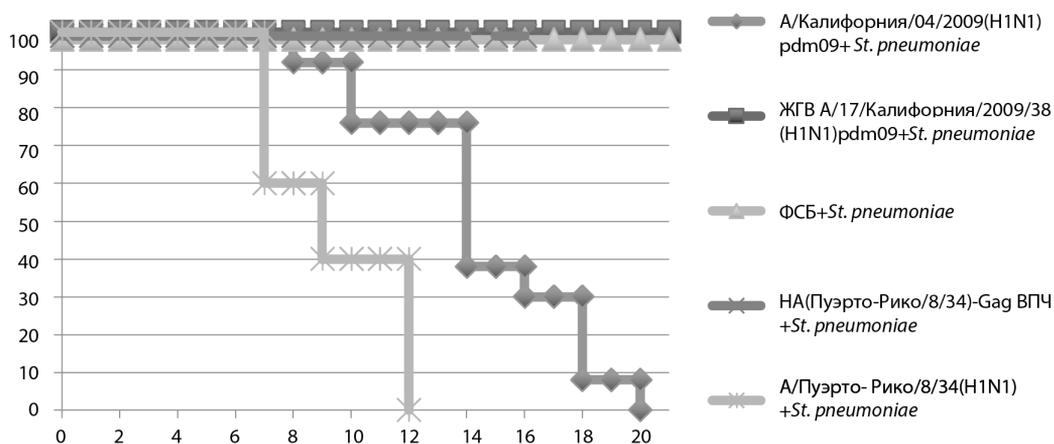


Рис. 1. Выживаемость мышей после заражения *St. pneumoniae* при изучении эффекта вакцинации живой гриппозной вакциной А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 и препаратом НА(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag ВПЧ.

ЖГВ – живая гриппозная вакцина; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; НА – гемагглютинин; ВПЧ – вирусоподобные частицы.

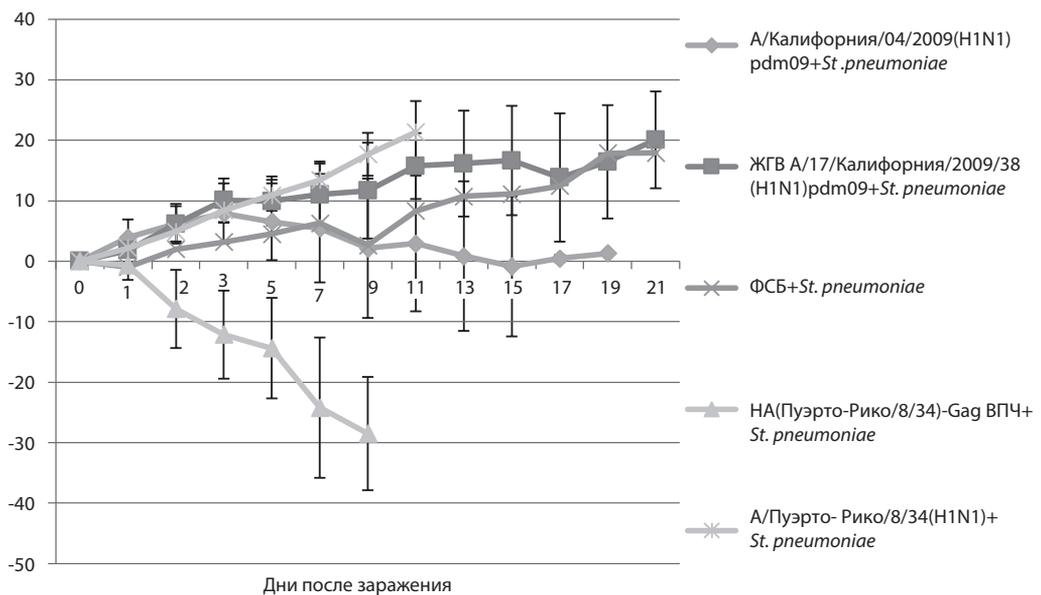


Рис. 2. Изменение массы тела мышей, инфицированных *St. pneumoniae*, при изучении эффекта вакцинации живой гриппозной вакциной А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 и препаратом HA(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag ВПЧ

ЖГВ – живая гриппозная вакцина; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; HA – гемагглютинин; ВПЧ – вирусоподобные частицы.

Бактериальная обсеменённость лёгких и носоглоточных смывов животных в экспериментальных группах. Сравнительное изучение продуктивности бактериального роста в группах мышей на 3-и сутки после бактериального заражения показало, что независимо от иммунизирующего агента, включая инфекцию патогенными штаммами, наблюдался высеv бактериальных колоний из образцов носоглоточных смывов в диапазоне от 3 до 5 log КОЕ₅₀/мл (см. таблицу). В группах, иммунизированных вакцинными препаратами, выявлена тенденция к снижению высева из носовых смывов по сравнению с группой контроля ФСБ и группами, получившими инфекцию вирулентными вирусами. Так, в группе мышей, иммунизированных штаммом ЖГВ, количество колоний составило 3,55 ± 0,19 log КОЕ/мл, а в группе, вакцинированной препаратом ВПЧ, – 3,0 ± 0,5 log КОЕ/мл. В группах мышей, заражённых патогенными вирусами А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 и А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), – 4,72 ± 0,08 и 5,75 ± 0,05 log КОЕ/мл соответственно. На 5-е сутки после бактериального заражения материал носовых смывов и гомогенатов лёгких, полученный от групп животных, иммунизированных ЖГВ, ВПЧ или заражённых только *St. pneumoniae*, не имел признаков бактериального роста. При этом в образцах гомогенатов лёгких, полученных от групп животных, заражённых патогенными вирусами гриппа с последующим заражением *St. pneumoniae*, наблюдался рост числа колоний на 2–3 log КОЕ/мл по сравнению с показателями 3-х суток. Одновременно в этих группах на 5-е сутки наблюдалась элиминация *St. pneumoniae* из верхнего респираторного тракта (см. таблицу).

Обсуждение

Наличие вирусно-бактериального синергизма зависело от репродукционной активности вируса в лёгких мышей. При заражении вирусами гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 и А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) рост обсеменённости лёгких на 5-е сутки после бактериального заражения свидетельствует о смещении вирусного инфекционного процесса в нижние отделы респираторного тракта. А в группе мышей, приви-

Сравнение эффективности заражения / вакцинации на развитие осложнений в экспериментальной модели вторичной гриппозной пневмонии мышей, вызванной *St. pneumoniae*

Экспериментальные группы	Средняя продолжительность жизни, сут	Титр вируса в лёгких, lg ТЦИД ₅₀ /мл		Обсеменённость после бактериального заражения, lg КОЕ/мл			
		до заражения	после заражения	лёгкие		смывы	
				3-и сутки	5-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
А/Калифорния/04/2009 (H1N1) pdm09 + <i>St. pneumoniae</i>	14,5	4,5 ± 2,3	6,2 ± 2,3	4,62 ± 0,15	6,13 ± 0,16	4,72 ± 0,08	Н/о
ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) pdm09 + <i>St. pneumoniae</i>	> 21	Н/о	Н/о	4,38 ± 0,07	Н/о	3,55 ± 0,19	Н/о
А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) + <i>St. pneumoniae</i>	9,2	3,5 ± 0,5	7,5 ± 1,5	5,25 ± 0,25	8,0 ± 0,5	5,75 ± 0,5	Н/о
НА(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag ВПЧ + <i>St. pneumoniae</i>	> 21	Н/о	Н/о	4,1 ± 0,02	Н/о	3,0 ± 0,5	Н/о
Контроль (ФСБ) + <i>St. pneumoniae</i>	> 21	Н/о	Н/о	4,46 ± 0,05	Н/о	4,23 ± 0,07	Н/о

Примечание. Н/о – не обнаружено; ЖГВ – живая гриппозная вакцина; ВПЧ – вирусоподобные частицы; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

тых аттенуированным вирусом ЖГВ, который из-за холодоадаптированного фенотипа не способен к репродукции в нижних отделах респираторного тракта, бактериальная пневмония не развивалась. Соответственно нереплицирующаяся вакцина на основе ВПЧ также не провоцировала бактериальный рост в лёгких.

Полученные результаты представляются неожиданными, поскольку известно, что штаммы холодоадаптированной ЖГВ могут обладать повышенной интерферогенностью при интраназальной вакцинации [11]. Кроме того, препараты ВПЧ за счёт присутствия компонентов бакуловirusа могут стимулировать продукцию интерферонов [9]. Известно, что выработка интерферонов 1-го типа при вирусной инфекции или вакцинации может стать одним из провоцирующих факторов вторичной бактериальной инфекции из-за их негативного влияния на активность фагоцитирующих клеток и приток нейтрофилов в очаг инфекции [12, 13]. В отличие от наших данных, M.J. Mina и соавт. [6] в исследованиях на мышах наблюдали 2–5-кратное увеличение обсеменённости бактериальной флорой верхнего респираторного тракта мышей, иммунизированных штаммом холодоадаптированной ЖГВ А(Н3N2), аналогично тому, как растёт плотность бактерий при инфицировании диким вирусом гриппа. Однако, несмотря на рост микрофлоры в верхних дыхательных путях, авторы сделали вывод о том, что ЖГВ, в отличие от диких вирусов гриппа, не приводят к заболеваниям нижних дыхательных путей. Многочисленные клинические и эпидемиологические исследования ЖГВ, а также применение ЖГВ в практике здравоохранения демонстрируют не только их высокую профилактическую эффективность, но и несомненную безвредность [14–17]. Низкая реактогенность ЖГВ против сезонных вирусов гриппа, а также вирусов гриппа с пандемическим потенциалом не только свидетельствует об отсутствии остаточной вирулентности в препаратах ЖГВ, но и показывает, что в ответ на введение ЖГВ не развивается осложнений в форме сопутствующих инфекций и соматических заболеваний. В отличие от ЖГВ, вакцины на основе ВПЧ находятся на ранней стадии своего развития и призваны прийти на смену разнообразным сезонным гриппозным вакцинам. Развитие технологии ВПЧ направлено на

создание нового поколения универсальных гриппозных вакцин. Аналогично ЖГВ, ставка делается на формирование мукозального иммунитета после интраназальной вакцинации ВПЧ, презентующими различные антигены вирусов гриппа [18, 19]. В этом аспекте представленное исследование позволяет сделать вывод, что препараты ВПЧ безопасны в отношении развития вторичной бактериальной инфекции, так же как и аттенуированные штаммы ЖГВ.

Заключение

В экспериментальной мышинной модели вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа и *St. pneumoniae*, изучен эффект интраназальных вакцин холодадаптированного аттенуированного штамма вируса гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 и ВПЧ, несущих НА вируса гриппа, на развитие и исход заболевания. Доказано, что вакцины блокировали инфекции в нижних отделах респираторного тракта.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-45-05002 «Вирусоподобные частицы для борьбы с постгриппозными бактериальными инфекциями», 2018–2020 гг.)

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4-7, 9-13, 15-19 см. REFERENCES)

2. Григорьева Е.П., Дринецкий В.П., Дорошенко Е.М., Дешева Ю.А., Ерофеева М.К., Максакова В.Л. и др. Эффективность живой гриппозной реассортантной вакцины при циркуляции дрейфовых вариантов вирусов гриппа. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2009; (1): 45-53.
3. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Миронов А.Н., Бушменков Д.С., Донина С.А., Петухова Г.Д. и др. Живая гриппозная вакцина из реассортантного штамма А/17/ Калифорния/2009/38 (H1N1) – эффективный препарат для профилактики пандемического гриппа. *Медицинский академический журнал*. 2011; 11(4): 3-12.
8. Ленева И.А., Леонова Е.И., Махмудова Н.Р., Фалынскова И.Н., Федякина И.Т., Зверев В.В. и др. Разработка экспериментальной модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(5): 27-32.
14. Григорьева Е.П., Дорошенко Е.М., Руденко Л.Г. Современное состояние вакцинопрофилактики гриппа с помощью живой гриппозной вакцины. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2005; 4(23): 13-7.

REFERENCES

1. WHO. Initiative for Vaccine Research (IVR). Options for Live Attenuated Influenza Vaccines (LAIV) In the Control of Epidemic and Pandemic Influenza. Geneva; 2007.
2. Grigor'eva E.P., Drinevskiy V.P., Doroshenko E.M., Desheva Yu.A., Erofeeva M.K., Maksakova V.L., et al. Efficacy of a live influenza reassortant vaccine in circulating drift variants of influenza viruses. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2009; (1): 45-53. (in Russian)
3. Larionova N.V., Kiseleva I.V., Mironov A.N., Bushmenkov D.S., Donina S.A., Petukhova G.D., et al. Live influenza vaccine from the reassortant strain A/ 17/California/2009 / 38 (H1N1) is an effective drug for the prevention of pandemic influenza. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal*. 2011; 11(4): 3-12. (in Russian)
4. Nakamura S., Davis M., Weiser J.N. Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *J. Clin. Invest.* 2011; 121(9): 3657-65. Doi: <https://doi.org/10.1172/JCI57762>
5. Plotkowski M.C., Puchelle E., Beck G., Jacquot J., Hannoun C. Adherence of type I *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986; 134(5): 1040-4. Doi: <https://doi.org/10.1164/arrd.1986.134.5.1040>
6. Mina M.J., McCullers J.A., Klugman K.P. Live Attenuated influenza Vaccine Enhances Colonization of *Streptococcus pneumoniae* in Mice. *MBio*. 2014; 5(1): 01040-13. Doi: <https://doi.org/10.1128/mBio.01040-13>
7. Wong S.S., Webby R.J. Traditional and New Influenza Vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(3): 476-92. Doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-12>
8. Leneva I.A., Leonova E.I., Makhmudova N.R., Falynskova I.N., Fedyakina I.T., Zverev V.V., et al. Elaboration of an experimental model of combined viral and bacterial pneumonia. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(5): 27-32. (in Russian)
9. Margine I., Martinez-Gil L., Chou Y.Y., Krammer F. Residual baculovirus in insect cell-derived influenza virus-like particle preparations enhances immunogenicity. *PLoS One*. 2012; 7(12): 51559. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051559>
10. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

11. Rekestin A.R., Kiseleva I.V., Klimov A.I., Katz J.M., Rudenko L.G. Interferon and other proinflammatory cytokine responses in vitro following infection with wild-type and cold-adapted reassortant influenza viruses. *Vaccine*. 2006; 24(44-46): 6581-4. Doi: <https://10.1016/j.vaccine.2006.05.091>
12. Lee B., Robinson K.M., McHugh K.J., Scheller E.V., Mandalapu S., Chen C., et al. Influenza-induced type I interferon enhances susceptibility to gram-negative and gram-positive bacterial pneumonia in mice. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2015; 309(2): L158-67. Doi: <https://10.1152/ajplung.00338.2014>
13. Shahangian A., Chow E.K., Tian X., Kang J.R., Ghaffari A., Liu S.Y., et al. Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119(7): 1910-20. Doi: <https://10.1172/JCI35412>
14. Grigor'eva E.P., Doroshenko E.M., Rudenko L.G. Modern status of influenza vaccination with live influenza vaccine. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2005; 4(23): 13-7. (in Russian)
15. Carter N.J., Curran M.P. Live Attenuated Influenza Vaccine (FluMist®; Fluenz™). A review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults. *Drugs*. 2011; 71(12): 1591-622. Doi: <https://10.2165/11206860-000000000-00000>
16. Rudenko L.G., Slepshkin A.N., Monto A.S., Kendal A.P., Grigorieva E.P., Burtseva E.P., et al. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia. *J. Infect. Dis.* 1993; 168(4): 881-7. Doi: <https://10.1093/infdis/168.4.881>
17. Rudenko L.G., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Naykhin A., Donina S., et al. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study. *Vaccine*. 2015; 33(39): 5110-7. Doi: <https://10.1016/j.vaccine.2015.08.019>
18. Lee Y.T., Ko E.J., Lee Y., Kim K.H., Kim M.C., Lee Y.N., et al. Intranasal vaccination with M2e5x virus-like particles induces humoral and cellular immune responses conferring cross-protection against heterosubtypic influenza viruses. *PLoS One*. 2018; 13(1): 0190868. Doi: <https://10.1016/10.1371/journal.pone.0190868>
19. Schwartzman L.M., Cathcart A.L., Pujanauski L.M., Qi L., Kash J.C., Taubenberger J.K. An Intranasal Virus-Like Particle Vaccine Broadly Protects Mice from Multiple Subtypes of Influenza A Virus. *MBio*. 2015; 6(4): 01044. Doi: <https://10.1128/mBio.01044-15>

Поступила 01.08.19

Принята в печать 24.09.19

Смирнова Д.И., Петруша О.А., Грачёва А.В., Волынская Е.А., Зверев В.В.,
Файзулов Е.Б.

БЫСТРАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕНИТАЛЬНОГО ГЕРПЕСА МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 115088, г. Москва, Россия

Введение. В связи с высокой клинической значимостью герпесвирусных заболеваний актуален поиск быстрых и эффективных методов их диагностики.

Целью работы была оценка диагностической эффективности метода петлевой изотермической амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (LAMP-PB) с красителем SYTO-82 на модели инфекции вирусов простого герпеса (ВПГ).

Материалы и методы. Исследовано 44 урогенитальных соскоба, содержащих ДНК ВПГ 1-го и 2-го типа; 43 соскоба, не содержащих ДНК ВПГ, 33 из которых содержали ДНК цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр и вируса герпеса 6-го типа. Для постановки LAMP-PB использовали ДНК-полимеразу Bst 2.0 WarmStart, краситель SYTO-82, праймеры для LAMP.

Результаты. Показана высокая эффективность использования красителя SYTO-82 для детекции ДНК ВПГ 1-го и 2-го типа в реакции LAMP-PB. В оптимальных условиях реакция LAMP-PB позволяла в 2–3 раза сократить время реакции по сравнению с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ПЦР-PB) – до 35 мин. Аналитическая чувствительность выявления ВПГ 1-го и 2-го типа в LAMP-PB составила 10^3 копий ДНК/мл. Диагностическая чувствительность и специфичность LAMP-диагностики ВПГ-инфекции составили 96 и 100% соответственно.

Обсуждение. Метод LAMP-PB обладает высокой, сопоставимой с ПЦР-PB чувствительностью и специфичностью, при этом риск получения ложноположительных результатов минимален.

Заключение. Реакция LAMP-PB с красителем SYTO-82 позволяет быстро, с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять ДНК ВПГ в клиническом материале и может рассматриваться как перспективный метод диагностики герпесвирусных инфекций на месте лечения.

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация ДНК; LAMP; SYTO-82; вирус простого герпеса; диагностика на месте оказания медицинской помощи.

Для цитирования: Смирнова Д.И., Петруша О.А., Грачева А.В., Волынская Е.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Быстрая диагностика генитального герпеса методом петлевой изотермической амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6):40-46.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-40-46>

Smirnova D.I., Petrusha O.A., Gracheva A.V., Volynskaya E.A., Zverev V.V.,
Faizulov E.B.

RAPID DIAGNOSTICS OF GENITAL HERPES BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD WITH FLUORESCENT DETECTION

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 115088, Russia

Introduction. Due to the high clinical significance of herpesvirus diseases, the searching of fast and effective methods for their diagnosis remains relevant. The **aim** of the study was to evaluate the diagnostic efficiency of the loop-mediated isothermal amplification of DNA with real-time fluorescent detection (RT-LAMP) with SYTO-82 dye on a model of herpes simplex virus (HSV) infection.

Для корреспонденции: Файзулов Евгений Бахтиерович, канд. биол. наук, заместитель директора по научной работе ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 115088, г. Москва.
E-mail: faizulov@mail.ru

Materials and methods. A total of 44 urogenital swabs containing type 1 and type 2 HSV DNA and 43 swabs without HSV DNA, including 33 samples containing the DNA of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and herpesvirus type 6, were studied. For RT-LAMP, Bst 2.0 WarmStart DNA polymerase, SYTO-82 dye, LAMP primers were used.

Results. The high efficiency of HSV DNA detection in the RT-LAMP reaction with SYTO-82 dye was shown. RT-LAMP in optimal conditions allowed to reduce reaction time for 2-3 times compared to real-time PCR (to 35 minutes). Analytical sensitivity of HSV type 1 and 2 detection in RT-LAMP was 10^3 copies of DNA/ml. The diagnostic sensitivity and specificity of the RT-LAMP diagnosis of HSV infection were 96% and 100%, respectively.

Discussion. RT-LAMP method has a high sensitivity and specificity comparable to RT-PCR, while the risk of false positive results obtaining is minimal.

Conclusion. Thus, the reaction of RT-LAMP with SYTO-82 dye allows quickly, with high sensitivity and specificity to detect HSV DNA in clinical material and can be considered as a promising point-of-care testing method.

Keywords: *loop-mediated isothermal amplification of DNA; LAMP; SYTO-82; herpes simplex virus; point-of-care testing.*

For citation: Smirnova D.I., Petrusha O.A., Gracheva A.V., Volynskaya E.A., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Rapid diagnostics of genital herpes by loop-mediated isothermal amplification method with fluorescent detection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6):40-46. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-40-46>

For correspondence: Evgeny B. Faizuloev, PhD, Head of Molecular Virology Laboratory, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 115088, Russia.
E-mail: faizuloev@mail.ru

Information about authors:

Smirnova D.I., <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Petrusha O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5022-7962>

Gracheva A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

Volynskaya E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7739-9337>

Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Faizuloev E.B., <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 27 August 2019

Accepted 24 September 2019

Введение

Герпесвирусные инфекции представляют собой группу широко распространённых антропонозных инфекционных болезней, вызываемых вирусами семейства *Herpesviridae*. Вирусы этого семейства способны персистировать в тканях хозяина в латентной форме на протяжении всей жизни. В России ежегодно около 20 млн человек переносят инфекции, вызванные вирусами простого герпеса 1-го (ВПГ-1) и 2-го типа (ВПГ-2), что превышает соответствующий показатель для гепатитов В, С, D и ВИЧ-инфекции. В европейских странах инфицированность ВПГ-1 достигает 50–80%, ВПГ-2 – 10–25% [1–3]. Герпесвирусы могут быть причиной тяжёлой клинической патологии, в ряде случаев приводящей к летальному исходу, особенно у лиц с выраженными нарушениями иммунитета. Наибольшую угрозу для здоровья представляют герпетические нейроинфекции, включая менингит и энцефалит (летальность достигает 20%, частота инвалидизации – 50%), офтальмогерпес (развитие катаракты или глаукомы почти в 50% случаев), генитальный герпес (существенное снижение качества жизни), неонатальный герпес (уносит жизни до 80% инфицированных новорождённых) [2, 3]. ВПГ занимает важное место в группе возбудителей TORCH-инфекций, представляя серьёзную угрозу для репродуктивного здоровья населения [1, 2].

Для диагностики герпесвирусной инфекции можно использовать весь арсенал методов лабораторной диагностики: выделение вируса на чувствительных клеточных культурах, определение вирусного антигена с использованием различных иммунохи-

мических методов, выявление ДНК вирусов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), определение специфических антител. Наиболее эффективно одновременное использование нескольких методов диагностики [1].

В то же время актуален поиск новых эффективных методов для быстрой и высокочувствительной диагностики на месте оказания медицинской помощи. В связи с этим заслуживают внимания методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот, в том числе метод петлевой изотермической амплификации ДНК (LAMP), разработанный Т. Notomi и соавт. [4]. Среди модификаций метода LAMP наибольший интерес представляет LAMP-анализ с детекцией в режиме реального времени (LAMP-PB), поскольку он минимизирует риск контаминации ампликонами и позволяет оценивать количество исследуемой ДНК. Ранее И.П. Оскорбин и соавт. исследовали несколько интеркалирующих красителей ДНК на модельных образцах плазмидной, фаговой и бактериальной ДНК и показали, что в LAMP-PB краситель SYTO-82 обеспечивает наибольшее соотношение сигнал/фон и наименьшее время появления сигнала (time-to-threshold, Tt) [5]. Нам представилось целесообразным исследовать диагностическую ценность LAMP-PB с красителем SYTO-82 на клинических образцах от пациентов с генитальной герпесвирусной инфекцией.

Целью настоящей работы была оценка диагностической эффективности метода LAMP с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (LAMP-PB) с красителем SYTO-82 на модели инфекции ВПГ.

Материалы и методы

Клинические образцы (урогенитальные соскобы) от пациентов с ВПГ-инфекцией ($n = 44$) и пациентов контрольной группы ($n = 43$) предоставлены клинично-диагностической лабораторией «ДиаЛаб Плюс» (Россия). Во всех образцах контрольной группы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-PB) не была выявлена ДНК ВПГ, но 33 образца содержали ДНК одного из герпесвирусов – цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр или вируса герпеса 6-го типа. Выделяли ДНК из клинических образцов с помощью набора реагентов «Мультиген-Реалекс» («Генлаб», Россия). Лабораторные штаммы ВПГ-1 (штамм VR3) и ВПГ-2 (штамм MS2) получены из коллекции вирусов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Для дифференциального выявления ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2 в ПЦР-PB использовали праймеры и зонды к гену белка gB, описанные в статье L. Namvag и соавт. [6]. Амплификацию проводили с использованием набора реагентов «2,5x реакционная смесь для ПЦР-PB» (ООО «Синтол», Россия). Реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала по 5 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда. Температурно-временной режим: 95 °С – 90 с (1 цикл), 95 °С – 20 с, 58 °С – 50 с (45 циклов).

Для постановки реакции LAMP были использованы наборы праймеров к гену gG (гликопротеин G) ВПГ-1 и ВПГ-2, описанные Y. Enomoto и соавт. (далее – наборы праймеров EN1 и EN2 соответственно) [7]; к гену UL2 (урацил-ДНК-гликозилаза), описанные Н. Kaneko и соавт. (далее – наборы праймеров KN1 и KN2 соответственно) [8] и краситель SYTO-82 (Invitrogen, США). Реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала 8 ед. ДНК-полимеразы Bst 2.0 WarmStart (BioLabs, Великобритания), 2,5 мкл 10x буфера для Bst полимеразы, MgSO₄ – 8 мМ, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов – 2 мМ каждого (ООО «Синтол», Россия), смесь праймеров – по 5 пмоль праймеров F3 и B3, по 50 пмоль праймеров F1P и B1P, по 20 пмоль LPF и LPB, краситель SYTO-82 (1 мкМ). Температурно-временной режим: 65 °С – 60 мин; 80 °С – 10 мин. Для регистрации флуоресценции красителя SYTO-82 использовали цветовой канал HEX.

ПЦР-PB и LAMP-PB проводили в амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология», Россия). Значения Tt и порогового цикла в ПЦР-PB определяли автоматически с помощью программы RealTime_PCR v.7.7 («ДНК-Технология», Россия) на основе математического анализа формы кривой амплификации (метод геометрический). Все праймеры и зонды синтезированы в ООО «Синтол» (Россия). Визуальную детекцию результатов LAMP и ПЦР-PB проводили методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с бромидом

стым этидием, а для LAMP также путём добавления 10 мкл раствора SYBR Green I (разведение 1 : 100) (кат. № S9430, Sigma-Aldrich) к 10 мкл продуктов реакции амплификации. Для достижения большей контрастности содержимое пробирок разбавляли водой в 5 раз.

Для оценки аналитической чувствительности LAMP и ПЦР анализировали последовательные 10-кратные разведения ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2 с известной концентрацией: от 1×10^8 до 1×10^1 копий/мл. Диагностическую чувствительность LAMP рассчитывали, определяя долю положительных результатов LAMP для клинических образцов, в которых методом ПЦР-РВ была обнаружена ДНК ВПГ. Диагностическую специфичность LAMP рассчитывали определением доли отрицательных результатов LAMP для клинических образцов, в которых методом ПЦР-РВ не была обнаружена ДНК ВПГ.

