

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

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

Рецензируемый «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» рассматривает актуальные проблемы мировой науки и обеспечивает синтез новейших результатов исследований в области микробиологии, вирусологии, эпидемиологии, вакцинологии, иммунобиологии, профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Междисциплинарный подход дает возможность интеграции передовых научных знаний смежных специальностей, широкого видения проблем фундаментальной и прикладной инфектологии, а также комплексного подхода к созданию биомедицинских технологий. К публикации принимаются научные труды российских и зарубежных исследователей, лекции, а также методические материалы и законодательные документы в области сохранения эпидемиологического благополучия населения.

Журнал входит в рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» по специальностям:

03.02.02 Вирусология (медицинские и биологические науки);
03.02.03 Микробиология (медицинские и биологические науки);
14.02.02 Эпидемиология (медицинские и биологические науки);
14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология (медицинские и биологические науки)

5

СЕНТЯБРЬ – ОКТЯБРЬ

**ТОМ 97
2020**

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

ISSN 0372-9311 (Print)
ISSN 2686-7613 (Online)

DOI: 10.36233

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

Контент доступен под лицензией
Commons Attribution International
4.0 CC-BY.

Используется сервис CrossMark
для поддержания контента
журнала в актуальном состоянии
и информирования читателей
об изменениях в опубликованных
статьях.

Статьи иностранных авторов,
а также отдельно рекомендован-
ные Редакционной коллегией
русскоязычные статьи публикуются
на русском и английском языках
под единым DOI.

**Журнал представлен
в международных базах данных
и информационно-справочных
системах:**

Russian Science Citation Index
(RSCI), интегрированная
с платформой Web of Science;
DOAJ; ROAD; EBSCO Publishing
(на платформе EBSCOhost).

ПОДПИСКА:

по каталогу «Газеты и Журналы»:
71420

по каталогу «Пресса по подписке»:
E71436

**Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:**

<https://www.microbiol.elpub.ru;>
<https://www.elibrary.ru;>
<https://www.cyberleninka.ru;>
<https://www.rucont.ru;>
[https://www.ebsco.com.](https://www.ebsco.com)

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

111123, Москва,
ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pcr.ru

РЕДАКЦИЯ:

105064 г. Москва,
Малый Казенный пер., д. 5А.
Тел.: +7(925)011-87-79.
E-mail: jmei@crie.ru

*Начальник редакционно-
издательского отдела:*
Осокина Ольга Владимировна

Заведующая редакцией:
Устинкова Ольга Владимировна

Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных
материалов.

К публикации принимаются только
статьи, подготовленные в соответ-
ствии с правилами для авторов
(см. www.microbiol.elpub.ru).

Направляя статью в редакцию,
авторы принимают условия
договора публичной оферты
(<https://microbiol.elpub.ru/jour>).

Подписано в печать 25.10.2020.

Формат 60×90^{1/8}.
Тираж 280 экз. Усл.-печ. л. 6,5.
Отпечатано в типографии
«Буки Веди». www.bukivedi.com.
E-mail: info@bukivedi.com.

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2020

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Зверев В.В., д.б.н., проф., академик РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Заместитель главного редактора

Семенов Т.А., д.м.н., проф., руководитель отдела эпидемиологии ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Ответственный секретарь

Платонов А.Е., д.м.н., проф., зав. лабораторией эпидемиологии природно-очаговых инфекций, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Акимкин В.Г., д.м.н., проф., академик РАН, директор ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Брико Н.И., д.м.н., проф., академик РАН, директор Института общественного здоровья, зав. кафедрой эпидемиологии и доказательной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Брусина Е.Б., д.м.н., проф., зав. кафедрой эпидемиологии, Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Бухарин О.В., д.м.н., проф., академик РАН, главный научный сотрудник, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

Гинцбург А.Л., д.б.н., проф., академик РАН, директор ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Жирнов О.П., д.б.н., проф., чл.-корр. РАН, зав. лабораторией вирусного патогенеза Института вирусологии им. Д.И. Иванковского, ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Караулов А.В., д.м.н., проф., академик РАН, зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Института клинической медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Кутырев В.В., д.м.н., проф., академик РАН, директор, Российский научно-исследовательский институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Лобзин Ю.В., д.м.н., проф., академик РАН, директор, Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Лукашев А.Н., д.м.н., проф., член-корр. РАН, директор Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Максютов Р.А., д.б.н., генеральный директор, ГНЦ вирусологии и биотехнологии (Вектор) Роспотребнадзора, Новосибирск, Россия

Малеев В.В., д.м.н., проф., академик РАН, советник директора, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Михайлов М.И., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; проф. кафедры эпидемиологии Белгородского государственного университета, Белгород, Россия