Достоверность различий между двумя независимыми результатами определяли по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты

Ранее в работах Y. Enomoto и соавт. [7] и H. Kaneko и соавт. [8] показана высокая эффективность метода LAMP с электрофоретической детекцией результата в диагностике заболеваний, вызванных ВПГ-1 и ВПГ-2. Мы исследовали эффективность выявления герпесвирусной ДНК в клинических образцах методом LAMP-РВ с применением интеркалирующего красителя ДНК SYTO-82.

На первом этапе были синтезированы наборы праймеров ЕН1, КН1, ЕН2, КН2 [7, 8] и проверены в реакции LAMP с электрофоретической детекцией. На **рис. 1** представлены результаты электрофоретического анализа ампликонов, полученных при LAMP-анализе ДНК лабораторных штаммов ВПГ-1 и ВПГ-2 с помощью разных наборов праймеров. Продукты реакции распределились в геле в виде характерной «лесенки», что свидетельствует о положительном результате LAMP-анализа образцов вирусной ДНК и корректной работе всех наборов праймеров. В качестве дополнительного референсного метода была использована визуальная детекция результата с красителем SYBR Green I (**рис. 2**). Ярко-зелёная флуоресценция свидетельствует о положительном результате реакции, тогда как при отрицательном результате свечение отсутствует.

На следующем этапе сравнивали эффективность LAMP-РВ-амплификации с красителем SYTO-82 и разными наборами праймеров: ЕН1, КН1, ЕН2, КН2. На основе LAMP-РВ-анализа контрольных образцов ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2 было определено среднее значение *Tt*. Для ВПГ-1 с праймерами ЕН1 оно составило $8,17 \pm 0,09$ мин, с праймерами КН1 – $20,3 \pm 0,3$ мин (разница – 12,1 мин; $p < 0,0001$). Для ВПГ-2 с праймерами ЕН2 – $27 \pm 0,5$ мин, с праймерами КН2 – $37,03 \pm 2,1$ мин (разница – 10 мин; $p < 0,05$). В дальнейшей работе использовали только праймеры ЕН1 и ЕН2, позволившие на 10–12 мин сократить время выявления вирусной ДНК, и, следовательно, обеспечившие большую эффективность амплификации. Краситель SYTO-82 обеспечивал высокую эффективность разгорания флуоресцентного сигнала со значениями отношения сигнал–фон, достигающими 13–18 (**рис. 3**).

Для определения влияния температурного режима на эффективность амплификации была проведена LAMP-РВ при различной температуре – от 57 до 67 °С с шагом 0,85 °С. Чёткой корреляции между температурой амплификации и *Tt* не прослеживалось, однако отмечена тенденция к положительному влиянию повышения температуры на эффективность амплификации.

С целью определения аналитической чувствительности LAMP-РВ были проанализированы последовательные разведения образцов ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2. Аналитическая чувствительность реакции LAMP-РВ с праймерами (ЕН1, ЕН2) была сопоставима с чувствительностью ПЦР-РВ и составила примерно 10^3 копий/мл. При этом время выявления герпесвирусной ДНК на пределе чувствительности составляло для LAMP-РВ 25–30 мин, тогда как для ПЦР-РВ – 75–80 мин. Таким образом, в реакции LAMP-РВ ответ может быть получен в 2,5–3 раза быстрее, чем в ПЦР-РВ.

Пробоподготовку клинических образцов для LAMP-диагностики проводили с по-

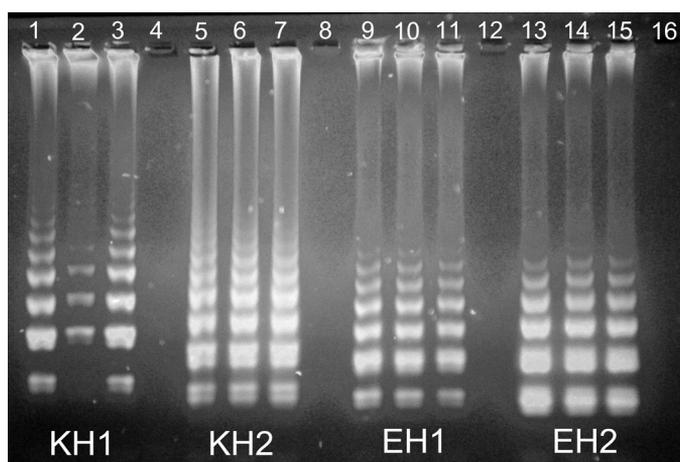


Рис. 1. Электрофоретический анализ LAMP-ампликонов в 1,5% агарозном геле.

Дорожки: 1–3 – ДНК ВПГ-1 с праймерами KH1; 5–7 – ДНК ВПГ-1 с праймерами KH2; 9–11 – ДНК ВПГ-2 с праймерами EH1; 13–15 – ДНК ВПГ-2 с праймерами EH2.

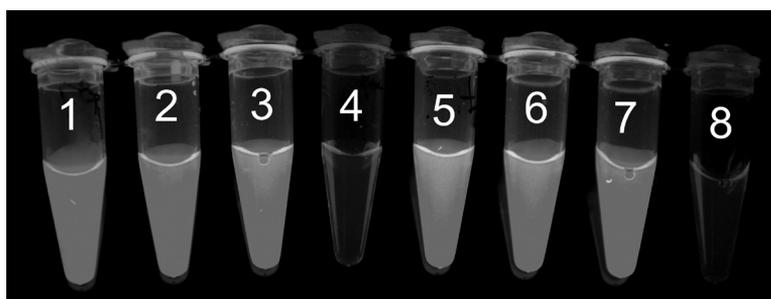


Рис. 2. Визуальная детекция LAMP-ампликонов.

Пробирки: 1–3 – ДНК ВПГ-1; 4 – отрицательный контроль; 5–7 – ДНК ВПГ-2; 8 – отрицательный контроль.

мощью экспресс-набора «Мультиген-Реалекс» («Генлаб», Россия), рекомендованного производителем для ПЦР-диагностики. Этот набор очень прост в использовании и позволяет проводить пробоподготовку быстро – в течение 20 мин. Выделение ДНК происходит за счёт лизирующего реагента и сорбента, связывающего белки и низкомолекулярные компоненты клеток, благодаря чему они выпадают в осадок, тогда как ДНК остаётся в растворе. Выделенная ДНК используется без дополнительной очистки, что может стать причиной наличия в растворе ингибиторов ферментативных реакций. В нашей работе признаков ингибирования реакции LAMP-РВ не выявлено.

При LAMP-анализе клинических образцов, содержащих ДНК ВПГ ($n = 44$), было выявлено два несовпадения с данными ПЦР-РВ. Таким образом, диагностическая чувствительность LAMP составила 96%. При LAMP-анализе образцов, не содержащих ДНК ВПГ ($n = 43$), ложноположительных результатов не выявлено, диагностическая специфичность метода составила 100%. Также не было выявлено перекрёстных реакций с другими герпесвирусами человека (вирус Эпштейна–Барр, цитомегаловирус, вирус герпеса 6-го типа), присутствующими в ряде клинических образцов.

Обсуждение

Наиболее часто в диагностике герпесвирусных заболеваний используется метод ПЦР, отличающийся высокой чувствительностью и специфичностью [2]. Метод ПЦР-

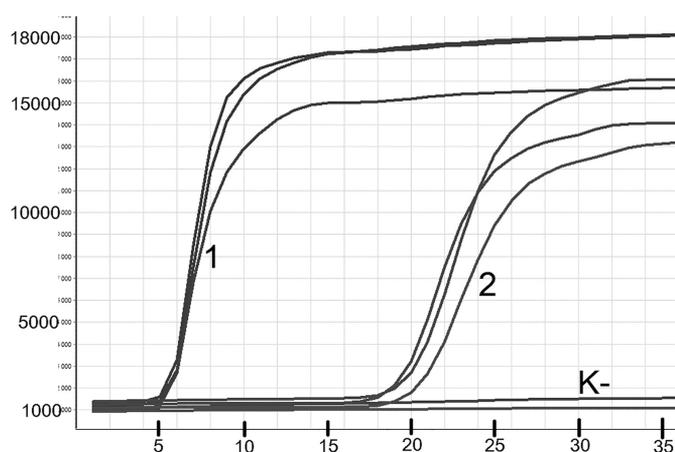


Рис. 3. Выявление ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2 наборами праймеров EN1 и EN2 в реакции LAMP-PB.

1 – ДНК ВПГ-1, праймеры EN1; 2 – ДНК ВПГ-2, праймеры EN2; К- – отрицательный контроль.
По оси абсцисс – время, мин; по оси ординат – относительные единицы флуоресценции.

PB даёт надёжный результат, но требует относительно долгого времени ожидания ответа, особенно в случаях, когда необходимо доставить образец в удалённую лабораторию. Существенным недостатком метода ПЦР является сложность его применения вне специализированной лаборатории – на месте лечения или в отдалённых от лаборатории населённых пунктах. Экспресс-методы иммунохроматографии или латекс-агглютинации очень просты и удобны в применении и позволяют быстро получить ответ – в течение 10–15 мин, однако обладают недостаточной чувствительностью при выявлении герпесвирусного антигена.

Метод LAMP-PB имеет высокие, сопоставимые с ПЦР-PB чувствительность и специфичность, но при этом позволяет получать ответ в 2,5–3 раза быстрее. Одним из важных факторов высокой эффективности амплификации и достижения максимальной аналитической чувствительности LAMP-PB является использование «петлевых» праймеров. Стандартный набор праймеров для постановки реакции LAMP состоит из четырёх олигонуклеотидов: пары внутренних (FIP и VIP) и пары наружных (F3 и B3). Однако в работах Y. Enomoto и соавт. [7] и H. Kaneko и соавт. [8] была использована дополнительная пара так называемых петлевых праймеров (LPF и LPB), обеспечивающих повышение эффективности амплификации [9]. В специальном эксперименте мы показали, что удаление из состава реакционной смеси петлевых праймеров более чем на полчаса увеличивает значение Tt.

Использование интеркалирующих красителей ДНК является эффективным подходом, позволяющим проводить не только визуальную детекцию продуктов LAMP, но также и флуориметрическую детекцию «по конечной точке» или в режиме реального времени [10]. В настоящей работе при детекции результатов LAMP-PB с красителем SYTO-82 было отмечено высокое отношение сигнал–фон, достигающее значений 13–18, что свидетельствует о высокой эффективности амплификации и гарантирует надёжную интерпретацию результата. Важно отметить, что детекция результатов LAMP-PB не требует открывания пробирок, что минимизирует риск получения ложноположительных результатов в результате контаминации реакционных смесей ампликонами. Определение в LAMP-PB значения Tt позволяет также оценивать вирусную нагрузку в исследуемых образцах.

Реакция LAMP проходит при постоянной температуре за счёт использования ДНК-полимеразы термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus* (Bst ДНК-полимераза), обладающей 5'-3'-ДНК-полимеразной активностью, способностью к заме-

щению (вытеснению) цепей ДНК и без 5'-3'-экзонуклеазной активности. Благодаря этому данный метод не требует сложного и дорогого оборудования и позволяет использовать портативные анализаторы (весом менее 2 кг), включающие твердотельный термостат, оптический блок, встроенный или внешний компьютер.

Заключение

Метод LAMP-PB с красителем SYTO-82 позволяет выявлять в клиническом материале ДНК ВПГ с чувствительностью и специфичностью, сопоставимой с ПЦР-PB. Вместе с тем он обладает рядом преимуществ, которые открывают перспективы разработки на его основе наборов реагентов для диагностики инфекционных заболеваний на месте оказания медицинской помощи. Простая пробоподготовка и изотермические условия реакции LAMP-PB позволяют проводить её с помощью портативных приборов и минимального набора инструментов, при этом продолжительность реакции LAMP-PB в 2,5–3 раза меньше, чем у ПЦР-PB. Краситель SYTO-82 не ингибирует реакцию LAMP и обеспечивает хороший прирост флуоресценции, что позволяет надёжно интерпретировать результат. Одним из факторов, ограничивающих применение метода в условиях России, является отсутствие отечественных портативных термостабируемых флуориметров.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4-9 см. REFERENCES)

1. Половцева Т. В., Каражас Н.В., Калугина М.Ю., Мамедова Е.А., Финогенова Н.А., Лаврентьева И.Н. Диагностика герпесвирусной инфекции у детей раннего возраста. *Детские инфекции*. 2012; 11(2): 51-3.
2. Сижажева А.М., Сижажева А.Л. Лабораторная диагностика герпесвирусной инфекции методом ПЦР. *Инновационная наука*. 2015; (12-2): 286-9.
3. Хрянин А.А. Герпес под подушкой. Распространённость вируса простого герпеса в российской популяции: многолетний мониторинг. *Status Praesens*. 2013; 6(17): 69-76.
10. Петруша О.А., Черниченко Т.Л., Кофиади И.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Эффективность метода петлевой изотермической амплификации с флуоресцентной детекцией в диагностике парвовирусного энтерита у плотоядных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 1(1): 90-5.

REFERENCES

1. Polovtseva T. V., Karazhas N.V., Kalugina M. Yu., Mamedova E. A., Finogenova N. A., Lavrent'eva I. N. Diagnosis of herpes virus infection in young children. *Detskie infektsii*. 2012; 11(2): 51-3. (in Russian)
2. Sizhazheva A. M., Sizhazheva A. L. Laboratory diagnosis of herpes virus infection by PCR. *Innovatsionnaya nauka*. 2015; (12-2): 286-9. (in Russian)
3. Khryanin A. A. Herpes under the pillow. The prevalence of herpes simplex virus in the Russian population: long-term monitoring. *Status Praesens*. 2013; 6(17): 69-76. (in Russian)
4. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., et al. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(12): E63. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
5. Oscorbin I. P., Belousova E. A., Zakabunin A. I., Boyarskikh U. A., Filipenko M. L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques*. 2016; 61(1): 20-5. Doi: <https://doi.org/10.2144/000114432>
6. Namvar L., Olofsson S., Bergström T., Lindh M. Detection and typing of Herpes Simplex virus (HSV) in mucocutaneous samples by TaqMan PCR targeting a gB segment homologous for HSV types 1 and 2. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43(5): 2058-64. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2058-2064.2005>
7. Enomoto Y., Yoshikawa T., Ihira M., Akimoto S., Miyake F., Usui C., et al. Rapid Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infection by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43(2): 951-5. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.951-955.2005>
8. Kaneko H., Iida T., Aoki K., Ohno S., Suzutani T. Sensitive and Rapid Detection of Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43(7): 3290-6. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3290-3296.2005>
9. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes*. 2002; 16(3): 223-9. Doi: <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
10. Petrusha O. A., Chernichenko T. L., Kofiadi I. A., Zverev V. V., Fayzuloev E. B. Effectiveness of the method of loop isothermal amplification with fluorescence detection in the diagnosis of parvovirus enteritis in carnivores. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 1(1): 90-5. (in Russian)

Поступила 27.08.19

Принята в печать 24.09.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Ларионова Н.В., Киселёва И.В., Руденко Л.Г.

ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА ПО ПРИЗНАКУ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ТЕМПЕРАТУРЕ РЕПРОДУКЦИИ

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 196376, г. Санкт-Петербург, Россия

Введение. Оценка способности вирусов гриппа к репродукции при температурных режимах за пределами оптимальных значений приближает нас к пониманию закономерностей их эволюционной изменчивости. Температурный диапазон репродукции эпидемических вирусов также является важным показателем для выбора рациональной стратегии получения аттенуированных реассортантов для живой гриппозной вакцины.

Цель исследования – ретроспективный анализ биологических свойств вирусов гриппа из различных пандемических и эпидемических циклов на основе их способности к репликации при температурах за пределами оптимальных значений.

Материалы и методы. Исследовали 234 штамма вирусов гриппа А и В человека, вызвавших эпидемии в XX–XXI веках. Инфекционную активность вирусов при разных температурах инкубации определяли в развивающихся куриных эмбрионах. Температурочувствительность и холодоустойчивость репродукции вирусов оценивали по разнице инфекционных титров при оптимальной и повышенной либо пониженной температуре инкубации.

Результаты. Данные ретроспективного исследования свидетельствуют о том, что диапазон чувствительности к температуре репродукции в ходе естественного дрейфа возбудителей гриппа А и В подвержен закономерной изменчивости, которая имеет циклический характер.

Обсуждение. Для оценки эволюции и эпидемического потенциала вирусов гриппа важно не только регистрировать изменение их антигенных свойств, но и принимать во внимание показатель температурочувствительности репродукции. Оба эти свойства вносят вклад в проявление вирулентности вируса. Продолжительная циркуляция температурочувствительных вирусов может быть предпосылкой появления кардинально нового дрейфового варианта и даже шифта.

Заключение. Анализ изменчивости биологических свойств вирусов гриппа приближает к постижению возможных путей их эволюции, что способствует разработке рациональных методов предупреждения распространения вирусов и вызываемой ими заболеваемости.

Ключевые слова: эволюция вирусов гриппа; температурочувствительность репродукции (*ts-фенотип*); холодоустойчивость репродукции (*ca-фенотип*).

Для цитирования: Ларионова Н.В., Киселева И.В., Руденко Л.Г. Эволюция вирусов гриппа по признаку чувствительности к температуре репродукции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6):47-55.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-47-55>

Larionova N.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G.

EVOLUTION OF INFLUENZA VIRUSES BASED ON SENSITIVITY TO TEMPERATURE OF REPLICATION

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine», Saint Petersburg, 196376, Russia

Introduction. The assessment of the ability of influenza viruses to replication at temperature conditions beyond optimal values approaches us to understanding the laws of their evolutionary variability. The temperature range for the reproduction of epidemic viruses is also an important indicator for choosing a rational strategy for producing attenuated reassortants for a live influenza vaccine.

The **purpose** of the study is a retrospective analysis of the biological properties of influenza viruses from various pandemic and epidemic cycles based on their ability to replicate at temperatures beyond optimal values.

Для корреспонденции: Ларионова Наталья Валентиновна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 196376, г. Санкт-Петербург.
E-mail: nvlarionova@mail.ru

Materials and methods. We studied 234 strains of human influenza A and B viruses that caused epidemics in the 20th – 21st centuries. The infectious activity of viruses at different incubation temperatures was determined in developing chicken embryos. The temperature sensitivity and cold resistance of viruses replication were estimated as a difference of infectious titers at the optimum and raised or lowered incubation temperatures.

Results. Data from a retrospective study indicate that the range of sensitivity to replication temperature during the natural drift of influenza A and B pathogens is subject to regular variability that has a cyclic character.

Discussion. To assess the evolution and epidemic potential of influenza viruses, it is important not only to register a change in their antigenic properties but also to take into account the temperature sensitivity of the reproduction. Both of these properties contribute to the manifestation of the virulence of the virus. Prolonged circulation of temperature-sensitive viruses can be a prerequisite for the appearance of a radically new drift variant and even shift. **Conclusion.** The analysis of the variability of the biological properties of influenza viruses approaches to the comprehension of possible ways of their evolution, that contributes to the development of rational methods for preventing the spread of viruses and the incidence caused by them.

Keywords: *evolution of influenza viruses; temperature sensitivity of reproduction (ts phenotype); cold resistance of reproduction (ca phenotype).*

For citation: Larionova N.V., Kiseleva I.V., Rudenko L.G. Evolution of influenza viruses based on sensitivity to temperature of replication. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6):47-55. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-47-55>

For correspondence: Natalie V. Larionova, Doctor of Biological Sciences, Leading Research Associate of the Department of Virology FSBSI «Institute of Experimental Medicine», Saint Petersburg, 196376, Russia. E-mail: nvlarionova@mail.ru

Information about authors:

Larionova N.V., <http://orcid.org/0000-0003-1171-3383>

Kiseleva I.V., <http://orcid.org/0000-0002-3892-9873>

Rudenko L.G., <http://orcid.org/0000-0002-0107-9959>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 21 November 2018

Accepted 12 March 2019

Введение

Движущей силой эволюции эпидемических вирусов гриппа является способность противостоять нейтрализующему действию не только специфических факторов иммунитета, но и неспецифическим воздействиям, подавляющим вирус. Мутации, направленные на воспроизведение (самосохранение), способны приводить к возникновению вирионов с изменёнными биологическими свойствами, что может проявляться новой симптоматикой заболеваний.

Важной, но малоизученной характеристикой вирусов гриппа, связанной с познанием закономерностей их эволюционной изменчивости и патогенности, является способность к репродукции при температурных режимах за верхним и нижним пределами оптимальных значений. Экспериментально выявленный диапазон температур, допустимый для репродукции вирусов гриппа А в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), составляет 25–40 °С при температурном оптимуме 32–36 °С, а вирусов гриппа В – 25–38 °С при оптимуме 32–35 °С.

На начальном этапе изучения вирусов гриппа сформировалось однозначное представление, просуществовавшее до середины 1970-х годов, о том, что все циркулирующие вирусы гриппа человека, включая возбудителей эпидемий А(Н1N1) 1930–1940-х годов, А(Н2N2), родоначальников пандемии А(Н3N2) и вирусы гриппа В, обладают

высокой репродуктивной активностью при повышенных температурах [1–6]. Устойчивость к превышающим оптимальные значения температурам позволяет вирусам проникать в нижние отделы респираторного тракта человека, обеспечивает их вирулентность и способность успешно противостоять защитным факторам организма [4].

Однако позднее среди циркулирующих вирусов гриппа была выявлена достаточно широкая вариабельность по признаку температурочувствительности/устойчивости репродукции (*ts/non-ts*-фенотип) [4, 7]. Наряду с варьирующими по температурочувствительности вирусами были обнаружены штаммы, отличающиеся по вирулентности [7].

Температурочувствительные мутанты вируса гриппа являются объектом пристального интереса при разработке реассортантных аттенуированных штаммов для живой гриппозной вакцины. Полученные лабораторным путем *ts*-вирусы всегда аттенуированы для человека. Доноры аттенуации – адаптированные к низким температурам инкубации лабораторные *ts*-мутанты – лежат в основе метода создания аттенуированных реассортантных вакцинных штаммов [8–11].

Факт обнаружения природного температурочувствительного вируса гриппа впервые отмечен в 1973 г., когда из популяции температуроустойчивого эпидемического вируса А(Н3N2) при культивировании в РКЭ без специальной адаптации был выделен *ts*-клон [12]. Следом за этим исследованием факты циркуляции штаммов серотипа А(Н3N2), характеризующихся несвойственной для эпидемических вирусов прежних лет температурочувствительностью репродукции при 40 °С, были обнаружены в период эпидемии 1975/76 гг. [13, 14]. В эпидемический сезон 1977/78 гг. 17 из 26 исследованных изолятов серотипа А(Н1N1) и 2 из 11 изолятов А(Н3N2) имели *ts*-фенотип. Вирусы, изолированные в одном городе и даже от одного индивидуума, значительно варьировали по признаку температурочувствительности. Вирус А(Н1N1) со сниженной до 38 °С способностью к репродукции в культуре клеток MDCK был к тому же частично аттенуирован для человека. *Ts*-мутант с ограничительной температурой репродукции 37 °С оказался ещё более аттенуированным в тесте на волонтерах. По мнению исследователей, появление в природе вирусов с *ts*-фенотипом, наряду с *non-ts*, коррелирует с наблюдением о том, что вирусы варьирующей вирулентности естественно социркулируют в сообществе [14].

Дальнейшие исследования отличающихся по температурочувствительности штаммов на серонегативных к этим возбудителям волонтерах подтвердили, что температурочувствительные вирусы А(Н1N1), у которых ограничительная температура репродукции не превышала 38 °С, вызывали лёгкие инфекции, тогда как изолят с предельно допустимой температурой репродукции 39 °С был значительно более реактогенным. Авторы сделали вывод о широком распространении в популяции различающихся по температурочувствительности вирусов гриппа и, вероятно, характеризующихся различной вирулентностью [14].

Пропорция *ts*-вирусов неуклонно возрастала с годами наблюдения. Так, в 1949–1957 гг. *ts*-вирусы составляли 8,3% всех исследованных изолятов серотипа А(Н1N1), тогда как в 1979–1980 гг. 82,4% популяции вирусов Н3N2 характеризовалось температурочувствительностью [14].

Нами проведён ретроспективный анализ эпидемических вирусов гриппа А и В человека, выделенных в разных регионах, в различные эпидемические и пандемические циклы, по способности к репродукции в РКЭ при температурах за пределами оптимальных значений с целью проследить эволюцию признака температурочувствительности.

Материалы и методы

Эталонные эпидемические штаммы вирусов гриппа А (Н1N1, Н2N2, Н3N2) и В, изоляты из эпидемий разных лет и пандемические вирусы получены из коллекций Центра по контролю и предупреждению заболеваемости (CDC, США), Национального института биологических стандартов и контроля (NIBSC, Великобритания), отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «Институт экспериментальной

медицины» (Россия), ФГБУ «НИИ гриппа» им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (Россия). Все вирусы прошли ограниченное число пассажей в РКЭ.

Инфекционную активность вирусов оценивали при репродукции в РКЭ [15] и выражали в \lg ЭИД₅₀/мл.

Для характеристики чувствительности вирусов к температуре инкубации использовали показатель RCT (reproductive capacity at different temperatures), который представляет собой разницу в инфекционных титрах при оптимальной и субоптимальной температуре инкубации.

Температурочувствительность вирусов гриппа оценивали по разности инфекционных титров при оптимальной (32–33 °С) и повышенной до 40 °С (для вирусов гриппа А) либо до 37–38 °С (для вирусов гриппа В) температуре. Вирусы считали температурочувствительными, т.е. проявляющими *ts*-фенотип (*temperature sensitive*), при RCT > 4,5 \lg ЭИД₅₀/мл, или температуроустойчивыми (*non-ts*-фенотип), при RCT < 3,5 \lg ЭИД₅₀/мл. При RCT 3,5–4,5 \lg ЭИД₅₀/мл вирусы оценивали, как характеризующиеся $\pm ts$ -фенотипом.

Холодоустойчивость вирусов гриппа оценивали по разности инфекционных титров при оптимальной (32–33 °С) и пониженной до 25 °С температуре инкубации. Вирусы считали холодоустойчивыми т.е. проявляющими *ca* (*cold adapted*) фенотип, при RCT₂₅ < 3,5 \lg ЭИД₅₀/мл или холодочувствительными (*non-ca* фенотип), при RCT₂₅ > 4,5 \lg ЭИД₅₀/мл. При RCT₂₅ 3,5–4,5 \lg ЭИД₅₀/мл вирусы оценивали, как обладающие $\pm ca$ -фенотипом.

Результаты

Изучен фенотип 234 штаммов эпидемических вирусов гриппа А и В человека: 65 – А(Н1N1), 23 – А(Н2N2), 84 – А(Н3N2) и 62 – В.

Результаты ретроспективного исследования вирусов гриппа человека по признаку температурочувствительности репродукции свидетельствуют о том, что температурный диапазон репродукции подвержен значительной изменчивости в ходе естественного дрейфа возбудителей гриппа А (Н1N1, Н2N2 и Н3N2) и В («ранние» вирусы, вирусы линий В/Виктория/2/87- и В/Ямагата/16/88-подобных).

На **рис. 1** в качестве примера представлена характеристика эволюции признака температурочувствительности репродукции в РКЭ вирусов гриппа А(Н3N2) при 40 °С. Возбудитель пандемии А(Н3N2) А/Гонконг/1/68 характеризовался температуроустойчивостью репродукции при 40 °С. Его дрейфовые варианты сохраняли *non-ts*-фенотип до 1975 г. 61% исследованных изолятов 1976 г. отличались температурочувствительностью, как и их эталонный представитель А/Москва/406/76, тогда как 22 и 17% обладали соответственно $\pm ts$ - и *non-ts*-фенотипом.

Эталонный вирус эпидемии 1977 г. А/Техас/1/77 был температуроустойчив, но уже в 1979 г. он уступил место чувствительному к повышенной температуре инкубации вирусу А/Бангкок/1/79 и его антигенной разновидности А/Бангкок/2/79. Температурочувствительные вирусы А(Н3N2) преобладали в циркуляции до 1984 г. 73% исследованных представителей этого периода характеризовались *ts*-фенотипом, включая эталонный вирус А/Филиппины/2/82, остальные 27% имели $\pm ts$ -фенотип.

В 1985–1986 гг. среди циркулирующих штаммов наблюдалась гетерогенность по анализируемому признаку. Гетерогенность по *ts*-фенотипу соответствовала антигенной гетерогенности циркулировавших в этот временной интервал вирусов: наряду с температурочувствительными вирусами, такими как эталонные А/Миссисипи/1/85 и А/СССР/2/85, встречались изоляты предшествующих эпидемических циклов, отличающиеся по *ts*-фенотипу и близкородственные А/Техас/1/77, А/Бангкок/1/79 и А/Филиппины/2/82 [16].

В 1987–1995 гг. продолжилась циркуляция температурочувствительных вирусов, включавших эталонные штаммы А/Сычуань/2/87, А/Шангдонг/9/93, А/Иоганнесбург/33/94, А/Нанчанг/933/95.

В 1997 г. им на смену пришли устойчивые к повышенной температуре штаммы,

циркуляция которых прослежена нами до 1999 г. (представители – эталонные вирусы А/Сидней/5/97, А/Панама/2007/99, А/Москва/10/99).

С 2000 по 2004 г. попеременно и одновременно циркулировали вирусы, различающиеся по температурочувствительности.

Подобная картина наблюдалась также среди вирусов гриппа А других пандемических циклов и у вирусов гриппа В. Начало пандемического цикла у вирусов гриппа А(H2N2), у ранних представителей вирусов гриппа А(H1N1) и В неизменно характеризовалось циркуляцией температуроустойчивых возбудителей. Дальнейшая эволюция приводила к попеременной циркуляции *non-ts*- и *ts*-вирусов. Ход эволюции вирусов гриппа по температурной характеристике репродукции представляется как циклическая смена циркулирующих фенотипов: *non-ts* → *non-ts* и *ts* → *ts* → *ts* и *non-ts* → *non-ts* и т.д. (рис. 2).

Каждый сероподтип вируса гриппа А(H1N1 и H3N2) и обе линии вируса гриппа В (В/Виктория и В/Ямагата) прошли несколько циклов волнообразного изменения признака температурочувствительности. Даже вирусы «азиатского» гриппа А(H2N2), несмотря на непродолжительный, всего 11-летний период циркуляции, характеризовались эволюционным переходом от *non-ts*- к *ts*-фенотипу.

Характеризуя температуроустойчивость репродукции у вирусов гриппа В разных линий, можно сделать вывод о том, что при общей тенденции к снижению порога устойчивости к повышенной температуре инкубации, представители линии В/Виктория чаще обладали более выраженным *non-ts*-фенотипом по сравнению с вирусами линии В/Ямагата, но уступали по этому признаку стабильно температуроустойчивым «ранним», циркулировавшим до эволюционного разделения на две линии вирусам гриппа В (см. таблицу).

Сравнительный анализ температуроустойчивости репродукции эпидемических штаммов вируса гриппа В при 37 °С, циркулировавших с 1940 г. по настоящее вре-

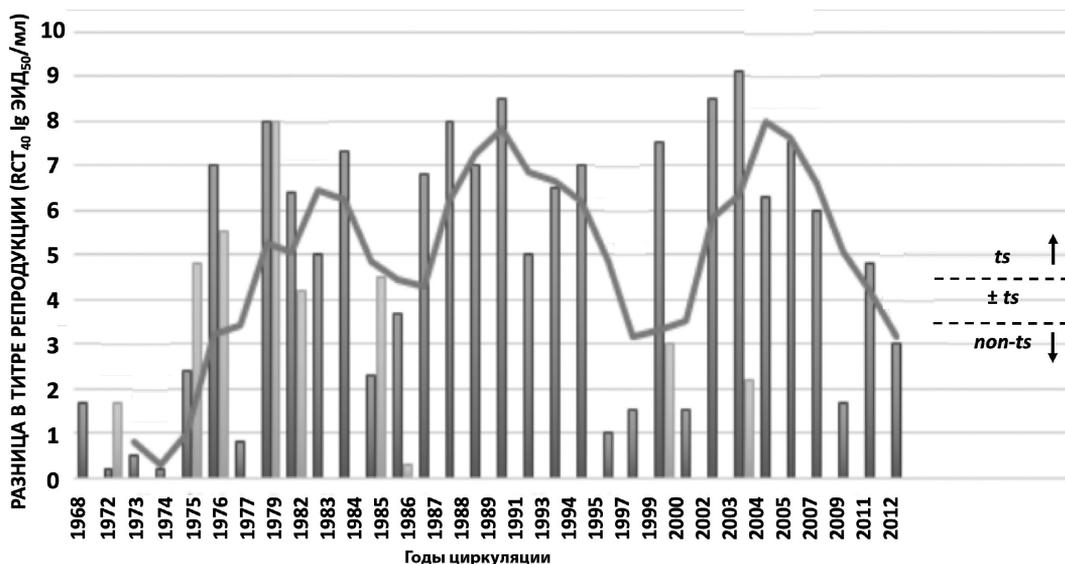


Рис. 1. Эволюция вирусов гриппа А (H3N2) по признаку температурочувствительности репродукции в развивающихся куриных эмбрионах/

По оси абсцисс – годы циркуляции возбудителя, по оси ординат – разница в инфекционных титрах репродукции вируса при 33 и 40 °С, выраженная в lg ЭИД₅₀/мл (RСТ₄₀). Кривая линия демонстрирует тенденцию к изменчивости исследуемого признака. Направление стрелки вверх – тенденция к усилению температурочувствительности вирусов, вниз – температуроустойчивости.

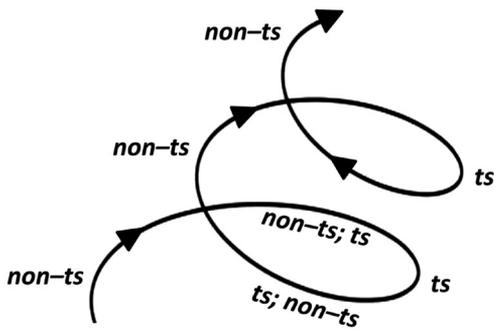


Рис. 2. Схематическое изображение циклической смены фенотипов циркулирующих вирусов гриппа А и В по признаку температурочувствительности репродукции.

вали вирусы, обладающие *ts*- и *non-ts*-фенотипом, можно рассматривать как переходный период от температурорезистентных к температурочувствительным вирусам.

Со временем варьирующие по чувствительности к температуре репродукции вирусы окончательно вытеснились температурочувствительными (рис. 3, см. таблицу). Примечательно, что накануне пандемии А(Н1N1)рdm, с 2005 по 2009 г. включительно, циркулирующие штаммы сероподтипа А(Н3N2) так же, как вирусы гриппа В, характеризовались чувствительным к повышению температуры фенотипом. Такая же тенденция отмечена и для вирусов А(Н1N1), среди которых с 2006 г. выделялись исключительно температурочувствительные. Они циркулировали вплоть до 2009 г., когда их вытеснил стремительно распространившийся и вызвавший новую пандемию высоко-температуроустойчивый вирус А/Калифорния/07/09 (Н1N1)рdm.

Пандемический вирус А/Калифорния/07/09 (Н1N1)рdm открыл очередной цикл циркуляции *non-ts*-вирусов – он обладает высокой репродуктивностью при 40 °С ($RCT_{40} = 1,2 \lg ЭИД_{50}/мл$). Антигенно близкородственные А(Н1N1)рdm09 вирусы, перейдя в разряд сезонных возбудителей, сохраняют температуроустойчивый фенотип по настоящее время.

Температуроустойчивые вирусы вновь появились и среди вирусов А(Н3N2), начиная с А/Виктория/361/11, и среди вирусов гриппа В: В/Массачусетс/2/12 (линия В/Ямагата), В/Техас/02/13 (линия В/Виктория).

Нами отмечены также случаи циркуляции эпидемических вирусов А и В, обладающих устойчивостью к пониженной до 25 °С температуре инкубации ($RCT_{25} \leq 3,5 \lg ЭИД_{50}/мл$). Такой характеристикой обладали, например, вирусы А/Пекин/262/95 (Н1N1), А/Перт/13/95(Н1N1), А/Иоханнесбург/82/96 (Н1N1), А/Панама/2007/99 (Н3N2), В/Джиллин/20/03, В/Техас/06/11.

Обсуждение

Потенциальная способность вирусов гриппа А человека к репродукции при повышенной до 39–40 °С температуре, вероятно, обусловлена происхождением по крайней

мя, позволяет более детально проследить эволюцию *ts*-признака, и так же, как у вирусов гриппа А, отметить существование цикличности. Так, вирусы, выделенные в 1940–1970-х годах, в подавляющем большинстве представляли собой температуроустойчивые варианты, на смену им пришли варьирующие по *ts*-фенотипу штаммы линии В/Виктория, их сменили тоже варьирующие по температурочувствительности вирусы линии В/Ямагата.

После 2002 г. все циркулирующие В/Ямагата-подобные вирусы были температурочувствительными. Также температурочувствительностью характеризовались все циркулировавшие с 2005 г. вирусы линии В/Виктория. Промежуток времени, когда одновременно циркулиро-

Эволюция антигенных линий вирусов гриппа В по признаку температуроустойчивости репродукции (по данным определения инфекционной активности в развивающихся куриных эмбрионах)

<i>non-ts</i> -фенотип при 38 °С	<i>non-ts</i> фенотип при 37 °С
100% «ранних» вирусов гриппа В	100% «ранних» вирусов гриппа В
50% эталонных вирусов В/Виктория/2/87	71% эталонных вирусов В/Виктория/2/87
22% эталонных вирусов В/Ямагата/16/88 (± <i>ts</i> -фенотип – 22% эталонных вирусов В/Ямагата/16/88)	44% эталонных вирусов В/Ямагата/16/88

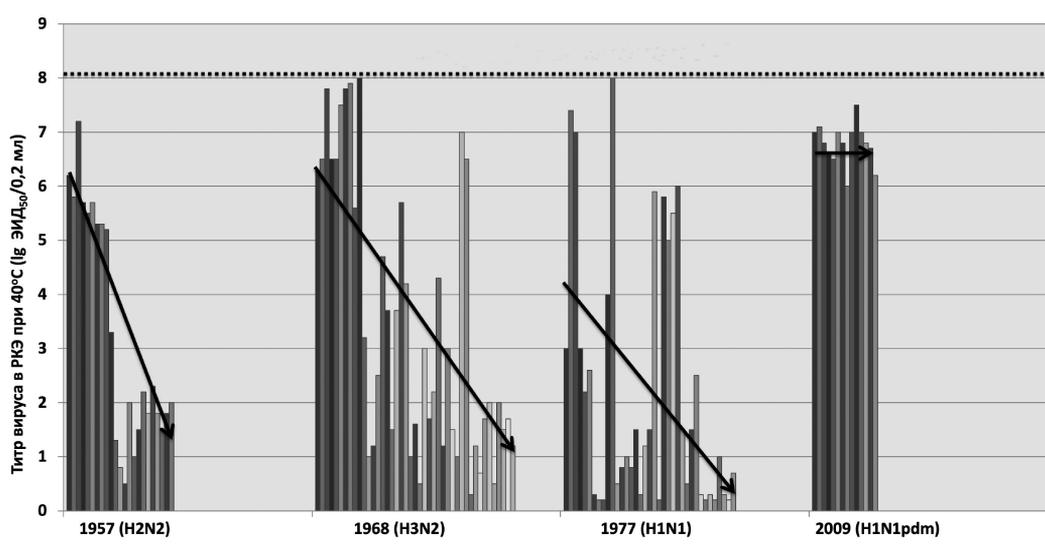


Рис. 3. Эволюция вирусов гриппа А разных пандемических циклов по признаку чувствительности к повышению температуры репродукции.

Стрелка демонстрирует тенденцию к изменению фенотипа вирусов по признаку температурочувствительности.

мере двух из трёх генов температурозависимого полимеразного комплекса от вирусов гриппа животных (птиц, свиней), у которых более высокая физиологическая температура тела (40–42 °С). При адаптации к человеку, вероятно, постепенно перенастраивается и температурный диапазон репродукции патогена. У вирусов гриппа В, имеющих антропонозный тропизм, максимально допустимая температура репродукции ниже (38 °С), хотя также подвержена циклическим изменениям.

Эпидемический потенциал вирусов, несомненно, обусловлен новизной для иммунной системы человека. Однако с ростом популяционного иммунитета к циркулирующим вирусам в их среде, вероятно, происходит эволюционный отбор в пользу обладающих более высоким потенциалом вирулентности. Эволюция антигенных и биологических свойств вирусов гриппа, по-видимому, взаимосвязанные процессы, при этом складывается мнение, что темпы эволюции температурочувствительности могут опережать антигенную изменчивость. Такую картину мы наблюдали при изучении биологических характеристик изолятов антигенно однородных вирусов (данные не представлены).

Если температурочувствительность циркулирующих вирусов гриппа опосредованно указывает на снижение вирулентности, а вместе с ростом в обществе иммунной прослойки снижает их эпидемические потенции, то факт стабильной циркуляции в течение нескольких лет температурочувствительных вирусов можно рассматривать как предпосылку появления кардинально нового антигенного варианта – шифтового или антигенно отдалённого от прежде циркулирующих вирусов дрейфового. Это предположение подтверждается длительной социркуляцией температурочувствительных вирусов гриппа А (H1N1), А(H3N2) и В перед началом пандемии 2009 г.

Роль выявленной нами холодоустойчивости некоторых природных изолятов и даже эталонных вирусов гриппа не исследована, однако сопоставление с селективно полученными *ts/ca*-донорами аттенуации А и В для живой гриппозной вакцины [8] даёт основания полагать, что *ca*-фенотип «диких» вирусов, особенно в сочетании с температурочувствительностью, является опосредованным указанием на их естественную аттенуацию (на снижение их вирулентности).

Закключение

Эволюцию вируса гриппа следует рассматривать не только с позиции новизны поверхностных антигенов, но и принимать во внимание изменение его биологических признаков, таких как температурочувствительность репродукции. Есть основания полагать, что с учетом *ts*-фенотипа циркулирующих вирусов гриппа можно точнее оценивать эпидемические потенциалы вновь появляющихся штаммов, заблаговременно формировать более обоснованный прогноз ожидаемой заболеваемости гриппом и даже прогнозировать возможность появления антигенно обновленного возбудителя.

Анализ изменчивости биологических свойств вирусов гриппа приближает нас к пониманию возможных путей их эволюции, что способствует разработке рациональных методов предупреждения распространения вирусов и вызываемой ими заболеваемости.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5-7, 10-12, 14, 15 см. REFERENCES)

1. Ермаченко Т.А., Горев Н.Е., Медведева Т.Е. Характеристика реассортантов вируса гриппа А, полученных при скрещивании эпидемических вирусов гриппа А (H3N2) 1985-86 годов с холодоадаптированным донором аттенуации А/Ленинград/134/57/17 (H2N2). В кн.: Киселев О.И., ред. *Генетическая инженерия иммуномодуляторов и вакцинных препаратов*. Ленинград; 1989: 114-27.
2. Медведева Т.Е., Иванова Н.А. Анализ температурочувствительных мутаций в геноме эпидемических штаммов вируса гриппа А. В кн.: Смородинцев А.А., ред. *Новое в эпидемиологии и профилактике вирусных инфекций*. Ленинград; 1986: 34-43.
3. Подчерняева Р.Я., Блинова В.К., Соколова Н.Н. *Изучение генетических признаков и генного состава у рекомбинантов вирусов гриппа. Молекулярная биология вируса гриппа и гепатита*. М.; 1982.
4. Полежаев Ф.И., Смородинцев А.А. Роль температурочувствительных мутантов в естественной эволюции вируса гриппа. *Вопросы вирусологии*. 1986; 31(2): 148-52.
8. Александрова Г.И., Климов А.И. *Живая вакцина против гриппа*. СПб.: Наука; 1994.
9. Смородинцев А.А. *Грипп и его профилактика*. Ленинград: Медицина; 1984.
13. Полежаев Ф.И., Александрова Г.И. Выделение температурочувствительных штаммов вируса гриппа в эпидемию, вызванную вирусом А/Виктория в 1975-1976 гг. *Вопросы вирусологии*. 1979; 24(4): 430.
16. Гринбаум Е.Б., Гордон М.А., Литвинова О.М. Этиологический надзор за гриппом в системе Всесоюзного центра по гриппу и ОРЗ. В кн.: Карпунин Г.И., ред. *Этиология и диагностика гриппа и ОРЗ*. Ленинград; 1986: 23-8.

REFERENCES

1. Ermachenko T.A., Gorev N.E., Medvedeva T.E. Characterization of the reassortants of influenza A virus obtained by crossing the epidemic influenza A(H3N2) viruses of 1985-86 with a cold-adapted attenuation donor A/Leningrad/134/57/17 (H2N2). In: Kiselev O.I., ed. *Genetic Engineering of Immunomodulators and Vaccines [Geneticheskaya inzheneriya immunomodulyatorov i vaksinnnykh preparatov]*. Leningrad; 1989: 114-27. (in Russian)
2. Medvedeva T.E., Ivanova N.A. Analysis of temperature-sensitive mutations in the genome of epidemic strains of influenza A. In: Smorodintsev A.A., ed. *New in the Epidemiology and Prevention of Viral Infections [Novoe v epidemiologii i profilaktike virusnykh infektsiy]*. Leningrad; 1986: 34-43. (in Russian)
3. Podchernyaeva R.Ya., Blinova V.K., Sokolova N.N. *The Study of Genetic Traits and Gene Composition in Recombinants of Influenza Viruses. Molecular Biology of Influenza Virus and Hepatitis [Izuchenie geneticheskikh znakov i gennogo sostava u rekombinantov virusov grippa. Molekulyarnaya biologiya virusa grippa i gepatita]*. Moscow; 1982. (in Russian)
4. Polezhaev F.I., Smorodintsev A.A. The role of temperature-sensitive mutants in the natural evolution of the influenza virus. *Voprosy virusologii*. 1986; 31(2): 148-52. (in Russian)
5. Herlocher M.L., Maassab H.F., Webster R.G. Molecular and biological changes in the cold-adapted "master strain" A/AA/6/60 (H2N2) influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90(13): 6032-6. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.6032>
6. Reeve P., Almond J.W., Felsenreich V., Pibermann M., Maassab H.F. Studies with a cold-recombinant A/Victoria/3/75 (H3N2) virus. I. biologic, genetic, and biochemical characterization. *J. Infect. Dis*. 1980; 142(6): 850-6. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/142.6.850>
7. Oxford J.S., Öberg B. *Conquest of Viral Disease: A Topical Review of Drug and Vaccines. Volume 1*. Amsterdam: Elsevier; 1985.
8. Aleksandrova G.I., Klimov A.I. *Live Influenza Vaccine [Zhivaya vaksina protiv grippa]*. St. Petersburg: Nauka; 1994. (in Russian)
9. Smorodintsev A.A. *Influenza and its Prevention [Gripp i ego profilaktika]*. Leningrad: Meditsina; 1984. (in Russian)
10. Maassab H. F., DeBorde D.C. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. *Vaccine*. 1985; 3(5): 355-69. Doi: [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(85\)90124-0](https://doi.org/10.1016/0264-410x(85)90124-0)

11. Martínez-Sobrido L., Peersen O., Nogales A. Temperature sensitive mutations in influenza A viral ribonucleoprotein complex responsible for the attenuation of the live attenuated influenza vaccine. *Viruses*. 2018; 10(560): 2-29. Doi: <https://doi.org/10.3390/v10100560>
12. Chu C.M., Tian S.F., Ren G.F., Zhang Y.M., Zhang L.X., Liu G.Q. Occurrence of temperature-sensitive influenza A viruses in nature. *J. Virol.* 1982; 41(2): 353-9.
13. Polezhaev F.I., Aleksandrova G.I. Isolation of temperature-sensitive strains of the influenza virus in the epidemic caused by the A/Victoria virus in 1975-1976. *Voprosy virusologii*. 1979; 24(4): 430. (in Russian)
14. 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(Pt. 2): 383-9. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-48-2-383>
15. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938; 27(3): 493-7.
16. Grinbaum, E.B., Gordon M.A., Litvinova O.M. Etiological surveillance of influenza in the system of the All-Union Center for Influenza and ARI. In: Karpukhin G.I., ed. *Etiology and Diagnosis of Influenza and Acute Respiratory Infections [Etiologiya i diagnostika grippa i ORZ]*. Leningrad; 1986: 23-8. (in Russian)

Поступила 21.11.18

Принята в печать 12.03.19

Крылова Н.В.¹, Ленёва И.А.², Федореев С.А.³, Эбралидзе Л.К.²,
Мищенко Н.П.³, Васильева Е.А.³, Фалынская И.Н.², Иунихина О.В.¹,
Лавров В.Ф.², Свитич О.А.²

АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ЭХИНОХРОМ А, В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 2-го ТИПА *IN VITRO* И *IN VIVO*

¹ ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова»,
690087, г. Владивосток, Россия;

² ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия;

³ ФГБНУ «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН,
690022, г. Владивосток, Россия

Целью работы было изучение активности эхинохрома А – нафтохиноидного пигмента из морских ежей и его композиции с антиоксидантами в отношении вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Штамм ВПГ-2 (G ATCC VR-734) выращивали на культуре клеток Vero. Цитотоксическую и анти-ВПГ-2 активность препаратов оценивали *in vitro* по жизнеспособности клеток и подавлению цитопатогенного действия вируса с помощью МТТ-анализа. Эффективность препаратов у мышей с генитальным герпесом оценивали, учитывая изменения их массы тела, средней продолжительности жизни и показателей вирусной нагрузки.

Результаты и обсуждение. Композиция антиоксидантов: эхинохрома А, аскорбиновой кислоты и α -токоферола (5 : 5 : 1) – демонстрировала более высокую противовирусную активность, чем один эхинохром А. Пероральное введение мышам композиции антиоксидантов предотвращало гибель 90% инфицированных ВПГ-2 животных и достоверно снижало вагинальную вирусную нагрузку. Противовирусная активность эхинохрома А и композиции антиоксидантов, вероятно, обусловлена как вирусингибирующей активностью препаратов, так и их антиоксидантными свойствами.

Заключение. Результаты исследования позволяют рассматривать эхинохром А и композицию антиоксидантов на его основе как перспективные лекарственные средства, обладающие противовирусными свойствами.

Ключевые слова: эхинохром А; композиция антиоксидантов; вирус простого герпеса 2-го типа; противовирусная активность.

Для цитирования: Крылова Н.В., Ленёва И.А., Федореев С.А., Эбралидзе Л.К., Мищенко Н.П., Васильева Е.А., Фалынская И.Н., Иунихина О.В., Лавров В.Ф., Свитич О.А. Активность препаратов, содержащих эхинохром А, в отношении вируса простого герпеса 2-го типа *in vitro* и *in vivo*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6):56-64.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-56-64>

Krylova N.V.¹, Leneva I.A.², Fedoreev S.A.³, Ebraldize L.K.², Mishchenko N.P.³,
Vasileva E.V.³, Falynskova I.N.², Iunikhina O.V.¹, Lavrov V.F.², Svitich O.A.²

ACTIVITY OF COMPOUNDS CONTAINING ECHINOCHROME A AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 *IN VITRO* AND *IN VIVO*

¹ G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russia;

² I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia;

³ G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok, 690022, Russia

The aim of the work was to study the activity of echinochrome A, a naphthoquinoid pigment from sea urchins, and its antioxidant composition against herpes simplex virus type 2 (HSV-2) *in vitro* and *in vivo*.

Для корреспонденции: Крылова Наталья Владимировна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, г. Владивосток. E-mail: krylovanatalya@gmail.com

Materials and methods. Strain HSV-2 (G ATCC VR-734) was grown in Vero cells. The cytotoxic and anti-HSV-2 activity of the compounds was assessed *in vitro* by the cell viability and by cytopathic effect inhibition of virus using MTT test. The efficacy of compounds in mice model of vaginitis caused by HSV-2 was determined by the average lifetime, body weight and viral load changes.

Results and discussion. The antioxidant composition (echinochrome A, ascorbic acid and α -tocopherol (5:5:1)), showed a higher antiviral efficacy than echinochrome A alone. Oral administration of the antioxidant composition protected 90% of the infected mice against death and reduced vaginal viral loads. The antiviral activity of echinochrome A and the antioxidant composition is probably due to the virus-inhibiting activity of the compounds and their antioxidant properties.

Conclusion. The results obtained allow considering the tested compounds as promising agents with antiviral properties.

Keywords: *echinochrome A; antioxidant composition; herpes simplex virus type 2; antiviral activity.*

For citation: Krylova N.V., Leneva I.A., Fedoreev S.A., Ebralidze L.K., Mishchenko N.P., Vasileva E.V., Falynskova I.N., Iunikhina O.V., Lavrov V.F., Svitich O.A. Activity of compounds containing echinochrome A against herpes simplex virus type 2 *in vitro* and *in vivo*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6):56-64. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-56-64>

For correspondence: Natalia V. Krylova, Dr. Sci. Biol., Lead Researcher of the Laboratory of Experimental Virology «G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology», G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russia. E-mail: krylovanatalya@gmail.com

Information about authors:

Krylova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-9048-6803>

Leneva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Fedoreev S.A., <https://orcid.org/0000-0002-4199-2099>

Ebralidze L.K., <https://orcid.org/0000-0002-4430-8766>

Mishchenko N.P., <https://orcid.org/0000-0001-7616-574X>

Vasileva E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7526-026X>

Falynskova I.N., <https://orcid.org/0000-0001-9836-9620>

Iunikhina O.V., <https://orcid.org/0000-0002-6723-582X>

Lavrov V.F., <https://orcid.org/0000-0001-7006-506X>

Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Acknowledgments. This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Project RFMEF161317X0076).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 02 September 2019

Accepted 24 September 2019

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежедневно в мире более 1 млн человек заражаются возбудителями заболеваний, передаваемых половым путём [1]. Наибольшую опасность представляют 8 патогенных агентов, четыре из которых имеют вирусную природу. Это вирусы гепатита В, иммунодефицита человека, папилломы человека, а также вирус простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) [2], вызывающий у людей генитальный герпес.

До настоящего времени единственным клинически одобренным антигерпетическим средством, применяемым для лечения ВПГ-2-инфекции, являются ацикловир и его аналоги, подавляющие репликацию вирусной ДНК [3, 4]. Однако использование этих препаратов не избавляет пациентов от рецидивов заболевания. Кроме того, в результате их длительного приёма не исключена опасность появления штаммов вируса, устойчивых к лекарственной терапии. Данные обстоятельства актуализируют поиск новых лекарственных средств, включая вещества природного происхождения, обладающие потенциально широким спектром противовирусного, в том числе антигерпетического, действия.

Хорошо известный природный антиоксидант эхинохром А (нафтохиноидный пигмент, получаемый из морских ежей) является действующим веществом отечествен-

ного препарата Гистохром[®], который используется в кардиологии для лечения ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, а также в офтальмологии при дегенеративных заболеваниях сетчатки и роговицы глаза [5, 6]. Способность эхинохрома А преодолевать гематоэнцефалический барьер [7] стала одной из предпосылок для изучения его противовирусных свойств.