Онищенко Г.Г., д.м.н., проф., академик РАН, зав. кафедрой экологии человека и гигиены окружающей среды, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Покровский В.И., д.м.н., проф., академик РАН, советник директора ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Свитич О.А., д.м.н., чл.-корр. РАН, директор, НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Сергиев В.П., д.м.н., проф., академик РАН, почетный директор Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Тартаковский И.С., д.б.н., проф., зав. лабораторией легионеллеза, ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Тотолян А.А., д.м.н., проф., академик РАН, директор, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Урываев Л.В., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, заместитель директора Института вирусологии им. Д.И. Иванковского, ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Филатов Н.Н., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, заместитель директора, НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Черкасов С.В., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, врио директора, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

Шаркова В.А., д.м.н., проф., зав. кафедрой микробиологии и вирусологии, Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

Иностранные члены редакционной коллегии

Shubhada Vorpegamage, PhD, MSc, Professor, Institute of Microbiology, Slovak Medical University, Bratislava, Slovak Republic

Elena A. Govorkova, MD, PhD, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, Vice-president of the European Academy of Natural Sciences, President of the R. Koch Medical Society (Germany), Chairman of German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, VP R&D, Founder, Biotech Innovation Research Development & Consulting, Vienna, Austria

Bogdan N. Petrunov, MD, DSc, Professor, Academic of the Bulgarian Academy of Sciences, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, President of the Medical Section of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Georgy S. Nikolov, MD, PhD, Associate Professor, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

Murad K. Mamadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

FOUNDERS:
Central Research Institute of Epidemiology
Russian Scientific Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

**JOURNAL
of MICROBIOLOGY,
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY**
(Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii)

Bimonthly scientific and practical journal

Founded in 1924

Peer-reviewed Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology is dedicated to the most significant issues of world science and provides a synthesis of the cutting edge research in the field of microbiology, virology, epidemiology, vaccinology, immunobiology, prevention of infectious diseases.

The journal accepts for publication Russian and foreign research papers, lectures, methodological materials, legislative documents in the field of preserving the epidemiological well-being of the population.

The interdisciplinary approach enables the reader to integrate advanced scientific knowledge of related specialties, to receive a broad vision of the problems of fundamental and applied infectology and a comprehensive approach to creating innovative biomedical technologies.

The journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science:

03.02.02 Virology (medical and biological sciences);
03.02.03 Microbiology (medical and biological sciences);
14.02.02 Epidemiology (medical and biological sciences);
14.03.09 Clinical immunology, Allergology (medical and sciences)

5

SEPTEMBER – OCTOBER

VOLUME 97

2020

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-75442

ISSN 0372-9311 (Print)
ISSN 2686-7613 (Online)

DOI: 10.36233

The journal is a Platinum Open Access peer-reviewed scholarly journal, which does not charge author fees.

The content is licensed under Commons Attribution International 4.0 CC-BY.

The CrossMark service is used.

Articles by foreign authors, as well as Russian-language articles specially recommended by the Editorial Board, are published in Russian and English under the same DOI.

The journal is presented in the following research databases: Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science; DOAJ; ROAD; EBSCO Publishing (on the EBSCOhost platform).

Index for subscription to the printed version of the journal: catalog "Newspapers and Journals": 71420.
catalog "Subscription Press": E71436.

Full texts of issues of the journal are available:

<https://www.microbiol.elpub.ru/>;
<https://www.elibrary.ru/>;
<https://www.cyberleninka.ru/>;
<https://www.rucont.ru/>;
<https://www.ebsco.com>.

PUBLISHER:

Central Research Institute of Epidemiology, 111123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(495) 974-96-46.
E-mail: crie@pcr.ru

EDITORIAL OFFICE:

5A, Maly Kazenny per., Moscow, 105064, Russia.
Tel.: +7(925)011-87-79.
E-mail: jmei@crie.ru.

Head of the Editorial and publishing department:

Olga V. Osokina

Head of Editorial Office:

Olga V. Ustinkova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (www.microbiol.elpub.ru) are rejected without further consideration.

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement (<https://microbiol.elpub.ru/jour>).

Signed to the press on October 25, 2020.
Print format 60×90^{1/8}.
Circulation 250 copies.