Цель настоящего исследования – изучение противовирусного (анти-ВПГ-2) действия эхинохрома А и его композиции с антиоксидантами *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Вирус и культура клеток. В работе был использован штамм G вируса простого герпеса 2-го типа (ATCC VR-734). Вирус пассировали и титровали в культуре клеток Vero и в дальнейшем хранили при -80 °С. Клетки Vero (эпителиальные клетки почек африканской зелёной мартышки) культивировали с использованием среды DMEM (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, Россия), 100 Ед/мл гентамицина и глутамина.

Животные. В опытах использовали самок белых аутбредных мышей массой тела 16–20 г, полученных из питомника НЦБТ РАН «Андреевка». Все процедуры выполняли строго в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, от 18 марта 1986 г.

Препараты. В работе были использованы:

– Гистохром[®] для внутривенного введения (2,3,5,7,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон), государственный регистрационный № Р N002363/01 (ТИБОХ им. Г.Б. Елякова, ДВО РАН, Владивосток, Россия). В 1 мл препарата в качестве активного вещества содержится 10 мг эхинохрома А (Эх);

– композиция антиоксидантов на основе эхинохрома А: Эх + аскорбиновая кислота (Аск) (AppliChem, Германия) + α-токоферол (Ток) (Carl Roth, Германия) в соотношении 5 : 5 : 1;

– Ацикловир[®] – лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (GlaxoSmithKline Manufacturing, Италия);

– Ацикловир[®] таблетки (GlaxoSmithKline Pharmaceuticals, Польша).

Приготовление стоковых растворов препаратов. Инъекционные формы препаратов (Гистохром[®] и Ацикловир[®]) для исследований *in vitro* и *in vivo* разводили до необходимых концентраций средой DMEM. Композицию антиоксидантов для опытов *in vitro* растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО, Sigma, США) и хранили при -20 °С, стоковый раствор (10 мг/кг) готовили путём разведения средой DMEM до конечной концентрации ДМСО 0,5%. Для перорального применения препаратов композицию антиоксидантов и таблетированную форму ацикловира суспендировали и разводили средой DMEM до необходимых концентраций.

Определение цитотоксической активности препаратов. Цитотоксичность препаратов оценивали на клетках Vero с помощью МТТ (метилтиазолилтетразолий бромид) теста [8]. Монослой клеток (1×10^4 клеток/лунку), выращенных в 96-луночных планшетах (Nuncclon Delta, ООО «Росмедбио», Санкт-Петербург, Россия), обрабатывали препаратами в концентрациях от 0 до 2000 мкг/мл и культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 сут в среде DMEM; необработанные клетки использовали в качестве контроля. К клеткам добавляли раствор МТТ в концентрации 5 мг/мл (Sigma, США) и инкубировали при 37 °С в течение 2 ч. Затем супернатант удаляли и добавляли 150 мкл/лунку изопропанола. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре Varioscan Flash (Thermo Scientific, США) при длине волны 540 нм. Жизнеспособность клеток рассчитывали, как (ОП₀) / (ОП_к) · 100%, где ОП₀ и ОП_к соответствуют оптической плотности обработанных препаратами и контрольных клеток соответственно. 50% цитотоксическую концентрацию препарата, снижающую жизнеспособность обработанных клеток на 50% по сравнению с контролем, рассчитывали с помощью регрессионного анализа дозозависимых кривых [9].

Противовирусная активность препаратов in vitro. Противовирусную активность препаратов оценивали, учитывая подавление цитопатического действия (ЦПД) ВПГ-2 и с помощью МТТ-теста. Культуру клеток Vero, выращенных в 96-луночных планшетах, инфицировали вирусом в дозе 100 ТЦИД₅₀/мл (тканевая цитопатическая инфекционная доза) и одновременно обрабатывали препаратами в концентрациях от 0 до 50 мкг/мл в течение 60 мин при 37 °С. Затем супернатант удаляли, клетки отмывали, добавляли поддерживающую среду с 1% фетальной телячьей сыворотки и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 сут. ЦПД вируса (%) рассчитывали по формуле:

$$(\text{ОПtv} - \text{ОПcv}) / (\text{ОПcd} - \text{ОПcv}) \cdot 100\%,$$

где ОПtv соответствует оптической плотности инфицированных клеток, обработанных соответствующим препаратом; ОПcv – оптической плотности необработанных препаратом инфицированных клеток, ОПcd – оптической плотности контрольных (необработанных и неинфицированных) клеток. 50% ингибирующую концентрацию препарата (IC₅₀), снижающую на 50% вирус-индуцированное ЦПД, рассчитывали с помощью регрессионного анализа дозозависимых кривых [9]. Селективный индекс препарата (SI) вычисляли как отношение 50% цитотоксической концентрации (CC₅₀) к IC₅₀.

При изучении влияния препаратов на разные стадии репродукции вируса в культуре клеток гистохром и композицию антиоксидантов использовали в концентрации 20 мкг/мл, ацикловир – 10 мкг/мл при инфицирующей дозе вируса – 100 ТЦИД₅₀/мл. Для определения *профилактической активности* препаратов монослой клеток обрабатывали препаратом в течение 2 ч при 37 °С, затем инфицировали вирусом в течение 1 ч при 37 °С, отмывали и инкубировали в течение 3 сут при 37 °С в 5% атмосфере CO₂. При исследовании *вирулицидной активности* вирусосодержащую жидкость смешивали с препаратом в соотношении 1:1, инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, затем наносили на монослой клеток и инкубировали в течение 3 сут при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Для определения *вирусингибирующей активности* препаратов монослой клеток инфицировали вирусом в течение 1 ч при 37 °С, затем к клеткам добавляли тестируемый препарат и в течение 3 сут инкубировали при 37 °С в 5% атмосфере CO₂. Противовирусную активность препаратов оценивали по подавлению ЦПД вируса (%), как было показано выше.

Экспериментальная герпетическая инфекция у мышей. Генитальный герпес у мышей моделировали путём введения во влагалище животных по 30 мкл ВПГ-2 (10⁵ ТЦИД₅₀/мл). Интактным мышам (в качестве отрицательного контроля) вводили эквивалентное количество физраствора. Методом случайной выборки все животные были разделены на 8 групп (по 10 мышей в группе): контроль (-) – группа интактных животных; контроль (+) – группа инфицированных животных, не получавших лечения; мыши, получавшие гистохром по 1 мг/кг или 2 мг/кг; мыши, которым вводили композицию антиоксидантов по 2 мг/кг или 4 мг/кг; животные, получавшие по 50 мг/кг ацикловира. Ранее [10] было показано, что гистохром в указанных дозах нетоксичен для мышей. Эффективность применения ацикловира в дозе 50 мг/кг при инфекциях, вызываемых заражением мышей вирусом простого герпеса 1-го и 2-го типа, продемонстрировали в своих работах E.R. Kern и соавт. (1982) [11] и M.N. Prichard и соавт. (2011) [12]. Препараты использовали следующим образом: гистохром, как инъекционное средство, вводили внутривентриально, композицию антиоксидантов – внутривентриально (аналог пероральному способу введения в клинику). Препарат сравнения – ацикловир вводили как внутривентриально, так и внутривентриально. Все препараты вводили в объёме 0,2 мл 1 раз в день в течение 5 дней. Срок наблюдения за животными составлял 21 день. Эффективность лечения оценивали по количеству выживших животных (%), средней продолжительности жизни, изменению массы тела, их общему состоянию и инфекционному титру вируса.

Для определения титра вируса у животных каждой группы брали вагинальные смывы на 5-й и 7-й дни после заражения. С этой целью мышам во влагалище вводили 30 мкл охлаждённой среды DMEM, собранные смывы доводили до объёма 150 мкл средой DMEM,

центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин для осаждения клеток и слизи. Десятикратные разведения супернатантов наносили на монослой клеток Vero в 96-луночных планшетах, инкубировали в течение 3 дней при 37 °С, в атмосфере 5% CO₂. Титр вируса определяли, используя метод Рида и Менча (1938) [13] и выражали в lg ТЦИД₅₀/мл.

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение. Различия между показателями в контрольной и опытной группах выявляли с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок. Они считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

Снижение вызываемого ВПГ-2 цитопатогенного эффекта в культуре клеток Vero под действием препаратов. Перед оценкой противовирусной активности препаратов была исследована их цитотоксическая активность в отношении клеток Vero в диапазоне концентраций от 0 до 2000 мкг/мл. Ацикловир использовали в качестве контроля, как стандартный противовирусный препарат. На основании результатов МТТ-анализа были определены СС₅₀ всех исследуемых препаратов. Дальнейшее изучение противовирусной активности проводили при концентрациях препаратов менее 50 мкг/мл, которые обеспечивали жизнеспособность клеток на уровне >70%.

Вначале противовирусное действие тестируемых соединений исследовали путём обработки клеток Vero препаратами и различных концентрациях (от 0 до 50 мкг/мл) и одновременно вирусом (100 ТЦИД₅₀/мл). В результате была показана умеренная противовирусная активность тестируемых препаратов, которые дозозависимо подавляли опосредуемое вирусами ЦПД. IC₅₀ препаратов и их SI, характеризующие противовирусную активность, представлены в **табл. 1**. Установлено, что композиция антиоксидантов защищала клетки Vero от вирусной инфекции при существенно более низких IC₅₀ и более высоких показателях SI, чем один гистохром ($p \leq 0,05$).

При изучении влияния препаратов на разные стадии жизненного цикла ВПГ-2 была установлена их способность повышать устойчивость клеток к заражению (*оценка профилактического действия*); оказывать непосредственное влияние на вирусные частицы, снижая их способность заражать клетки (*оценка вирулицидного действия*); подавлять ранние стадии репликации вируса (*оценка вирусингибирующего действия*). Показано, что наиболее значительное подавление репликации наблюдалось после обработки вируса тестируемыми препаратами перед заражением им культуры клеток. Так, степень подавления ЦПД вируса после его обработки гистохромом и композицией антиоксидантов составляла соответственно 57 ± 5 и $84 \pm 6\%$. А предварительная обработка вируса ацикловиром вызывала незначительный вирулицидный эффект (**рис. 1**). Обработка клеток гистохромом или ацикловиром перед заражением вирусом (*профилактическое действие*) была малоэффективной, и лишь композиция антиоксидантов в определённой степени ($28 \pm 4\%$) защищала клетки. Исследуемые препараты на ранней стадии репликации вируса (через 60 мин после заражения) демонстрировали умеренную вирусингибирующую активность: 21 ± 4 и $40 \pm 5\%$ соответственно. При этом вирусингибирующая активность ацикловира в этом случае была существенно выше – $78 \pm 6\%$ (см. рис. 1).

Таблица 1

Цитотоксическая и противовирусная (анти-ВПГ-2) активность препаратов в культуре клеток Vero

Препараты	СС ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл	SI
Гистохром	62,5 ± 3,5	20,8 ± 2,3	3,0 ± 0,4
Композиция антиоксидантов	72,8 ± 4,1	13,1 ± 1,1*	5,7 ± 0,5*
Ацикловир	1250 ± 115	11,5 ± 0,9	108,7 ± 9,9

Примечание. СС₅₀ – 50% цитотоксическая концентрация препаратов; IC₅₀ – 50% ингибирующая концентрация препаратов; SI – селективный индекс препаратов; * статистически значимые различия между гистохромом и композицией антиоксидантов ($p \leq 0,05$).

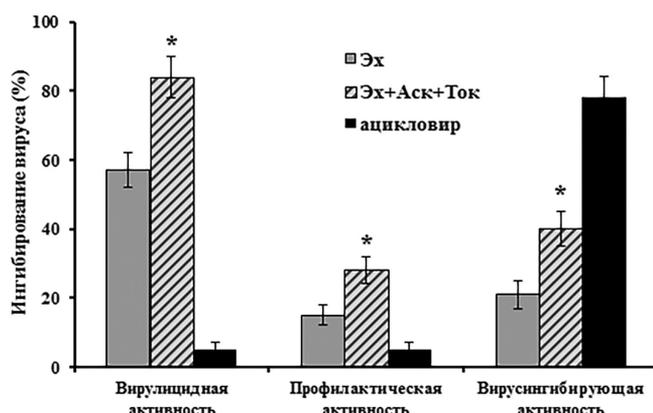


Рис. 1. Противовирусное действие препаратов на различных стадиях репликационного цикла ВПП-2.

* статистически значимые различия между действием гистохрома (Эх) и композицией антиоксидантов (Эх + Аск + Ток) ($p \leq 0,05$).

Таблица 2

Защитное действие препаратов у мышей, инфицированных ВПП-2

Группа	Число выживших мышей/общее количество животных	Индекс защиты, %	Средняя продолжительность жизни мышей, дни
Гистохром (1 мг/кг) внутривбрюшинно	3/10	22,2	13,4 ± 2,2
Гистохром (2 мг/кг) внутривбрюшинно	7/10*	66,7	17,3 ± 1,5*
Композиция антиоксидантов (2 мг/кг) перорально	3/10	22,2	14,8 ± 2,4
Композиция антиоксидантов (4 мг/кг) перорально	9/10*	88,9	19,7 ± 1,3*
Ацикловир (50 мг/кг) внутривбрюшинно	10/10*	100	21,0 ± 0,5*
Ацикловир (50 мг/кг) перорально	6/10*	55,6	16,1 ± 1,9*
Контроль (+)	1/10	-	9,7 ± 2,6
Контроль (-)	10/10	100	> 21,0

Примечание. Индекс защиты рассчитывали по формуле: $(L_c - L_e) / L_c \cdot 100\%$, где L_c – летальность в контрольной (+) группе; L_e – летальность в опытной группе; * статистически значимые различия между показателями опытной и контрольной (+) групп ($p \leq 0,05$). Контроль (+) – инфицированные нелеченые животные; контроль (-) – неинфицированные нелеченые животные.

Эффективность противовирусного действия препаратов при развитии генитального герпеса у мышей. После внутривагинального заражения ВПП-2 у животных развивался генитальный герпес. Клинические симптомы болезни появлялись с 5-го дня после инфицирования. При этом наблюдалось снижение массы тела, появление отёка и гиперемии в области влагалища, выделений из влагалища, отмечалось снижение физической активности животных, уменьшение потребления ими корма и воды, а через 7 дней у мышей, как правило, развивался парез задних конечностей. Средняя продолжительность жизни животных в контрольной (+) группе составила $9,7 \pm 2,6$ дня (табл. 2).

Введение инфицированным мышам исследуемых нами препаратов вызывало дозозависимый противовирусный эффект, который заключался в уменьшении клинических симптомов болезни и смертности среди животных. Парентеральное введение мышам гистохрома в дозе 2 мг/кг защищало от гибели 66,7% животных и увеличивало среднюю продолжительность жизни мышей по сравнению с контролем (+) более, чем на 7 сут. Кроме того, в данной концентрации гистохром эффективно препятствовал снижению массы тела больных животных. Введение этого препарата в концентрации 1 мг/кг увеличивало срок жизни больных мышей на 4 дня, однако недостаточно успешно ограничивало сниже-

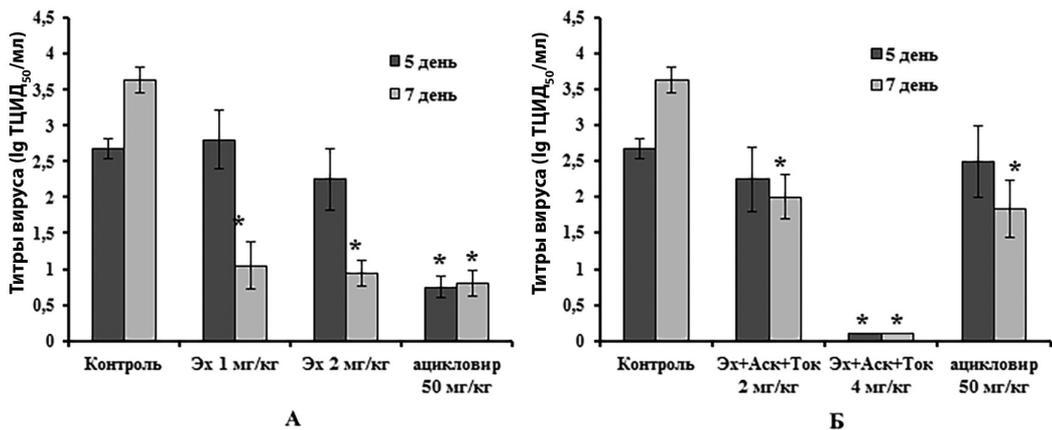


Рис. 2. Влияние препаратов на динамику изменений титров вируса в вагинальных смывах мышей, инфицированных ВПП-2.

А – внутрив брюшинное введение гистохрома (Эх) и ацикловира; Б – пероральное введение композиции антиоксидантов (Эх + Аск + Ток) и ацикловира; * статистически значимые различия между показателями опытной и контрольной (+) групп ($p \leq 0,05$). Контроль – инфицированные животные, не получавшие лечения.

ние их массы тела. В то же время лечение ацикловиром (50 мг/кг) полностью предотвращало гибель больных мышей – индекс защиты составил 100% (см. табл. 2).

Пероральное введение больным мышам композиции антиоксидантов в дозе 4 мг/кг защищало от гибели 88,9% животных (см. табл. 2). Их средняя продолжительность жизни увеличилась на 10 дней, а средняя масса тела достоверно не отличалась от соответствующего показателя у здоровых мышей. В то же время индекс защиты, обусловленный пероральным введением ацикловира (50 мг/кг), был меньше и составил лишь 55,6%. Кроме того, у этих животных установлено статистически значимое снижение средней массы тела.

Влияние препаратов на динамику титра вируса в вагинальных смывах мышей, инфицированных ВПП-2. Опыты *in vivo* показали, что ВПП-2 реплицируется в клетках эпителия влагалища мышей, достигая к 7-м суткам у животных контрольной группы (инфицированных вирусом мышей, не получавших лечения) $3,63 \pm 0,18 \text{ lg TCID}_{50}/\text{мл}$ (рис. 2). Парентеральное введение гистохрома (в дозах 1 и 2 мг/кг) вызывало статистически значимое (до $\sim 1,0 \text{ lg TCID}_{50}/\text{мл}$) снижение титра вируса в вагинальных смывах животных ($p \leq 0,05$) (см. рис. 2А). Ацикловир (50 мг/кг) также ослаблял репликацию вируса в клетках вагинального эпителия по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе ($p \leq 0,05$) уже к 5-м суткам.

У животных, которым перорально вводили композицию антиоксидантов (2 мг/кг) и ацикловир (50 мг/кг), лишь на 7-е сутки после заражения в эпителии влагалища снижалась репликация до $\sim 2 \text{ lg TCID}_{50}/\text{мл}$ ($p \leq 0,05$) (см. рис. 2Б). В вагинальных смывах животных, получавших перорально 4 мг/кг композиции антиоксидантов, на 5-е и 7-е сутки после заражения вирус определялся в незначительном количестве (см. рис. 2Б).

Обсуждение

Известно, что при инфекциях, вызываемых ВПП-1 и -2, наблюдается увеличение продукции активных форм кислорода (АФК) и усиление перекисного окисления липидов – процессов, способствующих активной репликации вирусов [14, 15]. Ранее [16] нами была показана способность эхинохрома А и композиции антиоксидантов на его основе снижать образование АФК (на модели липополисахарид-индуцированного образования АФК в культуре клеток Vero) и подавлять репликацию таких нейротропных вирусов, как ВПП-1 и вирус клещевого энцефалита. При этом композиция

антиоксидантов, состоящая из эхинохрома А, аскорбиновой кислоты и α -токоферола (5 : 5 : 1), демонстрировала более высокий уровень антиоксидантной и противовирусной активности, чем один эхинохром А. В настоящем исследовании было показано, что эхинохром А и его композиция с антиоксидантами способны подавлять репликацию как *in vitro*, так и *in vivo* ещё одного патогена – ВПГ-2, вызывающего у человека генитальный герпес.

Установлено, что эхинохром А в сочетании с аскорбиновой кислотой и α -токоферолом эффективно блокирует в культуре клеток Vero цитопатогенное действие ВПГ-2. IC_{50} данной композиции была в 1,5 раза ниже, а SI, соответственно, выше, чем одного эхинохрома (см. табл. 1). При исследовании действия данных соединений на различные стадии жизненного цикла ВПГ-2 было установлено, что обработка вируса этими препаратами перед заражением клеток вызывает так называемый вирулицидный эффект, подавляя на ранних стадиях инфекции репликативную активность ВПГ-2 (см. рис. 1). Было сделано предположение, что вирулицидная активность тестируемых нами соединений связана с их способностью непосредственно влиять на гликопротеины вирусной оболочки, нарушая взаимодействие вирусных частиц и заражаемых клеток. Показано, что некоторые нафтохиноны демонстрировали подобный механизм ВПГ-2-ингибирующего действия [17, 18]. Необходимо отметить, что ацикловир в отличие от гистохрома и композиции антиоксидантов в этих условиях не проявлял вирулицидную активность по отношению к ВПГ-2.

Стабильная масса тела заражённых животных, увеличение средней продолжительности жизни, а также снижение вирусной нагрузки под воздействием противовирусных препаратов – наиболее надёжные критерии эффективности тестируемых нами соединений. Было показано, что введение животным гистохрома или композиции антиоксидантов после их внутривагинального заражения ВПГ-2 сопровождается выраженным дозозависимым противовирусным эффектом (см. табл. 2), при этом способ введения препаратов имеет определяющее значение. Так, при интраперитонеальном введении гистохрома (2 мг/кг) защитный индекс составил 66,7% (после введения ацикловира 50 мг/кг он был 100%). При пероральном введении животным композиции антиоксидантов (4 мг/кг) защитный индекс существенно возрастал и составлял уже 88,9%, (после введения ацикловира (50 мг/кг) этот показатель был значительно ниже – 55,6%). При этом у мышей, противовирусная защита которых осуществлялась с помощью тестируемых нами препаратов, по сравнению с животными контрольной группы (см. рис. 2) увеличилась средняя продолжительность жизни, незначительно снизилась масса тела, а также статистически достоверно уменьшилась вагинальная вирусная нагрузка на ранней стадии инфекции. По-видимому, обнаруженный нами протективный эффект, вызываемый гистохромом и композицией антиоксидантов на его основе, обусловлен как прямым вирусингибирующим действием, так и выраженной антиоксидантной активностью этих препаратов.

Таким образом, нами впервые выявлена способность гистохрома, а также композиции антиоксидантов активно подавлять репликацию ВПГ-2 *in vitro* и *in vivo*. Полученные результаты расширяют спектр патогенных агентов, в отношении которых данные соединения демонстрировали противовирусную активность. Вероятно, в перспективе эти соединения можно использовать в качестве лекарственных средств при терапии вирусных инфекций.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект RFMEF161317X0076).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4-9, 11-18 см. REFERENCES)

3. Куханова М.К., Коровина А.Н., Кочетков С.Н. Вирус простого герпеса человека: жизненный цикл и поиск ингибиторов. *Успехи биологической химии*. 2014; 54: 457-94.
10. Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Ильницкий А.П., Травкин А.Г., Трещалина Е.М., Андропова Н.В. Действие природного антиоксиданта эхинохрома на рост подкожно перевитой аденокарциномы Эрлиха. *Российский онкологический журнал*. 2003; (5): 32-6.

REFERENCES

1. WHO. Report on global sexually transmitted infection surveillance, 2018. Geneva; 2018.
2. Looker K.J., Magaret A.S., Turner K.M.E., Vickerman P., Gottlieb S.L., Newman L.M. Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012. *PLoS One*. 2015; 10(1): e114989. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114989>
3. Kukhanova M.K., Korovina A.N., Kochetkov S.N. Human Herpes simplex virus: life cycle and the search for inhibitors. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2014; 54: 457-94. (in Russian)
4. Klysik K., Pietraszek A., Karewicz A., Nowakowska M. Acyclovir in the Treatment of Herpes Viruses – a Review. *Curr. Med. Chem*. 2018; Mar 8. Doi: <https://doi.org/10.2174/0929867325666180309105519>
5. Elyakov G.B., Maximov O.B., Mischenko N.P., Koltsova E.A., Fedoreev S.A., Glebko L.I., et al. Composition Comprising di-and Trisodium Salts of Echinochrome for Treating Ocular Conditions. European Patent № 1121929; 2004.
6. Elyakov G.B., Maximov O.B., Mischenko N.P., Koltsova E.A., Fedoreev S.A., Glebko L.I., et al. Drug preparation “Histochrome” for treating acute myocardial infarction and ischemic heart diseases. European Patent № 1121930; 2007.
7. Stonik V.A., Gusev E.I., Martynov M.Yu., Guseva M.R., Shchukin I.A., Agafonova I.G., et al. New medications for treatment of hemorrhagic stroke. High-resolution MRI in evaluation of histochrome in experimental hemorrhagic stroke. *Dokl. Boil. Sci.* 2005; 405: 421-3.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63. Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
9. Weislow O.S., Kiser R., Fine D.L., Bader J., Shoemaker R.H., Boyd M.R. New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: Application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989; 81(8): 577-86. Doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/81.8.577>
10. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Il'inskiy A.P., Travkin A.G., Treshchalina E.M., Andronova N.V. The effect of the natural antioxidant echinochrome on the growth of subcutaneously inoculated Ehrlich adenocarcinoma. *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal*. 2003; (5): 32-6. (in Russian)
11. Kern E.R., Richards J.T., Glasgow L.A., Overall J.C. Jr, de Miranda P. Optimal treatment of herpes simplex virus encephalitis in mice with oral acyclovir. *Am. J. Med.* 1982; 73(1A): 125-31. Doi: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(82\)90077-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(82)90077-8)
12. Prichard M.N., Kern E.R., Hartline C.B., Lanier E.R., Quenelle D.C. CMX001 Potentiates the Efficacy of Acyclovir in Herpes Simplex Virus Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(10): 4728-34. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00545-11>
13. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent's endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493-7.
14. Cymerys J., Chodkowski M., Słowska A., Krzyzowska M., Bańbura M.W. Disturbances of mitochondrial dynamics in cultured neurons infected with human herpesvirus type 1 and type 2. *J. Neurovirol.* 2019; June 3. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13365-019-00762-x>
15. Santana S., Sastre I., Recuero M., Bullido M.J., Aldudo J. Oxidative stress enhances neurodegeneration markers induced by herpes simplex virus type 1 infection in human neuroblastoma cells. *PLoS One*. 2013; 8(10): e75842. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075842>
16. Fedoreyev S.A., Krylova N.V., Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Pislyagin E.A., Iunikhina O.V., et al. Antiviral and antioxidant properties of echinochrome A. *Mar. Drugs*. 2018; 16(12). Doi: <https://doi.org/10.3390/md16120509>
17. Boominathan S.P., Sarangan G., Srikakulapu S., Rajesh S., Duraipandian C., Srikanth P. Antiviral activity of bioassay guided fractionation of Plumbago Zeylanica roots against Herpes simplex virus type 2. *WJPPS*. 2014; 3(12): 1003-17.
18. Roa-Linares V.C., Miranda-Brand Y., Tangarife-Castaño V., Ochoa R., García P.A., Castro M.Á., et al. Anti-Herpetic, Anti-Dengue and Antineoplastic Activities of Simple and Heterocycle-Fused Derivatives of Terpenyl-1,4-Naphthoquinone and 1,4-Anthraquinone. *Molecules*. 2019; 24(7). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24071279>

Поступила 02.09.19

Принята в печать 24.09.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Николов Г.С.¹, Тодорова Я.Д.¹, Николова М.Х.¹, Емилова Р.Г.¹,
Христова Д.М.², Костова-Шахид П.И.², Петрунов Б.Н.¹

СУБПОПУЛЯЦИИ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С IgE-ОБУСЛОВЛЕННОЙ АЛЛЕРГИЕЙ

¹Национальный центр заразных и паразитных болезней, 1504, г. София, Болгария;

²Александровская больница, 1431, г. София, Болгария

Актуальность. Известно, что некоторые субпопуляции Т-регуляторных клеток, наивные (nTreg) и индуцибельные (iTreg), поддерживают иммунную толерантность к аллергенам в окружающей среде. Но роль отдельных фенотипов, дефинированных субпопуляций Т-регуляторных клеток для развития IgE-обусловленной аллергии не изучена детально.

Цель – исследование фенотипа и числа разных типов Т-регуляторных клеток у пациентов с клинически выявленной IgE-обусловленной аллергией, а также установление возможных различий в количестве циркулирующих Т-регуляторных субпопуляций у пациентов по сравнению со здоровыми людьми без атопии.

Материалы и методы. В исследование были включены 20 пациентов с ингаляционной аллергией и 10 здоровых людей (контрольная группа). После получения информированного согласия у пациентов с помощью стандартной 8-параметрической проточной цитометрии (BD FACSCanto II) определены процентное соотношение и абсолютное число следующих Т-регуляторных субпопуляций: наивные (CD45RO⁺FOXP3^{lo}), клетки памяти (RO⁺FOXP3⁺), эффекторные (Treg eff, RO⁺FOXP3^{hi}), индуцированные (CD39⁺CD134⁺), Tr1 (IL-10⁺FOXP3⁺) и Th17/Treg (CD196⁺FOXP3⁺CD4⁺Treg).

Результаты и обсуждение. У пациентов с аллергией доля и абсолютное число FOXP3⁺CD4⁺ Treg значительно понижены (в среднем 0,6% против 3,3%, $p < 0,05$; и 8,7 против 55 клеток/ μ л, $p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой. Кроме того, в группе пациентов значительно снижено число индуцированных на периферии Tr1-клеток (в среднем 0,26% против 1,1% у здоровых, $p < 0,05$), как и Th17/Treg (в среднем 7,7% против 28,4% у здоровых индивидов, $p < 0,01$).

Выводы. Уменьшение числа Т-регуляторных наивных клеток и клеток памяти, а также индуцированных на периферии Tr1- и Th17/Treg-клеток у пациентов с клинически выявленной ингаляционной аллергией приводит к дисрегуляции иммунной системы и потере периферической толерантности, что лежит в основе развития ряда широко распространённых аллергических заболеваний, таких как аллергический ринит и астма.

Ключевые слова: IgE-обусловленная аллергия; Т-регуляторные клетки; nTreg; Tr1; Th17/Treg.

Для цитирования: Николов Г.С., Тодорова Я.Д., Николова М.Х., Емилова Р.Г., Христова Д.М., Костова-Шахид П.И., Петрунов Б.Н. Субпопуляции Т-регуляторных клеток у пациентов с IgE-обусловленной аллергией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6):65-71.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-65-71>

Nikolov G.S.¹, Todorova Y.D.¹, Nikolova M.H.¹, Emilova R.G.¹, Hristova D.M.², Kostova-Shahid P.J.², Petrunov B.N.¹

SUBSETS OF T REGULATORY CELLS IN PATIENTS WITH IgE-MEDIATED ALLERGY

¹National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, 1504, Bulgaria;

²Aleksandrovskaya University Hospital, Sofia, 1431, Bulgaria

Background. It is presently known that several subsets of T-regulatory (Treg) cells, both natural and inducible maintain tolerance to environmental allergens. But the relative importance of distinct phenotypically defined Treg subsets for the clinical manifestations of IgE-mediated allergy has not been elucidated yet.

Для корреспонденции: Николов Георги Стоянов, доцент, отдел «Иммунология», Национальный центр заразных и паразитных болезней, 1504, г. София, Болгария. E-mail: labalerg@ncipd.org

The aim of the study was to investigate the phenotype and number of different Treg subpopulations from patients with IgE-mediated allergy compared with healthy non-allergic individuals.

Materials and methods. A group of 20 patients with clinically manifested IgE allergy and a group of 10 healthy no allergic controls were included in the study. Peripheral blood samples were taken after informed consent. Percentage and absolute count (AC) of the following regulatory subsets: naive (CD45RO⁺FoxP3^{lo}), memory (RO⁺FoxP3⁺), effector (Treg eff, RO⁺FoxP3^{hi}), induced (CD39⁺CD134⁺), Th17/Treg (CD196⁺FoxP3⁺CD4⁺Treg); Tr1 (IL-10⁺FoxP3⁺), were determined using standard 8-parameter flow cytometry (BD FACSCanto II).

Results and discussion. The share and AC of FoxP3⁺CD4⁺ Treg was significantly decreased in sensitized patients as compared to controls (mean 0,6% vs. 3,3%, p<0.05 and 8,7 vs. 55 cells/ μ l p<0.001). In addition, a significantly decreased level of Tr1 cells was observed in the patients with allergy, 0,4% vs. 2,1 % in healthy controls (p<0,05) as well for subset of Th17/Treg (mean 7,7% vs. 28,4% in healthy persons, p<0.01).

Conclusion. The significantly decreased number of FoxP3⁺CD4⁺ Treg as well as periphery induced Tr1 and Th17/Treg cells in patients with respiratory allergy lead to dysregulation and loss of peripheral immune tolerance, which is the pathophysiological basis for development of widely spread allergic diseases like allergic rhinitis and bronchial asthma.

Keywords: IgE-mediated allergy; T-regulatory cells; nTreg; Tr1 cells; Th17/Treg.

For citation: Nikolov G.S., Todorova Y.D., Nikolova M.H., Emilova R.G., Hristova D.M., Kostova-Shahid P.J., Petrunov B.N. Subsets of T regulatory cells in patients with IgE-mediated allergy. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6):65-71. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-65-71>

For correspondence: Georgi S. Nikolov, MD PhD, Department «Immunology», National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, 1504, Bulgaria.
E-mail: labalerg@ncipd.org

Information about authors:

Nikolov G. S., <https://orcid.org/0000-0003-2949-7834>

Todorova Y. D., <https://orcid.org/0000-0003-4708-6887>

Nikolova M. H., <http://orcid.org/0000-0001-8180-4892>

Grozdanova R.E., <https://orcid.org/0000-0002-0018-1361>

Hristova D.M., <https://orcid.org/0000-0002-9710-1312>

Kostova-Shahid P.Y., <https://orcid.org/0000-0002-3012-1861>

Petrunov B. N., <https://orcid.org/0000-0001-8435-6175>

Acknowledgments. This study was supported by the research grant DN 13/2/14. 12. 2017 of the Bulgarian National Science Foundation.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 30 July 2019

Accepted 24 September 2019

Введение

Патофизиологические механизмы развития аллергических болезней включают комплексную последовательность иммунологических событий, которые вызывают ответ со стороны клеток в целевых органах и приводят к развитию воспаления, ремоделированию тканей и нарушению их функций.

Формирование и сохранение толерантности к аллергенам является отличительной чертой иммунного ответа у здоровых людей без атопии, и постулируется, что важнейший компонент этой иммунной «неотвечаемости» – образование функциональных аллерген-специфических Т-регуляторных клеток (Treg). Три основные субпопуляции аллерген-специфических Т-клеток (Th1, Th2 и Tregs) в различных пропорциях содержатся в организме и у здоровых людей, и у страдающих аллергией. Этот факт обосновывает предположение, что изменение баланса между аллерген-специфическими Th2- и Treg-клетками может быть основной причиной как развития толерантности к аллергенам, так и проявления аллергической сенсибилизации [1].

По своему видовому составу и структуре Treg-клетки представляют одну из самых сложных Т-клеточных групп. Их гетерогенность, которая проявляется в особенностях

фенотипа, условиях индуцирования и механизмах супрессии, до конца не изучена.

На сегодняшний день CD4 Treg-клетки можно разделить на две основные субпопуляции: естественные Treg, происходящие из тимуса, и индуцибельные Treg, которые образуются вне тимуса после антигенной стимуляции.

Естественные Treg можно разделить на следующие субпопуляции: наивные Treg (nTreg), эффекторные Treg (Treg eff) и Treg-клетки памяти (Treg m).

В свою очередь индуцибельные Treg (iTreg) подразделяются на: FOXP3⁺ T-клетки, индуцированные на периферии; регуляторные T-клетки типа 1 (Tr1), продуцирующие IL-10, с основным фенотипом CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺; и Th3-клетки, продуцирующие в основном TGF- β [2].

Согласно последним данным, некоторые субпопуляции T-регуляторных клеток, а именно Th17/T-регуляторные клетки (Th17/Treg), развиваются из периферических индуцированных CD4⁺FOXP3⁺ Tregs. Доказано, что у человека эта субпопуляция обладает супрессивной активностью, которая, однако, слабее таковой у индуцированных Treg-клеток. С другой стороны, кроме регуляторных функций, эти клетки обладают способностью к продукции IL-17a, т.е. Th17/Treg обладают фенотипическими характеристиками и Th17-, и Treg-клеток и способствуют развитию аллергических заболеваний [3].

В этой связи **целью** данного исследования стало определение фенотипа и количества различных T-регуляторных клеток у пациентов с клинически выявленной IgE-обусловленной аллергией, а также установление возможных различий в величине циркулирующих T-регуляторных субпопуляций у пациентов по сравнению со здоровыми людьми без атопии.

Материалы и методы

Группы исследования. В исследование были включены 20 пациентов с клинически выявленной ингаляционной IgE-обусловленной аллергией (сезонный и круглогодичный аллергический ринит) и 10 здоровых людей без аллергических проявлений на ингаляционные аллергены (контрольная группа). Дизайн исследования был одобрен Комиссией по этике НЦЗПБ (София, Болгария).

Группа больных с аллергией состояла из 13 мужчин и 7 женщин в возрасте от 19 до 58 лет с основным диагнозом «аллергический ринит», а контрольная группа состояла из 6 мужчин и 4 женщин в возрасте от 26 до 59 лет.

Тяжесть аллергических симптомов оценивали путём подсчёта общего симптомокомплекса, который включает цифровую оценку жалоб на ринорею, чихание, назальную конгестию и зуд в носу и глазах.

Наличие сенсibilизации. Для доказательства специфической сенсibilизации пациентам и участникам контрольной группы проводили кожное тестирование (прик-тест) набором ингаляционных аллергенов «Бул Био НЦЗПБ ЕООД» (домашняя пыль, *D. pteronyssinus*, *Alternaria alternata*, кошка, пыльца деревьев и луговых трав). Пробы учитывали через 20 мин, при этом кожные реакции считали положительными при диаметре папулы и эритемы ≥ 3 мм.

Проточная цитометрия. С помощью стандартной 8-параметрической проточной цитометрии (BD FACSCanto II) клеток крови у всех обследованных определяли процентное соотношение и абсолютное число субпопуляций CD4 T-регуляторных клеток (табл. 1).

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ выполняли с использованием программы Prism версия 5 (GraphPad Software Inc, США). Сравнивали долю и абсолютное число исследованных T-регуляторных субпопуляций пациентов обеих групп посредством двустороннего непарного T-теста. Разницу считали статистически значимой при $p < 0,05$.

Результаты

Клиническая характеристика участников исследования. В среднем общая оценка аллергических симптомов со стороны верхних дыхательных путей у пациентов соста-

Таблица 1

Исследованные субпопуляции Т-регуляторных клеток

Субпопуляция Treg	Фенотип
Естественные CD4 Treg:	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FOXP3 ⁺
наивные (Treg n)	CD4 ⁺ CD45 ⁺ FOXP3 ^{low} RO ⁻
эффektorные (Treg eff)	CD4 ⁺ CD45 ⁺ FOXP3 ^{hi} RO ⁺
клетки памяти (Treg m)	CD4 ⁺ CD45 ⁺ FOXP3 ^{low} RO ⁺
индуцибельные (iTreg)	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ⁻ CD39 ⁻ CD134 ⁺
	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ⁻ CD39 ⁺ CD134 ⁻
	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ⁻ CD39 ⁺ CD134 ⁺
– регуляторные Т-клетки типа 1 (Tr1)	CD4 ⁺ FOXP3 ⁻ IL10 ⁺
Th17/Treg	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FOXP3 ⁺ CD127 ⁻ CD196 ⁺ CD39 ⁺

Таблица 2

Клиническая характеристика участников исследования

Показатель	Пациенты (n = 20)	Контрольная группа (n = 10)
Возраст, годы	34,6 ± 11,03	41,7 ± 10,94
Пол:		
– мужчины	65% (13/20)	60% (6/10)
– женщины	35% (7/20)	40% (4/10)
Симптомный подсчёт (баллы)	10,5 ± 3,92	0
Результаты кожно-аллергических проб:		
– без сенсibilизации	0% (0/20)	100% (10/10)
– сенсibilизация к пыльце деревьев и злаковых трав	50% (10/20)	
– сенсibilизация к бытовым аллергенам	30% (6/20)	
– сенсibilизация к <i>Alternaria alternata</i>	20% (4/20)	

вила 10,5 ± 3,92 балла из 20. Посредством кожно-аллергических проб было установлено, что 10 (50%) пациентов сенсibilизированы к пыльце злаковых трав; 6 (30%) – к бытовым аллергенам (домашняя пыль, микроклещи и/или кошка); 4 (20%) – к плесени (*Alternaria alternata*).

В среднем общая оценка аллергических симптомов со стороны верхних дыхательных путей у индивидов контрольной группы составляла 0 баллов. Кожно-аллергические пробы с использованием ингаляционных аллергенов не выявили сенсibilизацию у лиц контрольной группы.

Подробная информация о пациентах и здоровых лицах из контрольной группы представлена в **табл. 2**.

Определение субпопуляций Т-регуляторных клеток. Данные сравнительного анализа исследованных субпопуляций Трег-клеток у пациентов с клинически выявленной IgE-обусловленной аллергией и у здоровых людей представлены в **табл. 3**.

Определение доли и абсолютного числа FOXP3⁺CD4⁺ Трег посредством проточной цитометрии позволило установить, что их статистически значимо меньше у пациентов с ингаляционной аллергией, чем у людей без атопии: в среднем 0,6% против 3,3%, $p < 0,05$; и 8,7 против 55 клеток/μl, $p < 0,001$ (**рис. 1**). Эта разница была обусловлена в основном субпопуляцией Трег m с фенотипом CD4⁺CD45⁺ FOXP3^{low} RO⁺. У пациентов они в среднем составили 29,8% из всех CD4⁺ Трег, в то время как в контрольной группе – 52,5%, $p < 0,05$.

При анализе субпопуляций Трег-клеток, индуцированных на периферии у пациентов с аллергией к атопическим аллергенам, наблюдается значительное снижение числа и относительной доли Tr1-клеток: 0,26% против 1,1% среди представителей контрольной группы ($p < 0,05$) (**рис. 2**).

Таблица 3

Сравнительный анализ исследованных субпопуляций Т-регуляторных клеток у пациентов с клинически выявленной IgE-обусловленной аллергией и у здоровых людей (в %)

Субпопуляция Treg	Фенотип	Пациенты (n = 20)			Контрольная группа (n = 10)			p
		средний	мин.	макс.	средний	мин.	макс.	
CD4 ⁺ Treg*	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FOXP3 ⁺	0,6	0,3	0,9	3,3	0,6	6,1	<0,05
Treg n**	CD4 ⁺ CD45 ⁺ FOXP3 ^{low} RO ⁻	8,6	0	13,6	10,6	6,6	14,7	0,44
Treg eff**	CD4 ⁺ CD45 ⁺ FOXP3 ^{hi} RO ⁺	6,05	0,2	11	21	6,4	28,3	0,07
Treg m**	CD4 ⁺ CD45 ⁺ FOXP3 ^{low} RO ⁺	29,8	0,1	53,7	52,5	43,9	60	<0,05
iTreg**	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ⁻ CD39 ⁺ CD134 ⁻	10,92	1,0	26,7	1,6	0,4	3,1	0,19
	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ⁻ CD39 ⁺ CD134 ⁺	24,8	1,3	49,4	43,7	31,5	65,6	0,08
Tr1**	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ⁻ CD39 ⁺ CD134 ⁺	5,7	0,2	11	5,7	0,9	12,5	>0,05
	CD4 ⁺ FOXP3 ⁻ IL10 ⁺	0,26	0	0,4	1,1	0,4	2,1	0,02
Th17/Treg**	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} FOXP3 ⁺ CD127 ⁻ CD196 ⁺ CD39 ⁺	7,7	0,1	17,2	28,4	17,2	39,5	0,006

Примечание. * подсчёт популяции как процент всех CD4⁺ Т-клеток; ** подсчёт популяции как процент CD4⁺ Treg-клеток.

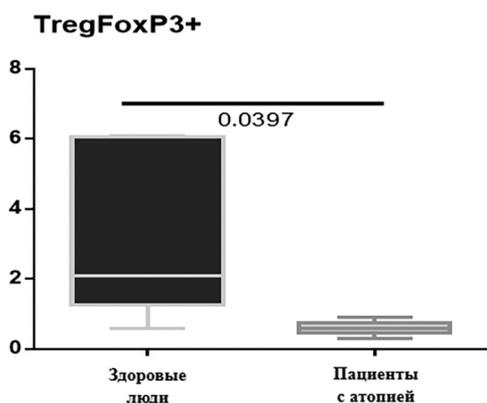


Рис. 1. Субпопуляции FOXP3⁺ CD4⁺ Treg у здоровых людей и у пациентов с клинически выявленной IgE-обусловленной аллергией.

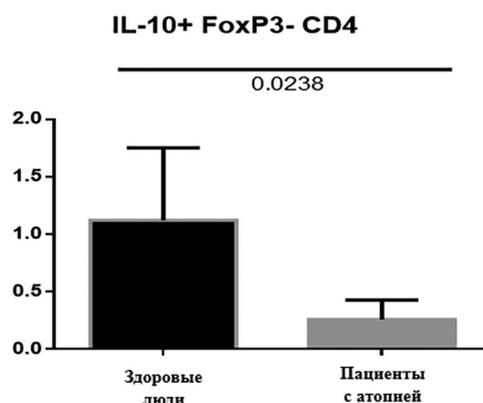


Рис. 2. Сравнительный анализ доли CD4⁺ FOXP3⁻IL10⁺ (Tr1-клетки) у здоровых индивидов и у пациентов с клинически выявленной IgE-обусловленной аллергией.

У пациентов с ингаляционной аллергией субпопуляция Th17/Treg-клеток тоже была значительно уменьшена: в среднем 7,7% против 28,4% у здоровых людей, $p < 0,01$ (рис. 3).

Обсуждение

При аллергии в организме развивается ряд патологических иммунных реакций в ответ на воздействие со стороны аллергенов окружающей среды. У пациентов формируется в основном Th2-иммунный ответ, который стимулирует В-клетки к продукции IgE-антител. На данный момент достаточно данных, свидетельствующих о том, что Т-регуляторные клетки могут повлиять на Th2-ответ *in vitro*. Однако исследование иммунного ответа на аллергены у здоровых индивидов показывает, что у них существует такой же периферийный Т-клеточный репертуар, который выявляет идентичные Т-клеточные эпитопы, как и у пациентов с аллергией [4].

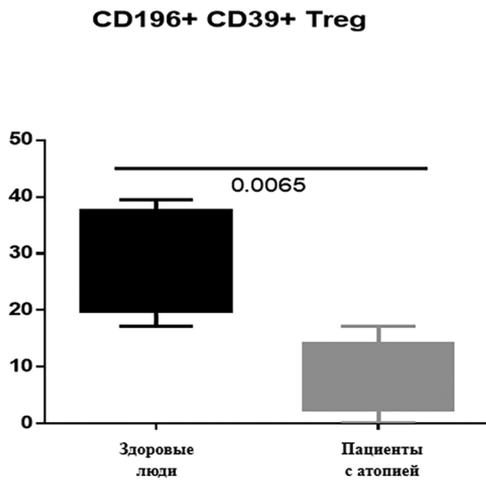


Рис. 3. Субпопуляция Th17/Treg-клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{hi} FOX-P3⁺CD127⁺CD196⁺CD39⁺ у здоровых индивидов и у пациентов с клинически выявленной IgE-обусловленной аллергией.

Имеются предварительные данные о том, что у индивидов без атопии число Т-регуляторных клеток с возрастом увеличивается, а у пациентов с IgE-обусловленной аллергией субпопуляции естественных Т-регуляторных клеток уменьшаются по сравнению со здоровыми людьми [5, 6].

Полученные нами результаты также показывают, что у пациентов с атопией наличие статистически значимое уменьшение числа естественных Т-регуляторных клеток, в основном в субпопуляции Treg-клеток памяти. Это, несомненно, вызывает нарушение иммунного гомеостаза у людей с атопией и может привести к развитию сверхчувствительности к разнообразным аллергенам в окружающей среде.

С другой стороны, индукция и образование периферийной иммунной толерантности имеет существенное значение для поддержания стабильности иммунной системы.

В течение последних 20 лет особое внимание в исследованиях уделяется индуцированной на периферии субпопуляции Tr1-клеток. По сравнению с естественными CD4⁺CD25⁺ Treg-клетками Tr1-клетки обычно не экспрессируют CD25 или FOXP3. Доказано, что Tr1-клетки индуцируются путём продолжительной активации CD4 T-клеток аллергеном в присутствии IL-10. Они отличаются и по своему уникальному цитокиновому профилю, охарактеризованному как IL-10⁺TGFβ⁺IFNγ⁺IL-5⁻IL-4⁻IL-2^{low/neg}. Считается, что Tr1 составляют основную субпопуляцию индуцибельных, периферических Т-регуляторных клеток, которая имеет отношение к формированию иммунных ответов при аллергии, так как они продуцируют большие количества IL-10 и TGF-β [7].

В отличие от естественных Treg-клеток, которые управляют регуляторными иммунными функциями во всём теле и вносят свой вклад в поддержание иммунного гомеостаза, Tr1-клетки регулируют локальную иммунную микросреду, в которой существуют специфические антигены. Благодаря своим иммуносупрессивным свойствам Tr1-клетки обеспечивают поддержание периферической иммунной толерантности и подавляют развитие аллергических и аутоиммунных заболеваний [8]. У здоровых людей аллерген-специфические Tr1 составляют доминирующую Т-клеточную субпопуляцию, которая подавляет аллергические ответы на различные аллергены в окружающей среде [9].

Более того, наблюдаемое нами статистически значимое уменьшение субпопуляции именно Tr1-клеток у пациентов с клинически проявленной ингаляционной аллергией является ещё одним подтверждением гипотезы о том, что аллергические заболевания возникают прежде всего вследствие нарушения периферической иммунной толерантности, поддерживаемой Tr1-клетками.

Th17/Treg-клетки представляют относительно малую популяцию на периферии здоровых индивидов: от 4 до 8% от общего числа CD4⁺CD25⁺ Tregs. Поскольку они экспрессируют на своей поверхности CCR6 (CD 196) и CCR4 (CD 194), считается, что эти клетки лучше представлены в тканях, чем в периферической крови. Хотя эти клетки проявляют антагонистические функции и Т-регуляторных, и Th17 эффекторных клеток, считается, что данная субпопуляция играет важную роль в контроле патогенеза ряда аутоиммунных заболеваний. Роль этих клеток в развитии аллергических заболеваний не изучена детально. В одном исследовании сообщалось,

что по сравнению со здоровыми людьми у пациентов с аллергическим ринитом повышено число Th2, Th17 и IL-17a-продуцирующих Treg и налицо сравнимое число Th1- и Treg-клеток [10].

Наше исследование показало, что в периферической крови пациентов с аллергическим ринитом число Th17/Treg-клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{hi} FOXP3⁺CD127⁻CD196⁺CD39⁺ статистически значимо снижено по сравнению со здоровыми индивидами. Данный факт требует более детального исследования и объяснения.

Заключение

Полученные нами результаты показывают, что у пациентов с IgE-обусловленной аллергией статистически значимо меньшее число и относительная доля основных субпопуляций Т-регуляторных клеток по сравнению со здоровыми людьми. Уменьшение числа естественных Т-регуляторных клеток, в частности Treg-клеток памяти, а также индуцированных на периферии Tr1- и Th17/Treg-клеток, приводит к нарушению механизма периферической Т-клеточной толерантности, вследствие чего происходит чрезмерная активация Th2-клеток.

Следовательно, дисрегуляция иммунной системы и потеря периферической толерантности лежат в основе развития ряда широко распространённых аллергических заболеваний, таких как аллергический ринит, астма и др.

Таким образом, определение числа и доли различных субпопуляций Т-регуляторных клеток посредством проточной цитометрии можно эффективно использовать для комплексной клинико-иммунологической оценки состояния каждого пациента с IgE-обусловленной ингаляционной аллергией, в том числе в процессе специфической иммунотерапии.

Финансирование. Данное исследование проведено при поддержке исследовательского гранта ДН13/2/14.12.2017 Болгарского национального научного фонда.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Jutel M., Akdis C.A. T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Chem. Immunol. Allergy*. 2008; 94: 158-77. Doi: <https://doi.org/10.1159/000155000>
2. Zhang H., Kong H., Zeng X., Guo L., Sun X., He S. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J. Transl. Med.* 2014; 12: 125. Doi: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-125>
3. Jung M.K., Kwak J.E., Shin E.C. IL-17A-producing Foxp3⁺ regulatory T cells and human diseases. *Immune Netw.* 2017; 17(5): 276-86. Doi: <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.5.276>
4. Li L., Boussiotis V.A. Control and regulation of peripheral tolerance in allergic inflammatory disease: therapeutic consequences. *Chem. Immunol. Allergy*. 2008; 94: 178-88. Doi: <https://doi.org/10.1159/000155086>
5. Pacheco-Gonzalez R.M., Avila C., Dávila I., García-Sánchez A., Hernández-Hernández L., Benito-Pescador D., et al. Analysis of FOXP3 gene in children with allergy and autoimmune diseases. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 2016; 44(1): 32-40. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.01.012>
6. Akdis C.A., Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 123(4): 735-48. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.02.030>
7. Palomares O., Martín-Fontecha M., Lauener R., Traidl-Hoffmann C., Cavkaytar O., Akdis M., et al. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-β. *Genes Immun.* 2014; 15(8): 511-20. Doi: <https://doi.org/10.1038/gene.2014.45>
8. Wu K., Bi Y., Sun K., Wang C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell. Mol. Immunol.* 2007; 4(4): 269-75.
9. Xystrakis E., Boswell S.E., Hawrylowicz C.M. T regulatory cells and the control of allergic disease. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2006; 6(2): 121-33. Doi: <https://doi.org/10.1517/14712598.6.2.121>
10. Cheng X., Lou W., Wang C., Zhang W., Han D., Zhang L. FOXP3-marked IL-17a-producing regulatory T cells are increased in patients with allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol.* 2012; 132(12): 1311-7. Doi: <https://doi.org/10.3109/00016489.2012>

Поступила 30.07.19

Принята в печать 24.09.19

Флуер Ф.С., Панова Я.А., Азанова А.А., Мамычева Е.В.

ОБНАРУЖЕНИЕ ЭНТЕРОТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ SEC И SEI, ВЫДЕЛЕННЫХ У БОЛЬНЫХ С ПНЕВМОНИЕЙ, СЕПСИСОМ И ОЖОГАМИ

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия

Цель – выявить частоту встречаемости стафилококковых энтеротоксинов типа SEC и SEI, продуцируемых штаммами *Staphylococcus aureus*, выделенными от больных с различной нозологией. Как известно, инфекционный процесс у них протекает с выраженной интоксикацией без рвоты и кишечных расстройств.