Produced at the Buki Vedi Printing House.
115093, 1, 1st Party lane, Moscow, Russian Federation.
E-mail: info@bukivedi.com.
www.bukivedi.com

© Central Research Institute of Epidemiology, 2020

EDITOR-IN-CHIEF

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biology), RAS Full Member, Professor, Head, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Deputy Editor

Tatiana A. Semenenko, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Epidemiology Department, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Executive Secretary

Alexander E. Platonov, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Laboratory of Zoonoses, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

EDITORIAL BOARD

Vasily G. Akimkin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Nikolay I. Briko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Institute of Public Health, Head, Department of Epidemiology and Evidence-Based Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Elena B. Brusina, professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of epidemiology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Oleg V. Bukharin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Principal Research Scientist, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia

Aleksandr L. Gintsburg, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology), Director, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Oleg P. Zhirnov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology), Head, Laboratory of viral pathogenesis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology Moscow, Russia

Alexander V. Karaulov, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Vladimir V. Kutyrev, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

Yuri V. Lobzin, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, Russia

Alexander N. Lukashev, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Rinat A. Maksyutov, Dr. Sci. (Biology), Director General, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk, Russia

Victor V. Maleev, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director adviser, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Mikhail I. Mikhaylov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Laboratory of viral hepatitis, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Professor, Department of epidemiology, Belgorod State University, Medical Institute, Belgorod, Russia

Gennadiy G. Onishchenko, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Human Ecology and Environmental Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Valentin I. Pokrovskiy, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Advisor to Director of Innovation, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Oxana A. Svitich, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Vladimir P. Sergiev, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director Emeritus, Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Valentina A. Sharkova, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Head, Department of Microbiology and Virology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Igor S. Tartakovsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Head, Laboratory of legionellosis, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Areg A. Totolian, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

Leonid V. Uryvaev, Dr. Sci. (Medicine), Professor, RAS Corr. Member, Deputy Director, D.I. Ivanovskiy Virology Institute, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Nikolay N. Filatov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Deputy Director for Science, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Sergey V. Cherkasov, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), Director, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of RAS, Orenburg, Russia

Foreign members of the Editorial Board

Shubhada Bopegamage, PhD, MSc, Professor, Institute of Microbiology, Slovak Medical University, Bratislava, Slovak Republic

Elena A. Govorkova, MD, PhD, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA

Helmut Hahn, MD, PhD, Professor, Vice-president of the European Academy of Natural Sciences, President of the R. Koch Medical Society (Germany), Chairman of German-Russian Koch-Mechnikov Forum, Berlin, Germany

Werner Lubitz, MSc, PhD, Professor, VP R&D, Founder, Biotech Innovation Research Development and Consulting, Vienna, Austria

Bogdan N. Petrunov, MD, DSc, Professor, Academic of the Bulgarian Academy of Sciences, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, President of the Medical Section of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Georgy S. Nikolov, MD, PhD, Associate Professor, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

Murad K. Mamadov, MD, DSc, Professor, National Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, Baku, Republic of Azerbaijan

От редакции

«Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии» после длительного перерыва возобновляет работу Редакционного совета. Членство в Редакционном совете — почетная и ответственная миссия лучших из равных представителей профильного научного сообщества.

Основная задача Редакционного совета — объединение опыта творчески активных молодых ученых и лидеров фундаментальной и прикладной науки с целью взаимного развития журнала, коллектива его авторов и науки в целом. Состав Редакционного совета будет расширяться.

Editorial

The "Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology" after a long break resumes the work of the Editorial Council. Membership in the Editorial Council is the honorary and responsible mission of the best of equal representatives of the specialized scientific community.

The main task of the Editorial Council is to combine the experience of creatively active young scientists and leaders of fundamental and applied science with the aim of mutual development of the journal, its authors and science in general. The number of Council members will increase.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Игнатъев Георгий Михайлович, д.м.н., проф., заместитель руководителя направления качества и инновационных разработок ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН, Москва, Россия

Кюрегян Карен Каренович, д.б.н., проф., заведующий отделом изучения вирусных гепатитов Научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Мескина Елена Руслановна, д.м.н., заведующая отделением детских инфекций отдела терапии, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Мefeld Кирилл Михайлович, к.б.н., заместитель генерального директора по трансферу лекарственных средств, ООО «БиоИнтегратор», группа компаний «ХимРАР», Москва, Россия

Миронов Константин Олегович, д.м.н., руководитель научной группы разработки новых методов выявления генетических полиморфизмов, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Никонова Александра Александровна, к.б.н., заведующая лабораторией молекулярной биотехнологии, ФБГНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Шендеров Борис Аркадьевич, д.м.н., проф., Проблемная научно-исследовательская лаборатория «Конструирование и внедрение продуктов и рационов персонализированного питания» Московский государственный университет технологий им. К.Г. Разумовского, Москва, Россия

EDITORIAL COUNCIL

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Deputy head of the Quality and innovation development direction, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia

Karen K. Kyuregyan, Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Department of viral hepatitis at the Research institute of molecular and personalized medicine at Russian Medical Academy of Continuous Professional Education; leading researcher of the Laboratory of viral hepatitis at I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Elena R. Meskina, Dr. Sci. (Medicine), Head of the Department of pediatric infections, Department of therapy, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