Материалы и методы. Исследовано 79 штаммов (43 штамма выделенных при пневмонии, 13 – у ожоговых больных, 11 – при сепсисе) *S. aureus* на наличие SEC и SEI методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Установлено, что 48,3% штаммов *S. aureus*, выделенных у больных пневмонией, продуцировали SEC и 72,1% – SEI. Частота встречаемости штаммов *S. aureus*, продуцирующих SEC и SEI, выделенных у больных при ожоговых инфекциях, составила 23,0 и 15,4% соответственно. 36,4% штаммов стафилококков, выделенных у больных с сепсисом, продуцировали SEC, 45,5% – SEI.

Обсуждение. Было выявлено, что доля культур *S. aureus*, продуцирующих энтеротоксины SEC, при сепсисе значительно выше, чем штаммов – продуцентов SEB (5,4%) и намного меньше, чем SEA (75,6%). Обнаружен высокий процент SEI-положительных штаммов по сравнению со штаммами, которые продуцируют классические энтеротоксины SEA, SEB и SEC, выделенными при пневмонии. При ожоговых инфекциях доли штаммов, продуцирующих SEC и SEI, составили 15,4 и 23,0% соответственно, что значительно ниже, чем SEA (92,9%).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о необходимости выявления штаммов стафилококков, продуцирующих как классические, так и вновь открытые энтеротоксины, которые являются решающими факторами вирулентности, приводящими к летальному сепсису, инфекционному эндокардиту и синдрому токсического шока, с целью их элиминации.

Ключевые слова: стафилококк, энтеротоксины, пневмония, сепсис, ожоговая инфекция.

Для цитирования: Флуер Ф.С., Панова Я.А., Азанова А.А., Мамычева Е.В. Обнаружение энтеротоксигенных штаммов *Staphylococcus aureus*, продуцирующих SEC и SEI, выделенных у больных с пневмонией, сепсисом и ожогами. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6):72-78.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-72-78>

Fluer F.S., Panova Ya.A., Azanova A.A., Mamychева E.V.

DETECTION OF ENTEROTOXIGENIC STRAINS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, PRODUCING SEC AND SEI, ISOLATED IN PATIENTS WITH PNEUMONIA, SEPSIS AND BURNS

Federal State Budgetary Institution «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamalei» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098, Russia

Aim. To identify the frequency of occurrence of staphylococcal enterotoxins of the SEC and SEI type produced by *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with different nosology. As you know, the infection process in them proceeds with severe intoxication without vomiting and intestinal disorders.

Для корреспонденции: Флуер Федор Семенович, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ патогенности, группы стафилококковых инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: fluerfs@yandex.ru

Materials and methods. 79 strains were studied (43 were isolated in case of pneumonia, 13 - in burns, 11 - in sepsis) *S. aureus* in the presence of SEC and SEI using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. It was found that 48.3% of *S. aureus* strains isolated from patients with pneumonia produced SEC and 72.1% - SEI. The frequency of occurrence of *S. aureus* strains producing SEC and SEI isolated in patients with burn infections was 23.0 and 15.4%, respectively. 36.4% of staphylococcal strains isolated in patients with sepsis produced SEC, 45.5% - SEI.

Discussion. It was found that the proportion of *S. aureus* cultures producing SEC enterotoxins during sepsis is significantly higher than the strains producing SEB (5.4%) and much smaller than SEA (75.6%). A high percentage of SEI-positive strains was found compared to strains that produce the classic enterotoxins SEA, SEB and SEC isolated from pneumonia. In burn infections, the proportions of strains producing SEC and SEI were 15.4 and 23.0%, respectively, which is significantly lower than SEA (92.9%).

Conclusion. The data obtained indicate the need to identify staphylococcus strains that produce both classic and newly discovered enterotoxins, which are crucial virulence factors leading to lethal sepsis, infectious endocarditis and toxic shock syndrome to eliminate them.

Keywords: *staphylococcus; enterotoxins; pneumonia; sepsis; burn infection.*

For citation: Fluer F.S., Panova Ya.A., Azanova A.A., Mamycheva E.V. Detection of enterotoxigenic strains *Staphylococcus aureus*, producing SEC and SEI, isolated in patients with pneumonia, sepsis and burns. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6): 72-78. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-72-78>

For correspondence: Fedor S. Fluer, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Fundamentals of Pathogenicity, Staphylococcal Infections Group, Research Center for Epidemiology and Microbiology NF Gamalei Ministry of Health of Russia, Moscow, 123098, Russia. E-mail: fluerfs@yandex.ru

Information about authors:

Fluer F.S., <https://orcid.org/0000-0002-5111-7888>

Panova Ya.A., <https://orcid.org/0000-0002-2344-8532>

Azanova A.A., <https://orcid.org/0000-0002-5519-5285>

Mamycheva E.V., <https://orcid.org/0000-0002-0160-7547>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 19 September 2019
Accepted 24 September 2019

Введение

Staphylococcus aureus – бактериальный патоген, вызывающий различные заболевания, от лёгких фурункулов и кожных инфекций до таких серьёзных заболеваний, как остеомиелит, эндокардит, пневмония, менингит и синдром токсического шока [1]. Кроме того *S. aureus* вызывает бактеримию, которая часто возникает в результате кожных инфекций при наличии хирургических ран, пневмонии, использования инфицированных катетеров, внутривенного употребления наркотиков и в 20–40% случаев становится причиной смертности [2]. Эти заболевания связаны с выработкой факторов патогенности, в частности со стафилококковыми энтеротоксинами (SE). Тем не менее недавние исследования показывают, что SE играют более значительную роль в проявлении ряда других заболеваний человека, в том числе связанных с дыхательными путями и развитием аутоиммунных заболеваний.

SE являются мощными неспецифическими стимуляторами Т-клеток (суперантигенами), которые вызывают нерегулируемую активацию иммунного ответа. Если эта стимуляция сохраняется, возникает массивная перегрузка цитокинами, включая клинические признаки синдрома токсического шока: быстрое начало лихорадки, полиорганная недостаточность и высокая смертность. В отличие от большинства секретируемых токсинов, продуцируемых *S. aureus*, SE токсичны для человека даже в незначительных количествах. Они способны вызывать рвоту и гастроэнтериты при однократном поступлении 100 нг – 1 мкг [3]. Кроме того, все SE играют значительную медиаторную роль: они являются суперантигенами и способны увеличивать ток-

сичность эндотоксинов более чем в 1000 раз, что может вызвать синдром токсического шока. Так, в случае попадания энтеротоксина в организм человека с тяжёлым инфекционным заболеванием (например, с сепсисом, пневмонией, ожогами) вместо пищевого отравления развивается иммунодефицитное состояние. Смертельная доза эндотоксина для людей составляет 1–2 мг, а при адекватном добавлении суперантигена, которым может выступать SE, минимальная смертельная доза эндотоксина может снижаться до пикограммов [4].

Известно, что стафилококки продуцируют не менее 26 различных суперантигенов (SAg), включая SE (SEA-E, SEG-J и SER-T); стафилококковые энтеротоксиноподобные токсины (SEI: SEIK-Q, -U, -V и -X Z); токсин токсического шока (TSST-1) [5]. SAg индуцируют V β -специфическую пролиферацию T-клеток наряду с высвобождением провоспалительных цитокинов, включая интерлейкины (IL) -1, -2, -6; фактор некроза опухоли (TNF- α), интерферон-гамма (IFN- γ) и хемокины CCL2 и CCL3 [6]. Кроме того, имеются данные, что SEC стимулирует секрецию IL-8 в эндотелиальных клетках аорты человека [7]. Неконтролируемое высвобождение провоспалительных медиаторов может привести к сыпи, лихорадке, коме и смерти от сильного шока. Наибольшее значение в практике имеют стафилококковые энтеротоксины типов: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, а также TSST-1, которые являются причиной 95% пищевых отравлений стафилококковой этиологии. SE могут быть пусковым механизмом в развитии артритов и поражениях миокарда желудочков сердца, особенно у детей, а также причиной внезапной младенческой смертности [8]. Следует отметить, что *S. aureus*, продуцирует три подтипа SEC (SEC1, SEC2, SEC3), которые различаются по изоэлектрическим точкам (C1-pI8,6; C2-pI7,8; C3-pI8,0), но иммунологически идентичны между собой и обладают суперантигенной активностью [9, 10].

Особый интерес представляет выявление классического энтеротоксина типа С, продуцируемого штаммами *S. aureus*, который может существенно повлиять на нормальное функционирование иммунной системы больного. SEC – один из наиболее изученных энтеротоксинов, поскольку он был обнаружен третьим и обычно продуцируется устойчивыми к метициллину штаммами *S. aureus* (MRSA) в очень высоких концентрациях, что может вызвать тяжёлые патологии [11].

Классические SE являются критическими факторами вирулентности при смертельном сепсисе, инфекционном эндокардите и повреждении почек. Следует отметить, что классические энтеротоксины (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) продуцируются в количестве от 80 до 100 мкг/мл в жидкой среде, тогда как вновь открытые SE – в количестве от 0,0001 до 0,03 мкг/мл [7]. Так, Н. Hogeveick и соавт. обнаружили у 15 из 22 пациентов с инфекционным эндокардитом поражение клапанного аппарата сердца, ассоциированное с персистенцией *S. aureus* [12]. Кроме того, исследование штаммов *S. aureus* от определённых пациентов с инфекционным эндокардитом продемонстрировало высокую распространённость генов SAg, кодирующих TSST-1, SEC, SEG и SEI, по сравнению с изолятами от инфекций мягких тканей [13].

Не менее важно определение одного из представителей вновь открытых токсинов, а именно энтеротоксина I, который образуется в значительно меньшем количестве, чем классические энтеротоксины, но также способен вызывать дисфункцию иммунной системы.

Целью данной работы было выявление частоты встречаемости стафилококковых энтеротоксинов (SE) типа SEC и SEI, продуцируемых штаммами *S. aureus*, выделенных от больных с различной нозологией, инфекционный процесс у которых протекает с выраженной интоксикацией без рвоты и кишечных расстройств.

Материалы и методы

В работе использовали культуры *S. aureus*, полученные из ГКБ № 1 им. Н.И. Пирогова, ГКБ им. С.П. Боткина и ожогового отделения НИИ СП им. Н.В. Склифосовского (Москва). Штаммы были любезно предоставлены профессором Д.Д. Меньшиковым.

Культивирование проводили на ферментативном казеиновом гидролизате с добав-

лением 1% сердечно-мозговой вытяжки (Difco). Выращивание штаммов *S. aureus* проводили в пробирках объемом 50 мл, в которые помещали 5 мл среды. Культивирование осуществляли на шуттель-аппарате при 210 об/мин в течение 24–30 ч при 37 °С. После культивирования микробные клетки удаляли центрифугированием в течение 15 мин при 10 000 об/мин. Наличие SEC и SEI в надосадочной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем с чувствительностью 1 нг/мл [14, 15].

Результаты

Частота встречаемости культур стафилококков, продуцирующих SE типов SEC и SEI, выделенных от больных разного профиля, представлена в табл. 1, 2. Как следует из данных табл. 1, среди 43 штаммов *S. aureus*, выделенных при пневмонии, частота обнаружения SEC составила 48,3%. Продуцентами SEI был 31 (72,1%) штамм стафилококков, и 20 штаммов продуцировали одновременно SEC и SEI (см. табл. 2). Из 13 изолятов, выделенных при ожоговых инфекциях, только 4 были энтеротоксигенными. При этом 3 (23,0%) изолята продуцировали SEC (см. табл. 1), 2 (15,4%) изолята – SEI и 1 (13,0%) изолят – одновременно SEC и SEI (см. табл. 2). Среди 11 культур *S. aureus*, выделенных при сепсисе, 4 (36,4%) штамма продуцировали SEC (см. табл. 1), 5 (45,5%) штаммов продуцировали SEI и 3 штамма (27,3%) – SEC и SEI (см. табл. 2). При исследовании нами обнаружено 4 штамма *S. aureus*, выделенных из катетеров, 2 из них продуцировали SEC и 3 штамма образовывали SEI. Кроме того, были выделены две культуры из зева и одна из плевральной жидкости. В двух штаммах из зева был обнаружен SEI и в одном – SEC и SEI. В одном штамме, выделенном из плевральной жидкости, были выявлены SEC и SEI.

Обсуждение

В данной работе было выявлено, что доля культур *S. aureus*, продуцирующих энтеротоксины SEC, при сепсисе значительно выше, чем штаммов – продуцентов SEB

Таблица 1

Частота встречаемости культур *S. aureus*, продуцирующих SEC, выделенных от больных с различными патологиями

Штаммы стафилококков, выделенные у больных	Количество исследуемых штаммов	Количество штаммов, продуцирующих SEC	
		абс.	%
При пневмонии	43	21	48,3
При ожоговых инфекциях	13	3	23,0
При сепсисе	11	4	36,4
Из катетеров	4	2	–
Из зева	2	1	–
Из плевральной жидкости	1	1	–

Таблица 2

Частота встречаемости культур *S. aureus*, продуцирующих SEI и одновременно SEC и SEI, выделенных от больных с различными патологиями

Штаммы стафилококков, выделенные у больных	Количество исследуемых штаммов	Количество штаммов, продуцирующих SEI		Количество штаммов, продуцирующих одновременно SEC и SEI	
		абс.	%	абс.	%
При пневмонии	43	31	72,1	20	46,5
При ожоговых инфекциях	13	2	15,4	1	13,0
При сепсисе	11	5	45,5	3	27,3
Из катетеров	4	3	–	2	–
Из зева	2	2	–	1	–
Из плевральной жидкости	1	1	–	1	–

(5,4%) и намного меньше, чем SEA (75,6%), что изучалось нами ранее и освещено в предыдущей публикации [16]. При пневмонии был обнаружен самый высокий процент SEI-положительных штаммов по сравнению со штаммами, которые продуцируют классические энтеротоксины SEA, SEB и SEC. При ожоговых инфекциях доля штаммов, продуцирующих SEC и SEI, составила 15,4 и 23,0% соответственно, что значительно ниже, чем SEA (92,9%).

Известно, что стафилококковые энтеротоксины образуются в условиях интенсивной аэрации. Лёгкие являются благоприятной средой для роста стафилококков и интенсивного токсинообразования. Так, в ранее опубликованной работе установлено, что среднее количество SEA (мкг/мл) было значительно больше у штаммов *S. aureus*, выделенных при пневмонии, чем при ожоговых ранах [16]. В связи с этим необходимо дальнейшее углублённое изучение роли токсинообразования SEA стафилококков при пневмонии, что может повлиять на тактику лечения для улучшения исходов пневмоний.

Стафилококки – самая распространённая причина сепсиса (бактериемии) [17]. Из всех бактериальных инфекций кровотока устойчивый к метициллину *S. aureus* ассоциировался с самым высоким показателем общей смертности (22,5%). *S. aureus* был наиболее часто встречающимся патогеном при всех типах бактериемии с ранним началом [18]. Бактериемия *S. aureus* часто возникает в результате кожных инфекций, инфицирования катетеров, обсеменения и загрязнения хирургических ран, вследствие пневмонии или внутривенного употребления наркотиков.

Имеются данные о том, что *S. aureus* способен адгезироваться на полимерных материалах и образовывать биоплёнки. Бактериальные клетки в биоплёнках чрезвычайно устойчивы к лекарственному лечению и атакам иммунной системы, что является распространённой причиной инфицирования катетеров, имплантатов, кардиостимуляторов [19, 20]. Для элиминации стафилококковых биоплёнок необходимо заменить или удалить полимерный материал из организма человека, что не всегда возможно из-за клинических обстоятельств, в результате чего значительно повышается заболеваемость и смертность пациентов [21]. До недавнего времени не было эффективного препарата против адгезии стафилококков на катетерах. Однако последние исследования показали, что катетеры, покрытые ауранофином, способны ингибировать рост MRSA, а также полностью ингибировать образование биоплёнки MRSA [22].

Следует отметить, что при антибиотикотерапии кроме колоний стафилококков нормального размера (1–3 мм) могут встречаться малые варианты колоний, размер которых примерно в 10 раз меньше. Они обладают меньшей вирулентностью, но большей способностью адгезироваться на полимерных материалах и часто не выявляются при посеве крови. Малые колонии стафилококков трудно обнаружить, их часто упускают из виду или неправильно идентифицируют из-за уменьшенного примерно в 6 раз времени регенерации [23]. Они, как правило, обладают высокой антибиотикорезистентностью к ванкомицину, рифампину, ампициллин-сульбактаму и гентамицину [24]. Малые варианты колоний *S. aureus* могут персистировать в клетках хозяина в течение нескольких лет и вызывать стойкие рецидивирующие инфекции, что способствует их внутриклеточной выживаемости и уклонению от иммунной системы [25]. Следовательно, существует острая потребность в новых и эффективных диагностических препаратах для определения продуктов жизнедеятельности стафилококков с целью проведения соответствующих терапевтических вмешательств.

Борьба со стафилококковыми инфекциями в последнее время значительно усложняется в связи с распространением MRSA. Резистентность золотистого стафилококка является причиной смерти около 19 000 госпитализированных пациентов в США, что аналогично количеству смертей от СПИДа, туберкулёза и вирусного гепатита, вместе взятых [26]. Несмотря на высокую частоту возникновения угрожающих жизни заболеваний и устойчивых к лекарствам инфекций, не существует успешной вакцины для предотвращения заболеваемости *S. aureus*.

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости своевременного обнаружения штаммов *S. aureus*, продуцирующих SEC у больных с пневмонией, ожогами и сепсисом, поскольку он является решающим фактором вирулентности, приводящим к летальному сепсису, инфекционному эндокардиту и синдрому токсического шока, с целью его элиминации. Кроме того, нами показана необходимость дальнейшего изучения роли не только классических энтеротоксинов, но и вновь открытых, поскольку их продукция также демонстрируется теми штаммами *S. aureus*, что выделены у больных с тяжёлыми заболеваниями.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 5-13, 17-26 см. REFERENCES)

3. Тибекин А.Т., Салодовников Ю.П., Филатов Н.Н., Кобзеева О.Б., Ермоленко М.В., Артамонова Л.И. и др. Редкая эпидемиологическая вспышка острых кишечных инфекций среди взрослых. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1998; (6): 116-8.
4. Рябиченко Е.В., Щегловитова О.Н., Бондаренко В.М., Езепчук Ю.В. Продукция медиаторов воспаления перитонеальными клетками мышей в условиях сочетанного воздействия стафилококкового энтеротоксина и липополисахарида. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1999; (6): 21-4.
14. Флуер Ф.С., Вертиев Ю.В., Закатов В.Н. Разработка иммуноферментной тест-системы для определения стафилококкового энтеротоксина типа I. В кн.: Покровский В.И., ред. «Молекулярная диагностика 2010»: Сборник трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Том 3. М.; 2010: 437-9.
15. Флуер Ф.С., Прохоров В.Я., Веснина А.Ф., Акатов А.К. Иммуноферментная тест-система для определения стафилококковых энтеротоксинов типа C. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2002; (6): 65-8.
16. Флуер Ф.С., Прохоров В.Я., Бондаренко В.М., Дмитренко О.А., Лашенкова Н.Н., Меньшикова Е.Д. и др. Частота выделения энтеротоксигенных стафилококков среди больных сепсисом, пневмонией и ожогами. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2005; (5): 3-6.

REFERENCES

1. Reddy P.N., Srirama K., Dirisala V.R. An update on clinical burden, diagnostic tools, and therapeutic options of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Dis. (Auckl)*. 2017; 10: 1179916117703999. Doi: <https://doi.org/10.1177/1179916117703999>
2. Fowler V.G. Jr., Olsen M.K., Corey G.R., Woods C.W., Cabell C.H., Reller L.B., et al. Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Arch. Intern. Med.* 2003; 163(17): 2066-72. Doi: <https://doi.org/10.1001/archinte.163.17.2066>
3. Tibekin A.T., Salodovnikov Yu.P., Filatov N.N., Kobzееva O.B., Ermolenko M.V., Artamonova L.I., et al. A rare epidemiological outbreak of acute intestinal infections in adults. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1998; (6): 116-8. (in Russian)
4. Ryabichenko E.V., Shcheglovitova O.N., Bondarenko V.M., Ezepchuk Yu.V. Production of inflammatory mediators by mouse peritoneal cells under the combined effects of staphylococcal enterotoxin and lipopolysaccharide. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1999; (6): 21-4. (in Russian)
5. Tuffs S.W., Haeryfar S.M.M., McCormick J.K. Manipulation of Innate and Adaptive Immunity by Staphylococcal Superantigens. *Pathogens*. 2018; 7(2): 53. Doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens7020053>
6. Fraser J.D., Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol. Rev.* 2008; 225(1): 226-43. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00681.x>
7. Salgado-Pabón W., Breshears L., Spaulding A.R., Merriman J.A., Stach C., Horswill A.R., et al. Superantigens Are Critical for *Staphylococcus aureus* Infective Endocarditis, Sepsis, and Acute Kidney Injury. *mBio*. 2013; 4(4): e00494-13. Doi: <https://doi.org/10.1128/mBio.00494-13>
8. Newbould M.J., Malam J., McClurary J.M., Morris J.A., Telford D.R., Barson A.J. Immunohistological localisation of staphylococcal toxic shock syndrome toxin (TSST-1) antigen in sudden infant death syndrome. *J. Clin. Patol.* 1989; 42(9): 935-9. Doi: <https://doi.org/10.1136/jcp.42.9.935>
9. Bohach G.A., Schlievert P.M. Conservation of the biological active portions of staphylococcal enterotoxin C1 and C2. *Infect. Immun.* 1989; 57(7): 2249-52.
10. Reiser R.F., Robbins R.N., Noletto A.L., Khoe G.P., Bergdoll M.S. Identification Purification and Some Physicochemical Properties of Staphylococcal enterotoxin C₃. *Infect. Immun.* 1984; 45(3): 625-30.
11. Schlievert P.M. Use of intravenous immunoglobulin in the treatment of staphylococcal and streptococcal toxic shock syndromes and related illnesses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 108(4 Suppl.): 107-10. Doi: <https://doi.org/10.1067/mai.2001.117820>
12. Hogevik H., Söderquist B., Tung H.S., Olaison L., Westberg A., Rydén C., et al. Virulence factors of *Staphylococcus aureus* strains causing infective endocarditis--a comparison with strains from skin infections. *APMIS*. 1998; 106(9): 901-8.

13. Nienaber J.J., Sharma Kuinkel B.K., Clarke-Pearson M., Lamletthton S., Park L., Rude T.H., et al. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* endocarditis isolates are associated with clonal complex 30 genotype and a distinct repertoire of enterotoxins and adhesins. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(5): 704-13. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir389>
14. Fluor F.S., Vertiev Yu.V., Zakatov V.N. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay system for determination of staphylococcal enterotoxin type I. In: Pokrovskiy V.I., ed. «*Molecular Diagnostics 2010*»: *Proceedings of the VII All-Russian Scientific-Practical Conference with International Participation. Volume 3 [«Molekulyarnaya diagnostika 2010»: Sbornik trudov VII vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem. Tom 3]*. Moscow; 2010: 437-9. (in Russian)
15. Fluor F.S., Prokhorov V.Ya., Vesnina A.F., Akatov A.K. Enzyme-linked immunosorbent assay system for the determination of staphylococcal enterotoxins type C. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2002; (6): 65-8. (in Russian)
16. Fluor F.S., Prokhorov V.Ya., Bondarenko V.M., Dmitrenko O.A., Lashenkova N.N., Men'shikova E.D., et al. The frequency of allocation of enterotoxigenic staphylococci among patients with sepsis, pneumonia and burns. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2005; (5): 3-6. (in Russian)
17. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S.M., Seifert H., Wenzel R.P., Edmond M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39(3): 309-17. Doi: <https://doi.org/10.1086/421946>
18. Shorr A.F., Tabak Y.P., Killian A.D., Gupta V., Liu L.Z., Kollef M.H. Healthcare-associated bloodstream infection: a distinct entity? Insights from a large U.S. database. *Crit. Care Med.* 2006; 34(10): 2588-95. Doi: <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000239121.09533.09>
19. Hogan S., Zapotoczna M., Stevens N.T., Humphreys H., O'Gara J.P., O'Neill E. Eradication of *Staphylococcus aureus* catheter-related biofilm infections using ML:8 and Citrox. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60(10): 5968-75. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00910-16>
20. Hogan S., Zapotoczna M., Stevens N.T., Humphreys H., O'Gara J.P., O'Neill E. In vitro approach for identification of the most effective agents for antimicrobial lock therapy in the treatment of intravascular catheter-related infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60(5): 2923-31. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.02885-15>
21. Kim E.Y., Saunders P., Yousefzadeh N. Usefulness of anti-infective lock solutions for catheter-related bloodstream infections. *Mt. Sinai J. Med.* 2010; 77(5): 549-58. Doi: <https://doi.org/10.1002/msj.20213>
22. Liu H., Shukla Sh., Vera-González N., Tharmalingam N., Mylonakis El., Beth Burgwyn Fuchs, et al. Auranofin Releasing Antibacterial and Antibiofilm Polyurethane Intravascular Catheter Coatings. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 37. Doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00037>
23. Kah B.C., Becker K., Loffler B. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(2): 401-27. Doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00069-15>
24. Seifert H., Wisplinghoff H., Schnabel P., von Eiff C. Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus* and Pacemaker-related Infection. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(10): 1316-8. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid0910.0302000>
25. Proctor R.A., von Eiff C., Kahl B.C., Becker K., McNamara P., Herrmann M., et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006; 4(4): 295-305. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1384>
26. Boucher H.W., Corey G.R. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46(Suppl. 5): 344-9. Doi: <https://doi.org/10.1086/533590>

Поступила 19.09.19

Принята в печать 24.09.19

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Иванова И.А., Труфанова А.А., Филиппенко А.В., Беспалова И.А.,
Омельченко Н.Д.

БАКТЕРИОФАГИ И ИММУННАЯ СИСТЕМА МАКРООРГАНИЗМА

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора,
344002, г. Ростов-на-Дону, Россия

В связи с появлением в последние годы антибиотикорезистентных штаммов бактерий лечение и профилактика различных инфекций бактериофагами вновь стали актуальным направлением исследований. Однако при использовании фагов в этих целях необходимо учитывать иммунные ответы макроорганизма на их введение. Сведения о влиянии бактериальных вирусов на систему врождённого и адаптивного иммунитета млекопитающих в доступной литературе немногочисленны и противоречивы. Этот вопрос требует дальнейшего детального изучения, особенно при разработке новых лечебно-профилактических биопрепаратов на основе бактериофагов.

Ключевые слова: обзор; бактериофаги; иммунная система; врождённый и специфический иммунитет; терапия; профилактика.

Для цитирования: Иванова И.А., Труфанова А.А., Филиппенко А.В., Беспалова И.А., Омельченко Н.Д. Бактериофаги и иммунная система макроорганизма. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6): 79-85

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-79-85>

Ivanova I.A., Trufanova A.A., Filippenko A.V., Bepalova I.A., Omelchenko N.D.

BACTERIOPHAGES AND THE IMMUNE SYSTEM OF THE MACROORGANISM

Federal State Health Institution the Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control of the Federal Service on Consumer Rights Protection and Human Welfare Supervision, Rostov-on-Don, 344002, Russia

Due to the emergence of antibiotic-resistant strains of bacteria in recent years, the treatment and prevention of various infections with bacteriophages have again become an important area of research.

However, when using phages for this purpose, it is necessary to take into account the immune responses of a macroorganism to their introduction. The data about impact of bacterial viruses on the innate and adaptive immunity system of mammals in available literature are few and contradictory. This issue requires further detailed study, especially in the development of new therapeutic and prophylactic biological products based on bacteriophages.

Keywords: review; bacteriophages; immune system; innate and specific immunity; therapy; prevention.

For citation: Ivanova I.A., Trufanova A.A., Filippenko A.V., Bepalova I.A., Omelchenko N.D. Bacteriophages and the immune system of the macroorganism. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6): 79-85. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-79-85>

For correspondence: Inna A. Ivanova, Phd (Biology), Leading Researcher with Acting Head of the Immunology Laboratory Particularly Dangerous Infections, the Federal Government Health Institution «Rostov-on-Don Plague Control Research Institute», Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: ivanova_ia@antiplague.ru

Для корреспонденции: Иванова Инна Александровна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник с врио зав. лабораторией иммунологии особо опасных инфекций. ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону. E-mail: ivanova_ia@antiplague.ru

Information about authors:Иванова И.А., <https://orcid.org/0000-0001-7068-4071>Труфанова А.А., <https://orcid.org/0000-0002-4770-5994>Филиппенко А.В., <https://orcid.org/0000-0002-1103-4244>Беспалова И.А., <https://orcid.org/0000-0002-7503-9183>Омельченко Н.Д., <https://orcid.org/0000-0001-5208-7724>**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 12 July 2019

Accepted 24 September 2019

Бактериофаги, используемые для лечения бактериальных заболеваний человека, с середины XX века были вытеснены антибиотиками. Однако, по заявлению Всемирной организации здравоохранения, лекарственная устойчивость микроорганизмов может в скором времени нивелировать достижения современной медицины, в том числе в борьбе с инфекционными заболеваниями, сделав их неуправляемыми [1]. В связи с этим в последние десятилетия лечение и профилактика вирусами бактерий вновь стали актуальными направлениями [2].

Преимущества бактериофагов перед антибиотиками заключаются в следующем: они способны уничтожать бактерии, устойчивые к антибиотикам; свободно проникают в ткани организма человека и животного, не нарушая баланса микрофлоры хозяина; не вызывают побочных эффектов; сочетаются со многими лекарственными препаратами; оказывают иммуностимулирующее действие и не обладают иммуносупрессивным влиянием [3]. Благодаря вышеперечисленному в настоящее время бактериофаги активно используются в качестве антимикробных препаратов при разных бактериальных инфекциях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), ЛОР-органов, дыхательных путей, урогенитального тракта, генерализованных септических заболеваниях, ожоговых ранах, хирургических инфекциях и т. д. Эти препараты нашли широкое применение и с профилактической целью в условиях чрезвычайных ситуаций природного характера (наводнения и т. д.) [4, 5], а также при инфекциях, связанных с оказанием медицинской помощи [2].

Однако существуют противоречивые сведения о влиянии фагов на врожденный и адаптивный иммунитет млекопитающих [6]. Этот вопрос требует детального изучения, особенно при разработке новых лечебно-профилактических биопрепаратов на основе бактериофагов [7].

Известно, что фаги способны проникать через эпителиальные барьеры слизистых оболочек благодаря специализированным клеткам иммунной системы (М-клеткам, бокаловидным) и, возможно, клеткам эпителия кишечника и других отделов ЖКТ [8]. Независимо от способа введения, бактериофаги поступают в общий ток крови. После перорального приема фаговые частицы обнаруживаются в кровотоке через 1 ч. Затем они транспортируются в лимфатические узлы, печень и селезенку, где и адсорбируются [9]. Необходимо отметить, что скорость попадания фагов, так же, как и бактерий, из ЖКТ в кровь может существенно увеличиваться при воспалительном ответе [3]. Выводятся фаги из организма через кишечник [10] и почки. После однократного приема пациентами бактериальные вирусы выделялись с мочой в течение 5–6 сут с постепенным уменьшением титра [9].

Благодаря способности проникать в кровяное русло и ткани бактериофаги взаимодействуют с клетками иммунной системы как локально, так и системно [11, 12].

При первом попадании в макроорганизм фаги встречаются с эффекторами врожденного иммунитета. Они взаимодействуют с макрофагами, дендритными и эпителиальными клетками и посредством трансмембранных рецепторов, распознающих разнообразные типы патоген-ассоциированных молекулярных маркеров, активируют экспрессию генов разнообразных цитокинов [13]. Некоторые фаги могут контактировать с клетками иммунной системы посредством клеточных рецепторов, принадлежащих к семейству β -интегринов, а также используя последовательность Lys-Gly-Asp, находящуюся в капсидном белке gp24. Аналогичная последовательность присутствует в лиганде CD40, играющем важную роль в активации эндотелиальных клеток, тромбоцитов, Т- и В-лимфоцитов, в развитии воспаления [14].

В то же время показано, что очищенный фаг T4 и лизаты фагов *Echerichia coli* не оказывают влияния на экспрессию TLR2 и TLR4 на моноцитах человека [15].

Иммунная система может распознавать и инактивировать вирусные частицы [16, 17]. Особенно быстро уничтожение фагов осуществляется в печени. Так, клетки Купфера поглощают их в четыре раза эффективнее, чем макрофаги селезенки. Выявлено, что в печени уничтожается до 99% бактериофагов в течение 30 мин после введения [18].

Фаги влияют на фагоцитоз и развитие воспалительного ответа, но, в зависимости от их вида, дозы и способа введения, могут либо усиливать, либо ингибировать эти процессы [16, 17].

Иностранцами авторами обнаружено, что лечение инфицированных и интактных мышей фагами не влияло на интенсивность фагоцитоза гранулоцитами и моноцитами крови. Аналогичные результаты получены при изучении действия гомо- и гетерологичных бактериальных вирусов в разных титрах на фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов крови человека, а также на миграцию этих клеток [14].

Однако российскими исследователями показано, что препарат Пиобактериофаг, в отличие от антибиотиков, при местном введении в пазухи улучшал показатели завершённости фагоцитоза, что свидетельствовало о снижении интенсивности воспаления и восстановлении адекватного иммунного ответа слизистых оболочек носа [19]. Благодаря способности бактериофагов активировать фагоцитоз и повышать метаболическую активность нейтрофилов удалось предотвратить рецидивы инфекции и хронизацию воспалительного процесса [20, 21], что особенно важно при лечении хронических воспалительных заболеваний на фоне иммуносупрессивных состояний и бактерионосительства [9, 22, 23].

Описано также, что фаги снижают чрезмерную продукцию активных форм кислорода при бактериальных инфекциях, предупреждая окислительный стресс и повреждение тканей [14]. Кроме этого, сами вирусы вызывают высвобождение небольшого количества активных форм кислорода [21].

Имеются данные, свидетельствующие о том, что фаги и их белки не только не стимулируют образование медиаторов воспаления [14, 24], но и способны уменьшать воспаление, вызванное иммунным ответом на бактерии [16]. Высказано предположение, что фаги могут обладать защитным потенциалом, не только уничтожая патогены, но и подавляя местные иммунные и воспалительные реакции в кишечнике, тем самым способствуя поддержанию иммунного гомеостаза [14]. В то же время за счёт высвобождения большого количества эндотоксина бактериофаги могут вызывать воспаление и повышение уровней фактора некроза опухоли (ФНО α), интерлейкинов (ИЛ) -1 β и -6 [25, 26].

Как макромолекулярная структура, бактериофаг представляет собой антиген и обладает иммуногенностью [7, 27]. Показано, что на его антигенную активность могут влиять даже незначительные изменения в составе белков фаговой оболочки [17].

После попадания бактериофагов в макроорганизм запускаются механизмы специфического гуморального и клеточного иммунных ответов. Идёт процессинг фаговых антигенов антигенпредставляющими клетками. Фаговые антигены могут быть представлены дендритными клетками Т-лимфоцитам, что приводит к развитию клеточного иммунитета и высвобождению цитокинов [6].

Некоторыми авторами показано, что иммунная система позвоночных не индуцирует специфический клеточный ответ, и Т-лимфоциты не участвуют в элиминации бактериофагов [16, 17]. Однако другие исследователи отмечали, что под влиянием бактериофагов уровень лимфоцитов увеличивался, преимущественно за счёт Т-клеток [28], причём этот процесс усиливался при бустерной иммунизации фагами. Так, *in vitro* выявлено усиление пролиферации спленоцитов мышей, предварительно иммунизированных сальмонеллёзными бактериофагами, по сравнению с таковой у интактных животных [14]. Есть сведения о том, что фаги могут, наоборот, ингибировать активацию и пролиферацию Т-клеток человека *in vitro* [29].

Сведения, касающиеся индукции гуморального иммунного ответа на бактериофаги, в литературе тоже неоднозначны [30]. Исследования гуморального иммунитета, с одной стороны, показали отсутствие достоверных различий в содержании иммуноглобулинов на фоне применения фагов [31], а с другой стороны, повторный курс их приёма сопровождается подъёмом уровня антифаговых антител [17]. После однократного приёма фага F8 *Pseudomonas* продукция IgM у мышей достигала максимума примерно через 5–10 дней, а затем несколько снижалась. После повторного введения фага был зарегистрирован достаточно высокий уровень антифаговых IgG [32]. Следует отметить, что сыворотка, содержащая IgM, только снижала активность фага, а сыворотка с IgG полностью инактивировала его. Комплемент сыворотки в присутствии специфических антител также уменьшал жизнеспособность бактериофагов. Такой механизм свидетельствует о том, что фаг вызывает иммунный ответ, характерный для эукариотических вирусов [33]. Ферменты бактериофагов, благодаря своей белковой природе, также стимулируют быстрый иммунный ответ и выработку иммуноглобулинов [16, 34].

Экспериментально доказано, что высокий уровень продукции специфических антител способствует быстрой элиминации фагов и является одной из причин снижения эффективности фаготерапии [18, 35]. У новорождённых и детей до года нейтрализующие антитела обнаруживаются в сыворотке крови в меньшем количестве, что делает применение фагов в этих группах более эффективным [10].

Данные литературы свидетельствуют о том, что бактериофаги могут оказывать как положительное влияние на иммунный статус человека [28], стимулируя выработку цитокинов, пролиферацию

Т-клеток, синтез антител, фагоцитоз [36], так и вызывать лишь кратковременное увеличение функциональной активности Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток и их количества в периферической крови [14]. Возможно, это связано с тем, что успех фаговой терапии во многом зависит от иммунной системы пациента [17].

Известно о способности бактериофагов выступать в роли иммуногенных носителей и адъювантов [27]. В то же время они могут подавлять специфичные и неспецифичные иммунные реакции. Например, бактериальные вирусы ингибируют продукцию ИЛ-2, ФНО α , интерферона- γ лейкоцитами человека [29].

Фаги снижают воспалительную инфильтрацию трансплантата, которая может привести к его повреждению и даже к потере, а также непосредственно ингибируют аллотрансплантат-индуцированную активацию Т-клеток [27].

Препараты бактериофагов, подобно пробиотикам, регулируют механизмы иммунитета в кишечнике [37]. Доказано стимулирующее действие стафилококкового фага на бифидобактерии [28, 38, 39]. При этом описана способность бактериофагов поддерживать иммунную толерантность к чужеродным антигенам микроорганизмов кишечника [29]. Бактериальные вирусы способствуют нормализации микрофлоры, участвуют в поддержании колонизационной резистентности и оральной толерантности, что обеспечивает нормализацию механизмов гуморального и клеточного иммунитета [3].

Таким образом, данные, представленные в обзоре, отражают неоднозначное мнение исследователей о влиянии бактериофагов на иммунную систему и их участии в регуляции иммунитета. При оценке действия вирусов бактерий на макроорганизм следует учитывать природу иммунного ответа на их введение, которая зависит от физико-химических свойств фага, способа, дозы, кратности применения [13, 32, 40] и иммунного статуса пациента [32, 41, 42]. При разработке новых препаратов и использовании известных бактериофагов в лечебных и профилактических целях для создания условий их длительного персистирования в организме необходимо учитывать активацию вирусными частицами иммунных реакций человека [9], а также вероятность элиминации фагов специфическими антителами [35].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 6, 7, 11-18, 21, 24-26, 29, 32-34, 36, 37, 40-42 см. REFERENCES)

- ВОЗ. Устойчивость к противомикробным препаратам. Информационный бюллетень. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Зуева Л.П., Асланов Б.И., Акимкин В.Г. Современный взгляд на роль бактериофагов в эволюции госпитальных штаммов и профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; (3): 100-7.
- Топчий Н.В., Топорков А.С. Бактериофаги в лечении острых кишечных инфекций. *Медицинский совет*. 2015; (8): 74-81.
- Алсынбаев М.М., Медведев Ю.А., Туйгуно М.М. *Биопрепараты и ведущие направления их лечебно-профилактического применения*. Уфа; 2008.
- Красильников И.В., Лобастова А.К., Лыско К.А. Краткий обзор современного состояния и перспективных направлений развития производства и применения лечебно-профилактических препаратов бактериофагов. *Вестник биотехнологии*. 2010; (2): 28-33.
- Бехтерева М.К., Иванова В.В. Место бактериофагов в терапии инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта. *Consilium medicum. Педиатрия*. 2014; (2): 24-9.
- Катер Э., Сулаквелидзе А. *Бактериофаги: биология и практическое применение*. М.: Научный мир; 2012.
- Пагава К.И., Гачечиладзе К.К., Коринтели И.А., Дзулиашвили М.Г., Алавидзе З.И., Хойле Н. и др. Что происходит при пероральном приеме бактериофага ребенком? *Georgian Medical News*. 2011; (7-8): 101-5.
- Арефьева Н.А., Азнабаева Л.Ф., Ворошилова Н.Н., Султанов Н.М. Сравнительное изучение влияния способов лечения на состояние местного иммунитета слизистых оболочек носа больных хроническим гнойным риносинуситом. *Фундаментальные исследования*. 2007; (4): 49.
- Лазарева Е.Б. Бактериофаги для лечения и профилактики инфекционных заболеваний. *Антибиотики и химиотерапия*. 2003; 48(1): 36-40.
- Ильина Т.С. Структурная организация и механизмы перемещений генных кассет, кодирующих резистентность к антибиотикам и факторы вирулентности бактерий. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2001; (1): 3-12.
- Карабелеш Е.Е., Ткаченко С.А., Панкратов С.М., Демедюк О.И. Применение бактериофагов, как концепция лечебного и профилактического направления в медицине. *Актуальные проблемы транспортной медицины*. 2008; 1(11): 135-9.
- Бондаревич Н.В., Новик Г.И. Бактериофаги и иммунный ответ организма человека. *Вестник национальной академии наук Белоруссии. Серия медицинские науки*. 2015; (2): 112-6.
- Чушков Ю.В. Бактериофаги в лечении и профилактике инфекционных заболеваний. *Фарматека*. 2011; (6): 34-41.

30. Алешкин В.А., Новикова Л.И., Бочкарева С.С., Алешкин А.В., Ершова О.Н., Киселева И.А. и др. Проблема антифагового иммунного ответа при энтеральной фаготерапии. В кн.: *Материалы научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе»*. Новосибирск; 2016.
31. Дарбеева О.С., Жиленков Е.Л. Бактериофаги. В кн.: *Лабинская А.С., ред. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований*. М.; 2004.
35. Бочкарева С.С., Алешкин А.В., Ершова О.Н., Новикова Л.И., Афанасьев С.С., Киселева И.А. и др. Иммунологические аспекты фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в отделении нейрореанимации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; (4): 42-8.
38. Алешкин А.В., Воложанцев Н.В., Светоч Э.А., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Борзилов А.И. и др. Бактериофаги как пробиотики и средства деконтаминации пищевых продуктов. *Астраханский медицинский журнал*. 2012; (3): 31-9.
39. Старкова О.М., Одегова Т.Ф., Главатских И.А. Определение емкости рынка бактериофагов на региональном уровне. В кн.: *Фармация на современном этапе – проблемы и достижения. Часть 1*. М.; 2000: 133-5.

REFERENCES

1. WHO. Antimicrobial resistance. Fact Sheet. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. Zueva L.P., Aslanov B.I., Akimkin V.G. A modern view of the role of bacteriophages in the evolution of hospital strains and the prevention of infections associated with medical care. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; (3): 100-7. (in Russian)
3. Topchiy N.V., Toporkov A.S. Bacteriophages in the treatment of acute intestinal infections. *Meditinskiy sovet*. 2015; (8): 74-81. (in Russian)
4. Alsynbaev M.M., Medvedev Yu.A., Tuyguno M.M. *Biopreparations and the Leading Directions of their Therapeutic and Prophylactic Use [Biopreparaty i vedushchie napravleniya ikh lechebno-profilakticheskogo primeneniya]*. Ufa; 2008. (in Russian)
5. Krasil'nikov I.V., Lobastova A.K., Lysko K.A. A brief overview of the current state and promising areas of development of production and use of therapeutic and prophylactic preparations of bacteriophages. *Vestnik biotekhnologii*. 2010; (2): 28-33. (in Russian)
6. Duerkop B.A., Hooper L.V. Resident viruses and their interactions with the immune system. *Nat. Immunol*. 2013; 14(7): 654-9. Doi: <https://doi.org/10.1038/ni.2614>
7. Domingo-Calap P., Delgado-Martínez J. Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. *Antibiotics (Basel)*. 2018; 7(3): 66. Doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030066>
8. Bekhtereva M.K., Ivanova V.V. The place of bacteriophages in the treatment of infectious diseases of the gastrointestinal tract. *Consilium medicum. Pediatriya*. 2014; (2): 24-9. (in Russian)
9. Kater E., Sulakvelidze A. *Bacteriophages: Biology and Practical Application [Bakteriofagi: biologiya i prakticheskoe primeneniye]*. Moscow: Nauchnyy mir; 2012. (in Russian)
10. Pagava K.I., Gachechiladze K.K., Korinteli I.A., Dzuliasvili M.G., Alavidze Z.I., Khoyle N., et al. What happens when oral bacteriophage is taken by a child? *Georgian Medical News*. 2011; (7-8): 101-5. (in Russian)
11. Duerr D.M., White S.J., Schluesener H.J. Identification of peptide sequences that induce the transport of phage across the gastrointestinal mucosal barrier. *J. Virol. Methods*. 2004; 116(2): 177-80. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.012>
12. Hamzeh-Mivehroud M., Mahmoudpour A., Rezazadeh H., Dastmalchi S. Non-specific translocation of peptide-displaying bacteriophage particles across the gastrointestinal barrier. *Eur. J. Pharm Biopharm*. 2008; 70(2): 577-81. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.06.005>
13. Kaur T., Nafissi N., Wasfi O., Sheldon K., Wettig S., Slavcev R. Immunocompatibility of bacteriophages as nanomedicines. *J. Nanotechnol*. 2012; (1): 1-13. Doi: <https://doi.org/10.1155/2012/247427>
14. Górski A., Dąbrowska K., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Łusiak-Szelachowska M., Jończyk-Matysiak E., et al. Phages and immunomodulation. *Future Microbiol*. 2017; 12(10): 905-14. Doi: <https://doi.org/10.2217/FMB-2017-0049>
15. Flaherty J.E., Harbaugh B.K., Jones J.B., Somodi G.C. H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geraniums. *Hortscience*. 2001; 36: 90-100. Doi: <https://doi.org/10.21273/hortsci.36.1.98>
16. Górski A., Międzybrodzki R., Borysowski J., Dąbrowska K., Wierzbicki P., Ohams M., et al. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv. Virus Res*. 2012; 83: 41-71. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00002-5>
17. Maciejewska B., Olszak T., Drulis-Kawa Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application? *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2018; 102(6): 2563-81. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8811-1>
18. Merril C.R., Scholl D., Adhya S.L. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2003; 2(6): 489-97. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrd1111>
19. Aref'eva N.A., Aznabaeva L.F., Voroshilova N.N., Sultanov N.M. Comparative study of the influence of treatment methods on the state of local immunity of the nasal mucosa of patients with chronic purulent rhinosinusitis. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2007; (4): 49. (in Russian)
20. Lazareva E.B. Bacteriophages for the treatment and prevention of infectious diseases. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2003; 48(1): 36-40. (in Russian)
21. Przerwa A., Zimecki M., Switala-Jeleń K., Dąbrowska K., Krawczyk E., Łuczak M., et al. Effects of bacterio-

- phages on free radical production and phagocytic functions. *Med. Microbiol. Immunol.* 2006; 195(3): 143-50. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00430-006-0011-4>
22. Il'ina T.S. Structural organization and mechanisms of gene cassette movements encoding antibiotic resistance and bacterial virulence factors. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2001; (1): 3-12. (in Russian)
 23. Karabelesh E.E., Tkachenko S.A., Pankratov S.M., Demedyuk O.I. The use of bacteriophages as a concept of therapeutic and preventive direction in medicine. *Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny.* 2008; 1(11): 135-9. (in Russian)
 24. Mills S., Shanahan F., Stanton C., Hill C., Coffey A., Ross R.P. Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. *Gut. Microbes.* 2013; 4(1): 4-16. Doi: <https://doi.org/10.4161/gmic.22371>
 25. Maes M., Kubera M., Leunis J., Berk M. Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: Further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. *J. Affect. Dis.* 2012; 141(1): 55-62. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2012.02.023>
 26. Tetz G.V., Ruggles K.V., Zhou H. et al. Bacteriophages as potential new mammalian pathogens. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 7043. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07278-6>
 27. Bondarevich N.V., Novik G.I. Bacteriophages and the immune response of the human body. *Vestnik natsional'noy akademii nauk Belorussii. Seriya meditsinskie nauki.* 2015; (2): 112-6. (in Russian)
 28. Chushkov Yu.V. Bacteriophages in the treatment and prevention of infectious diseases. *Farmateka.* 2011; (6): 34-41. (in Russian)
 29. Górski A., Ważna E., Dąbrowska B.W., Dąbrowska K. Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006; 46(3): 313-9. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00044.x>
 30. Aleshkin V.A., Novikova L.I., Bochkareva S.S., Aleshkin A.V., Ershova O.N., Kiseleva I.A., et al. The problem of antiphage immune response in enteral phage therapy. In: *Materials of the Scientific-Practical Conference «Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases at the Present Stage» [Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Diagnostika i profilaktika infektsionnykh bolezney na sovremennom etape»]*. Novosibirsk; 2016. (in Russian)
 31. Darbeeva O.S., Zhilenkov E.L. Bacteriophages. In: Labinskaya A.S., ed. *General and Sanitary Microbiology with Technique of Microbiological Researches [Obshchaya i sanitarnaya mikrobiologiya s tekhnikoy mikrobiologicheskikh issledovaniy]*. Moscow; 2004. (in Russian)
 32. Hodyra-Stefaniak K., Miernikiewicz P., Drapała J., Drab M., Jończyk-Matysiak E., Lecion D., et al. Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate in vivo. *Sci. Rep.* 2015; 5: 14802. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep14802>
 33. Hangartner L., Zinkernagel R.M., Hengartner H. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6(3): 231-43. Doi: <https://doi.org/10.1038/nri1783>
 34. Fischetti V.A. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control gram-positive pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010; 300: 357-62. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.002>
 35. Bochkareva S.S., Aleshkin A.V., Ershova O.N., Novikova L.I., Afanas'ev S.S., Kiseleva I.A., et al. Immunological aspects of phage therapy of infections associated with medical care in the Department of neuro-intensive care. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2017; (4): 42-8. (in Russian)
 36. Borysowski J., Dąbrowska K., Ohams M. *The Response of the Immune System to Phage: Potential Associations with Phage Therapy. Bacteriophages and Probiotics – Alternatives to Antibiotics.* Tbilisi, Georgia; 2012.
 37. Stagg J.A., Hart A.L., Knight S.C., Kamm M.A. Microbial-gut interactions in health and disease. Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2004; 18(2): 255-70. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.10.004>
 38. Aleshkin A.V., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Aleshkin V.A., Afanas'ev S.S., Borzilov A.I., et al. Bacteriophages as probiotics and food decontamination agents. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2012; (3): 31-9. (in Russian)
 39. Starkova O.M., Odegova T.F., Glavatskikh I.A. Determination of bacteriophage market capacity at the regional level. In: *Pharmacy at the Present Stage-Problems and Achievements. Part I [Farmatsiya na sovremennom etape – problemy i dostizheniya. Chast' I]*. Moscow; 2000: 133-5. (in Russian)
 40. Stern A., Sorek R. The phage-host arms race: Shaping the evolution of microbes. *Bioessays.* 2010; 33(1): 43-51. Doi: <https://doi.org/10.1002/bies.201000071>
 41. Cerveny K.E., Depaola A., Duckworth D.H., Gulig P.A. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infect. Immun.* 2002; 70: 6251-62. Doi: <https://doi.org/10.1128/iai.70.11.6251-6262.2002>
 42. Nilsson A.S. Phage therapy – constraints and possibilities. *Ups. J. Med. Sci.* 2014; 119(2): 192-8. Doi: <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.902878>

Поступила 12.07.19

Принята в печать 24.09.19

ИСТОРИЯ НАУКИ

© СОМОВА Л.М., АНДРЮКОВ Б.Г., 2019

Сомова Л.М., Андрюков Б.Г.

К 60-ЛЕТИЮ ОТКРЫТИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ СКАРЛАТИНОПОДОБНОЙ ЛИХОРАДКИ

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, 690087, г. Владивосток, Россия

Приведены приоритетные результаты российских исследователей, полученные за 60 лет изучения дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (ДСЛ). Доказано, что это ранее неизвестное в медицине клинико-эпидемическое проявление псевдотуберкулёза возникло в результате приобретения возбудителем болезни особой внехромосомной генетической информации (плазмиды pVM 82). Установлено, что ДСЛ связана с конкретной клональной линией *Yersinia pseudotuberculosis*, распространённой в России. Результаты многолетнего изучения ДСЛ стали основой для раскрытия фундаментальных вопросов медицинской микробиологии и экологии (концепции о психрофильности патогенных бактерий и значении этого явления в эпидемиологии и патогенезе вызываемых ими болезней, сапрофитизме и паразитизме патогенных бактерий), а также для развития учения о сапрозоонозах (сапронозах) с идентификацией генетико-биохимических механизмов адаптации патогенных бактерий к изменяющимся экологическим условиям. Актуальность дальнейших исследований по проблеме ДСЛ связана с установлением значимости гетероморфизма и персистенции *Y. pseudotuberculosis* в межэпидемический период.

Ключевые слова: дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка; *Yersinia pseudotuberculosis*; психрофильность, сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий; сапрозоонозы.

Для цитирования: Сомова Л.М., Андрюков Б.Г. К 60-летию открытия и изучения дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6): 85-89.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-85-89>

Somova L.M., Andryukov B.G.

ON THE 60TH ANNIVERSARY OF DISCOVERY AND STUDY OF THE FAR EASTERN SCARLET-LIKE FEVER

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russia

The priority results of Russian researchers obtained over a 60-year period of studying Far Eastern scarlet-like fever (FESLF) are presented. It is proved that this previously unknown clinical-epidemic manifestation of pseudotuberculosis in medicine occurred as a result of the acquisition of special extrachromosomal genetic information (plasmid pVM 82) by the pathogen. FESLF was found to be associated with a specific clonal line of *Yersinia pseudotuberculosis*, extended in Russia. The results of a long-term study of DSL became the basis for revealing the fundamental issues of medical microbiology and ecology, namely: the concept of the psychrophilicity of pathogenic bacteria and the significance of this phenomenon in the epidemiology and pathogenesis of the diseases they cause, saprophytism and parasitism of pathogenic bacteria, as well as for the development of the doctrine of saprozoonoses (saprozooses) with identification of genetic and biochemical mechanisms of pathogenic bacteria adaptation to changing environmental conditions. The relevance of further research on the problem of FESLF is associated with establishment of the significance of heteromorphism and persistence of *Y. pseudotuberculosis* in the interepidemic period.

Для корреспонденции: Сомова Лариса Михайловна, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии НИИ ЭИ имени Г.П. Сомова. 690087, г. Владивосток.
E-mail: l_somova@mail.ru

Keywords: Far Eastern scarlet-like fever; *Yersinia pseudotuberculosis*; psychrophilicity, saprophytism and parasitism of pathogenic bacteria; saprozooses.

For citation: Somova L.M., Andryukov B.G. On the 60th anniversary of discovery and study of the far eastern scarlet-like fever. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6):85-89. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-85-89>

For correspondence: Larisa M. Somova, MD, Professor. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russia. E-mail: l_somova@mail.ru

Information about authors:

Somova L.M., <https://orcid.org/0000-0003-4482-1826>

Andryukov B.G., <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 09 April 2019

Accepted 11 June 2019

В 1959 г., т.е. ровно 60 лет назад, впервые во Владивостоке были зарегистрированы вспышки инфекционной болезни, охватившей до нескольких сотен человек, которая по сходству клинических проявлений со скарлатиной до установления этиологии получила название дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (ДСЛ) [1]. В последующие годы было установлено, что ДСЛ распространена на всей территории Дальнего Востока, включая Приморский и Хабаровский края, Амурскую, Магаданскую, Сахалинскую и Камчатскую области.

История открытия и изучения ДСЛ удивительна и уникальна. Выделено несколько этапов, каждый из которых давал новое представление о патологии, вызываемой *Yersinia pseudotuberculosis*. По существу псевдотуберкулёз был открыт трижды:

- *первый этап* (1883–1953 гг.) – выделен возбудитель *Y. pseudotuberculosis*, который ассоциировали с определённой патологией у животных, напоминавшей туберкулёзные изменения;
- *второй этап* (1953–1965 гг.) – установлена роль *Y. pseudotuberculosis* в патологии органов брюшной полости человека в виде острого аппендицита и мезентериального лимфаденита;
- *третий этап* (с 1959 г. по настоящее время) – зарегистрированы вспышки ДСЛ.

Только после 6 лет безуспешных поисков, применив новую для того времени методику холодного посева материала от больных, В.А. Знаменский и А.К. Вишняков установили иерсиниозную этиологию ДСЛ [1]. Тогда же Г.П. Сомов высказал положение о том, что эта ранее неизвестная в медицине болезнь – новое клинко-эпидемическое проявление псевдотуберкулёза у человека, и дал ему название «эпидемический псевдотуберкулёз» [1].

До середины 1950-х годов псевдотуберкулёз у человека встречался как редкое спорадическое заболевание органов брюшной полости и был известен лишь в европейских странах, в Северной и Южной Америке, Японии, Индии. Выявление первых случаев псевдотуберкулёза у людей за рубежом стало результатом случайных находок при летальных септических заболеваниях, диагностированных на основании бактериологического исследования секционного материала.

С 1959 г. комплексные исследования по изучению новой болезни были начаты в России под руководством Г.П. Сомова, тогда ещё мало известного широкой медицинской общественности кандидата наук. Изначально главную роль в этом сыграли специалисты медицинской службы Тихоокеанского флота, а затем исследования по всестороннему изучению ДСЛ были сосредоточены во Владивостокском НИИ эпидемиологии и микробиологии совместно с клиницистами Владивостокского медицинского института.

В 1960–1990-х годах было проведено комплексное изучение этиологии и эпидемиологии, раскрыты вопросы патогенеза и детально охарактеризованы патоморфология, клиника и иммунология псевдотуберкулёза, вопросы его лечения, а также разработана система профилактических и противозидемических мероприятий, широко внедрённая в практическое здравоохранение. За большой вклад в изучение ДСЛ и приоритетные достижения в 1989 г. группа учёных и специалистов (Г.П. Сомов, Н.Н. Беседнова, М.А. Борисова, М.Ф. Дзадзиева, В.А. Знаменский, А.М. Королук, Г.Д. Серов, Н.Ф. Тимченко, Ф.Н. Шубин, Г.В. Ющенко) были удостоены Государственной премии СССР.

В конце 1980-х годов в связи с внедрением молекулярно-генетических методов исследования было высказано предположение и получены доказательства того, что новое клинко-эпидемическое проявление псевдотуберкулёза в форме ДСЛ возникло в результате приобретения псевдотуберкулёзным микробом особой внехромосомной генетической информации – плазмиды с молекулярной массой 82 МДа (плазида рVM 82), которая и определяет высокую эпидемичность штаммов возбудителя болезни [2].

В 2000-х годах было доказано, что ДСЛ связана с конкретной клональной линией *Y. pseudotuberculosis*, распространённой в России и характеризующейся определённым плазмидным профилем (pVM 82 МДа, pYV 48 МДа), сиквенстипом (2ST) и аллелем гена *yadA* (1-й аллель) [3]. Утвердилось суждение о том, что важность и значимость углублённого изучения псевдотуберкулёза и иерсиниозов в целом обусловлены принадлежностью этих заболеваний к эмерджентным инфекциям, одновременно с особо опасной чумной инфекцией. Как оказалось, возбудитель ДСЛ *Y. pseudotuberculosis* является генетическим прародителем возбудителя чумы *Y. pestis* [4], и он был определён как модельная система для изучения эволюции патогенов рода *Yersinia*, главным образом для раскрытия молекулярных механизмов взаимодействия патогенных *Yersiniae* в системе «микроорганизм–хозяин».

Результаты многолетней работы по изучению ДСЛ стали лишь вершиной айсберга, открыв дорогу для масштабных взаимосвязанных разработок по перспективному научному направлению – раскрытию фундаментальных вопросов общей и медицинской микробиологии, которые касаются механизмов существования патогенных бактерий в различных условиях обитания.

Так, ещё в 1974 г. Г.П. Сомов выдвинул принципиально новую концепцию о психрофильности патогенных бактерий и значении этого явления в эпидемиологии и патогенезе вызываемых ими болезней. Согласно данной концепции псевдотуберкулёзный микроб обладает психрофильными свойствами, которые обеспечивают возможность его размножения при низкой температуре, и эти свойства микроба в значительной степени способствуют развитию эпидемического процесса при ДСЛ. Исследования по обоснованию этой концепции в 1985 г. были признаны приоритетными для решения проблем инфекционной патологии человека.

В 1990-х годах изучение психрофильности псевдотуберкулёзного микроба позволило расширить представления об экологии внеорганизменных популяций патогенных бактерий и получить убедительные доказательства их способности размножаться в объектах окружающей среды, на основе чего получила признание концепция о резервуарной функции окружающей среды для некоторых возбудителей инфекционных болезней [1].

Полученные в НИИЭМ СО РАМН совместно с НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН результаты исследований сапрофитизма и паразитизма патогенных бактерий и значимость взглядов, изложенных Г.П. Сомовым и В.Ю. Литвиным [5], по сей день неоспоримы на общепризнанном уровне. Основываясь на модели псевдотуберкулёзного и листериозного микробов, представители научной школы Г.П. Сомова проложили путь к развитию учения о сапрозоонозах (сапронозах), возбудители которых обладают двойственной природой, т.е. сапрофитическими и паразитическими свойствами, обеспечивающими им возможность обитать как в организме человека и теплокровных животных, так и в окружающей среде, и только непрерывная циркуляция бактерий между ними обеспечивает существование таких возбудителей в природе как биологических видов.

К характерным чертам возбудителей сапрозоонозов и вызываемых ими болезней отнесены [6]:

– полиадаптивность, т.е. способность бактерий вести как сапрофитный, так и паразитический образ жизни, обитая в таких различных экологических условиях, как объекты окружающей среды и организм человека и теплокровных животных;

– полигостальность, т.е. способность инфицировать большое количество видов животных (млекопитающих, птиц, земноводных, рыб, гидробионтов, членистоногих), простейших, растений, водорослей и др.;

– широкая метаболическая пластичность, обеспечивающая бактериям возможность существования в различных экологических условиях.

Краеугольные положения современного учения о сапрозоонозах [6] свидетельствуют о том, что в процессе адаптации к условиям окружающей среды с помощью генетико-биохимических механизмов обеспечивается повышение уровня метаболизма бактерий в неблагоприятных условиях обитания.

Главные генетико-биохимические механизмы адаптации патогенных бактерий к изменяющимся экологическим условиям включают:

– способность размножаться в широком диапазоне температур (от 0 до 40 °С) за счёт синтеза холодовых и тепловых изоферментов, которые обеспечивают поддержание необходимого для жизни уровня метаболизма бактерий при переходе из объектов окружающей среды в организм теплокровных и обратно;

– ухудшение условий питания модельных бактерий при выведении из теплокровного организма в окружающую среду вызывает у них перестройку метаболизма с гетеротрофного на автотрофный путь, позволяющий ассимилировать углекислый газ и другие C_1 -соединения и использовать их углерод для синтеза необходимых органических соединений;

– при снижении интенсивности метаболизма после перехода бактерий из внутренней среды теплокровного организма в окружающую среду возбудители сапрозоонозов более интенсивно начинают поглощать водород, являющийся «горючим» материалом для дыхательной цепи бактери-

альных клеток, с работой которой сопряжён синтез аденозинтрифосфата, основного аккумулятора энергии в клетках.

С начала XXI века проблема ДСЛ получила мировое научное признание. В настоящее время в исследования по проблеме иерсиниозов вовлечены страны Северной и Южной Америки, Великобритания и Ирландия, страны Центральной Европы, Скандинавии и даже Африки (Мадагаскар), а также Азиатско-Тихоокеанского региона. Со времени открытия ДСЛ регулярно проводятся Международные симпозиумы по иерсиниям (International Symposia on *Yersinia*).

В последние 10 лет с использованием секвенирования целого генома всех видов *Yersinia* достигнут существенный прорыв в раскрытии закономерностей эволюции вирулентности иерсиний [7]. Вопреки гипотезе, что все патогенные виды *Yersinia* имеют общего патогенного предка, доказано, что они развивались независимо друг от друга, но с последующими параллельными путями эволюции в приобретении одних и тех же детерминант вирулентности. Эти геномные вариации привели к параллельному появлению родственных возбудителей со специфическим спектром потенциала вирулентности.

Многочисленные исследования коренным образом изменили представление о факторах патогенности бактерий рода *Yersinia*. Доказано, что иерсинии способны преодолевать механизмы врождённого иммунитета, обладая большим набором факторов патогенности, часть из которых кодируется хромосомными генами, а другая часть – генами плазмид (внехромосомных генетических элементов) [8]. Постулировано, что вирулентность бактерий рода *Yersinia* ассоциируется с наличием плазмиды pYV с мол. массой 42–48 МДа, которая кодирует комплекс объединённых в единую систему белков, предназначенных для нейтрализации иммунокомпетентных клеток хозяина. Особое внимание стали обращать на плазмиду *Y. pseudotuberculosis* с мол. массой 82 МДа, которая обнаруживается только у штаммов *Y. pseudotuberculosis* I серовара – наиболее частого этиологического агента ДСЛ [2].

В соответствии с данными литературы о генетических детерминантах патогенности штаммов ДСЛ I серовара и собственными результатами [8], нами сделан вывод, что плаزمида pVM 82 имеет патогенетическое значение в клеточных реакциях врождённой иммунной защиты и в морфологических проявлениях инфекционного процесса при эпидемическом псевдотуберкулёзе. Внехромосомный репликон *Y. pseudotuberculosis* (плазмида pVM 82) относится к генетическим детерминантам, обеспечивающим, с одной стороны, активацию преимущественно нитроксид-зависимых механизмов бактерицидности клеток врождённого иммунитета и развитие продуктивной (гранулематозной) воспалительной реакции, а с другой – уменьшение степени патоген-ассоциированного повреждения лимфоидных органов и снижение гиперпродукции активных форм кислорода. В целом это обеспечивает благоприятный исход большинства случаев заболеваний ДСЛ.

Помимо этого, у штаммов *Y. pseudotuberculosis* I серовара, ответственного за уникальный клинический синдром, описанный на Дальнем Востоке как скарлатиноподобная лихорадка (Far East scarlet-like fever, FESLF), зарубежными учёными идентифицирован ранее неизвестный фактор вирулентности – белок TcrYI, который имеет значительную гомологию последовательности к членам семейства Toll/IL-1-рецептора (TIR) [9]. Бактериальный TIR-домен содержит белки (Tcrp), действующие на иммунную систему, и подрывает защитные реакции организма с помощью многогранных механизмов. Подтверждена гипотеза, что белок TcrYI особенно связан с штаммами ДСЛ I серовара, имеющими изменённый ген кластера вирулентности [10].

На современном этапе, в 2010-х годах, в связи с развитием научных исследований о некультивируемом состоянии патогенных бактерий, начало формироваться представление о персистентных инфекциях, включая псевдотуберкулёз. Среди факторов, приводящих к персистенции *Yersinia*, затяжному, рецидивирующему течению псевдотуберкулёзной инфекции, отмечены [11]: недостаточность гуморального иммунитета к белкам наружной клеточной мембраны иерсиний, длительная (до одного года от начала заболевания) циркуляция антител к белку P26 (компонент наружной клеточной мембраны *Y. pseudotuberculosis*), низкая avidность антител, нарушение элиминации циркулирующих иммунных комплексов, отложение иммунных комплексов в тканях.

Важным достижением последних лет стало установление значения одного из факторов патогенности возбудителя псевдотуберкулёза – цитотоксического некротизирующего фактора, CNF_Y токсина в переходе *Y. pseudotuberculosis* в персистенцию за счёт уменьшения индуцированного им воспаления [12]. Ген цитотоксического некротизирующего фактора (*cnfY*) выявлен во всех 104 исследованных штаммах *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территории РФ с 1966 по 2015 г. от больных людей с диагнозом ДСЛ/псевдотуберкулёз, грызунов и объектов окружающей среды [13]. Показана корреляция между аллелем *cnfY* и принадлежностью штамма к группе возбудителя ДСЛ.

Следует упомянуть имена российских учёных и практических врачей, являющихся первооткрывателями в изучении ДСЛ и которых уже нет с нами: Н.И. Грунин, И.Ю. Залмовер, В.А. Знаменский, А.К. Вишняков, Г.Д. Серов, В.О. Игнатович, А.А. Зеленкин, И.М. Рольщиков, И.П. Григорьян, Т.А. Шарاپова, М.Ф. Дзадзиева Т.Н. Варвашевич, В.Г. Кузнецов, Л.П. Рожкова,

Н.Ф. Тимченко, В.В. Колесникова, Л.С. Бузолева и бессменный руководитель этой научной школы академик РАМН Георгий Павлович Сомов.

В заключение хотелось бы выразить надежду, что дальнейшие научные достижения по проблеме эпидемического псевдотуберкулеза, как типичного представителя сапрозоонозов, позволят получить ответ на сакраментальный вопрос академика Г.П. Сомова: «где, когда и как во внешней среде происходит восстановление вирулентных свойств *Y. pseudotuberculosis*, инициирующее развитие эпидемического и инфекционного процессов при дальневосточной скарлатиноподобной лихорадке» [14].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п 3, 4, 7, 9, 10, 12, см. REFERENCES)

1. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. *Псевдотуберкулез*. М.: Медицина; 2001.
2. Гинцбург А.А., Шубин Ф.Н., Шовадаева Г.А., Куличенко А.Н., Янишевский Н.В., Смирнов Г.Б. Новый признак патогенности кодируемый плазмидой pVM82 *Yersinia pseudotuberculosis*. *Генетика*. 1988; 24(9): 1562-71.
5. Сомов Г.П., Литвин В.Ю. *Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий*. Новосибирск: Наука; 1988.
6. Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток: ООО «Приморский полиграфкомбинат»; 2004.
8. Сомова Л.М., Шубин Ф.Н., Дробот Е.И., Плехова Н.Г., Ляпун И.Н. Плазмид-ассоциированная вирулентность *Yersinia pseudotuberculosis* и инфекционный процесс. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; (6): 74-84.
11. Шурьгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Малов И.В., Марамонович А.С. *Псевдотуберкулез*. Новосибирск: Наука; 2003.
13. Псарева Е.К., Тимченко Н.Ф., Ермолаева С.А. Цитотоксический некротизирующий фактор *Yersinia pseudotuberculosis* как агент псевдотуберкулезной инфекции. *Инфекционные болезни*. 2017; 15(51): 228.
14. Сомов Г.П. Современное представление о сапронозах (основные итоги изучения проблемы). *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2001; (2): 67-70.

REFERENCES

1. Somov G.P., Pokrovskiy V.I., Besednova N.N., Antonenko F.F. *Pseudotuberculosis [Pseudotuberkulez]*. Moscow: Meditsina; 2001. (in Russian)
2. Gintsburg A.A., Shubin F.N., Shovadaeva G.A., Kulichenko A.N., Yanishevskiy N.V., Smirnov G.B. A new pathogenic trait encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* pVM82 plasmid. *Genetika*. 1988; 24(9): 1562-71. (in Russian)
3. Timchenko N.F., Adgamov R.R., Popov A.F., Psareva E.K., Sobyenin K.A., Gintsburg A.L., et al. Far East Scarlet-Like Fever caused by a new related genotypes of *Yersinia pseudotuberculosis*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(3): 503-6. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2203.150552>
4. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, a cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96(24): 14043-8. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14043>
5. Somov G.P., Litvin V.Yu. *Saprophytism and Parasitism of Pathogenic Bacteria [Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий]*. Novosibirsk: Meditsina; 1988. (in Russian)
6. Somov G.P., Buzoleva L.S. Adaptation of pathogenic bacteria to abiotic environmental factors. Vladivostok: Primorsky Printing Plant LLC; 2004.
7. Reuter S., Connor T.R., Barquist L., Walker D., Feltwell T., Harris S.R., et al. Parallel independent evolution of pathogenicity within the genus *Yersinia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(18): 6768-73. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1317161111>
8. Somova L.M., Shubin F.N., Drobot E.I., Plekhova N.G., Lyapun I.N. Plasmid-associated virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* and the infectious process. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2016; (6): 74-84. (in Russian)
9. Nörenberg D., Wieser A., Magistro G., Hoffmann C., Meyer C., Messerer M., et al. Molecular analysis of a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain containing virulence protein of *Y. pseudotuberculosis* among Far East scarlet-like fever serotype I strains. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013; 303(8): 583-94. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.002>
10. Eppinger M., Rosovitz M.J., Fricke W.F., Rasko D.A., Kokorina G., Fayolle C., et al. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. *PLoS Genet.* 2007; 3(8): e142. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030142>
11. Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T., Malov I.V., Maramovich A.S. *Pseudotuberculosis [Pseudotuberkulez]*. Novosibirsk: Meditsina; 2003. (in Russian)
12. Heine W., Beckstette M., Heroven K., Thiemann S., Heise U., Nuss A.M., et al. Loss of CNFY toxin-induced inflammation drives *Yersinia pseudotuberculosis* into persistency. *PLoS Pathog.* 2018; 14(2): e1006858. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006858>
13. Psareva E.K., Timchenko N.F., Ermolaeva S.A. *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxic necrotizing factor as an agent of pseudotuberculosis infection. *Infektsionnye bolezni*. 2017; 15(S1): 228. (in Russian)
14. Somov G.P. The modern idea of sapronoses (the main total study of the problem). *Tikhookeanskij meditsinskij zhurnal*. 2001; (2): 67-70. (in Russian)

Поступила 09.04.19

Принята в печать 11.06.19

ХРОНИКА

РЕЗОЛЮЦИЯ

Первой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 17–18 октября 2019 г.)

17–18 октября 2019 г. в Москве состоялась Первая Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы».

Проведение научного форума было инициировано Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, организовано Центральным НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора при содействии Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов и Национального научного общества инфекционистов.

В работе Конференции приняли участие более 1500 врачей различных специальностей из 78 регионов РФ – педиатров, терапевтов, врачей общей практики, инфекционистов, эпидемиологов, специалистов в области организации здравоохранения и др. Конференция стала площадкой для обмена международным опытом в сфере иммунопрофилактики между врачами и ведущими специалистами из Российской Федерации, Республики Беларусь, Турецкой Республики, Республики Казахстан, Республики Узбекистан и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

В рамках Конференции состоялись Пленарное заседание и 16 секционных заседаний, в ходе работы которых было сделано более 100 докладов. Основными вопросами Конференции стали:

- эпидемиологическая ситуация в мире и в России и современные технологии эпидемиологического надзора за вакциноуправляемыми инфекциями и иммунопрофилактикой;
- организация вакцинации населения: современные подходы с учетом международного опыта;
- опыт реализации и перспективы развития национального и региональных календарей профилактических прививок;
- современные подходы к иммунопрофилактике отдельных инфекций;
- обеспечение безопасности иммунизации, вопросы надзора за неблагоприятными последствиями иммунизации;
- развитие производства иммунобиологических препаратов в Российской Федерации;
- противодействие антивакцинальной пропаганде.

Конференция стала местом проведения двух круглых столов: «О реализации методических рекомендаций по выявлению, расследованию и профилактике побочных реакций после иммунизации» и круглого стола, проведенного совместно Всероссийским научно-практическим обществом эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНПОЭМП) и Национальным научным обществом инфекционистов (ННОИ) «Иммунизация – стратегия на всю жизнь», вызвавших активную дискуссию и живое обсуждение насущных проблем вакцинопрофилактики его участниками.

В ходе Конференции было проведено заседание Проблемной комиссии Ученого совета Роспотребнадзора «Профилактика инфекций, управляемых средствами вакцинопрофилактики».

Участники подчеркнули, что организация и проведение иммунопрофилактики в Российской Федерации в настоящий момент регламентируются Федеральным законом от 17.09.1998 № 157-ФЗ «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней», национальным календарем профилактических прививок и календарем прививок по эпидемическим

показаниям, санитарно-эпидемиологическими правилами и методическими рекомендациями. Российский национальный календарь профилактических прививок и система вакцинопрофилактики позволяют обеспечить один из самых высоких в мире уровней охвата бесплатными для детского населения профилактическими прививками.

Вместе с тем в Российской Федерации остается актуальным вопрос об иммунопрофилактике инфекционных заболеваний у взрослых, в том числе по социальным и медицинским показаниям, а также у лиц, занятых в определенных сферах деятельности. Иммунизация населения в рамках Календаря прививок по эпидемическим показаниям является финансовым обязательством регионов и проводится в соответствии с постановлениями главных государственных санитарных врачей субъектов, в основном против природно-очаговых инфекций. Финансирование мероприятий для данных целей и расширение перечня используемых вакцин за счет бюджетов субъектов и иных источников крайне ограничено.

Участниками Конференции отмечено, что совершенствование действующего национального календаря профилактических прививок должно осуществляться как через оптимизацию существующих схем иммунизации, так и через расширение контингентов, подлежащих профилактическим прививкам. Это предполагает создание рекомендаций и целевых календарей для взрослых, в том числе для определенных профессиональных групп.

Для разработки нормативной документации, выделения адекватного финансирования, внедрения эффективной вакцинопрофилактики необходимо участие и взаимодействие федеральных, региональных, отраслевых, корпоративных структур, национальных научных сообществ.

Участники Конференции подтверждают:

- важность иммунизации как одного из самых эффективных и экономически рентабельных профилактических мероприятий по сохранению здоровья населения и обеспечению активного долголетия;

- огромный вклад иммунизации в достижение глобальных целей общественного здравоохранения, в частности в снижение заболеваемости, инвалидности, смертности на протяжении всей жизни человека.

Участники научного форума выражают озабоченность тем, что, несмотря на уже достигнутый прогресс, цели по ликвидации и элиминации болезней, такие как элиминация кори и ликвидация вакциноассоциированного полиомиелита, не достигнуты из-за неполного охвата плановой вакцинацией коревой и инактивированной полиомиелитной вакциной на уровне каждого муниципального образования. Не все дети и взрослые имеют возможность доступа к новым и усовершенствованным вакцинам, зарегистрированным в Российской Федерации, в установленном законодательством порядке. В этой связи участниками Конференции подчеркнута важность:

- совершенствования нормативно-методического обеспечения вакцинопрофилактики, в том числе разработки федеральных клинических рекомендаций по специфической профилактике отдельных инфекционных болезней, включая принципы «догоняющей» и сочетанной иммунизации, а также формирования индивидуального графика вакцинации;

- разработки методических рекомендаций по формированию приверженности населения к иммунопрофилактике;

- внедрения современных технологий эпидемиологического надзора за вакциноуправляемыми инфекциями и вакцинопрофилактикой, в том числе молекулярно-генетических методов, ГИС-технологий, а также математического моделирования эпидемического процесса;

- внедрения методических рекомендаций по мониторингу побочных проявлений после иммунизации, разработанных на основе руководства ВОЗ и утвержденных в 2019 г.;

- проведения на постоянной основе мониторинга социально-экономической значимости вакциноуправляемых инфекций как критерия эффективности вакцинопрофилактики для своевременного принятия управленческих решений по коррекции тактики иммунизации;

- создания в рамках информатизации здравоохранения электронной базы данных о вакцинации, заболеваемости вакциноуправляемыми инфекциями и побочных проявлениях после иммунизации, внедрения электронного прививочного сертификата;

- изучения факторов, способствующих и препятствующих использованию медицинских услуг по вакцинации, разработке и реализации адресных стратегий, направленных на стимулирование спроса на иммунизацию;

- внедрения передовых технологий обеспечения безопасности инъекций;

- модернизации оборудования для хранения и транспортирования иммунобиологических лекарственных препаратов в условиях «холодовой цепи», включая средства контроля температуры.

Участники Конференции, обращаясь к Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Министерству здравоохранения Российской Федерации, Министерству промышленности и торговли Российской Федерации, отмечают настоятельную необходимость:

- внедрения в национальный календарь прививок и календарь вакцинации по эпидемическим показаниям таких нозологических форм, как ротавирусная инфекция, ветряная оспа и папилломавирусная инфекция;

- совершенствования стратегии и тактики иммунизации детей и взрослых против таких бактериальных инфекций, как пневмококковая, менингококковая, Нib-инфекция и коклюш, в целях не только снижения заболеваемости и смертности от этих инфекций детского и взрослого населения, но и профилактики формирования антибиотикорезистентности;

- организации мониторинга своевременности иммунизации новорожденных детей в роддомах против гепатита В и туберкулеза, как основной меры профилактики передачи инфекции от матери к плоду, предупреждения развития хронического гепатита В и туберкулеза, а также организации мониторинга распространения HBsAg среди детей и «догоняющей» и «подчищающей» иммунизации против гепатита В детей первого года жизни и более старших возрастных групп соответственно;

- расширения практики применения комбинированных вакцин в целях повышения охвата вакцинацией детей первых лет жизни, приверженности родителей к иммунопрофилактике благодаря снижению инъекционной нагрузки на ребенка за одно посещение прививочного кабинета и оптимизации графика вакцинации, обеспечивающего проведение прививок ротавирусной и пневмококковой конъюгированной вакцин;

- организации в Российской Федерации производства полного цикла поливалентных пневмококковой, менингококковой конъюгированных вакцин, ротавирусной и папилломавирусной вакцин, вакцины против вируса *Varicella zoster*, комбинированных пяти- и шестикомпонентных вакцин с бесклеточным коклюшным, Нib-компонентом и инактивированной вакциной против полиомелита, а также квадριвалентной вакцины против гриппа;

- использования при создании отечественных вакцин данных об актуальной антигенной структуре возбудителей, циркулирующих на территории страны;

- распределения адекватных кадровых и финансовых ресурсов для достижения целей, обеспечения качества и эффективности программы иммунизации;

- внедрения стратегии «Иммунизация на протяжении жизни», рекомендованной ВОЗ и реализуемой в большинстве стран Евросоюза, в Стратегию развития вакцинопрофилактики в Российской Федерации до 2035 г.

Участники Конференции высоко оценили научно-методический уровень и организацию проведения форума, определившие новые научные тренды в иммунопрофилактике, а также высказали пожелание о ежегодном проведении такого мероприятия в связи с актуальностью проблемы.

*Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,
доктор мед. наук, профессор, академик РАН В.Г. Акимкин*