Kirill M. Mefed, Cand. Sci. (Biology), Deputy Chief Executive Officer on transfer of medicines, BioIntegrator LLC (HimRaR group of companies), Moscow, Russia

Konstantin O. Mironov, Dr. Sci. (Medicine), Head of the Developing new methods for detecting genetic polymorphisms research group, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Alexandra A. Nikonova, Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory of molecular biotechnology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Boris A. Shenderov, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Problem-research laboratory "Design and implementation of personalized food products and diets", K.G. Razumovsky Moscow State University of Technology, Moscow, Russia

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Степанова Т.Ф., Шарухо Г.В., Летюшев А.Н., Фольмер А.Я., Шепоткова А.А., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Степанова К.Б., Панина Ц.А., Сидоренко О.Н., Иванова Н.А., Смирнова С.С., Мальченко И.Н., Охотникова Е.В., Стахова Е.Г., Тоголян А.А.**
Распределение серопревалентности к SARS-CoV-2 среди жителей Тюменской области в эпидемическом периоде COVID-19* 393
- Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В.**
Особенности изменений спектров жирных кислот бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в процессе формирования устойчивых (дормантных) клеточных форм..... 401
- Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г.**
Чувствительность биопленок *Bordetella pertussis* к поливалентной коклюшной сыворотке 413
- Ахапкина И.Г., Глушакова А.М., Родионова Е.Н., Качалкин А.В.**
Колонизационная активность клинических изолятов дрожжевых грибов рода *Candida* и их антибиотикочувствительность 418
- Захарова Ю.В., Сухих А.С., Леванова Л.А., Плотникова Е.Ю.**
Изучение *in vitro* влияния ДНК пробиотического штамма *Bifidobacterium bifidum* на количественный уровень и колонизационные свойства кишечных микросимбионтов..... 424

ОБЗОРЫ

- Нагорных А.М., Тюменцев А.И., Тюменцева М.А., Акимкин В.Г.**
SARS, снова SARS и MERS. Обзор животных моделей респираторных синдромов человека, вызываемых коронавирусами* 448
- Ноздрачева А.В., Семенов Т.А.**
Состояние популяционного иммунитета к кори в России: систематический обзор и метаанализ эпидемиологических исследований* 458
- Бухарин О.В., Перунова Н.Б.**
Роль микробиоты в регуляции гомеостаза организма человека при инфекции* 458
- Долгушин И.И., Мезенцева Е.А.**
Нейтрофильные внеклеточные ловушки в борьбе с биопленкообразующими микроорганизмами: охотники или добыча?* 468
- Левченко Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Подойницына О.А.**
Атипичность штаммов *Vibrio cholerae* O1 по признаку агглютинабельности 482

НАУКА И ПРАКТИКА

- Ломоносова А.В.**
Причины и последствия несвоевременной вакцинации против коклюшной инфекции в Российской Федерации 492

РЕЦЕНЗИЯ

- Суворов А.Н.**
Рецензия на монографию Boris A. Shenderov, Alexander V. Sinitsa, Mikhail M. Zakharchenko, Christine Lang «Metabiotics. Present State, Challenges and Perspectives» (Springer Nature Switzerland AG, 2020) 503

* Статья опубликована на русском и английском языках на сайте журнала: <https://www.microbiol.elpub.ru>.

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

- Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Stepanova T.F., Sharukho G.V., Letyushev A.N., Folmer A.Ya., Shepotkova A.A., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Stepanova K.B., Panina Ts.A., Sidorenko O.N., Ivanova N.A., Smirnova S.S., Malchenko I.N., Okhotnikova E.V., Stakhova E.G., Totolian A.A.**
Distribution of SARS-CoV-2 seroprevalence among residents of the Tyumen Region during the COVID-19 epidemic period*393

- Andryukov B.G., Somova L.M., Lyapun I.N., Bynina M.P., Matosova E.V.**
Features of changes in spectra of fatty acids of the bacteria of the *Enterobacteriaceae* family in the process of forming stable (dormant) cell forms.....402

- Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G.**
Sensitivity of *Bordetella pertussis* biofilms to polyvalent pertussis serum414

- Akhapkina I.G., Glushakova A.M., Rodionova E.N., Kachalkin A.V.**
Colonization activity of *Candida* clinical isolates and their antibiotic sensitivity.....419

- Zakharova Yu.V., Sukhikh A.S., Levanova L.A., Plotnikova E.Yu.**
In vitro study of the effect of *Bifidobacterium bifidum* probiotic strain DNA on the cell concentration and colonization properties of intestinal microsymbionts.425

REVIEWS

- Nagornykh A.M., Tyumentsev A.I., Tyumentseva M.A., Akimkin V.G.**
SARS, SARS again, and MERS. Review of animal models of human respiratory syndromes caused by coronavirus infections*432

- Nozdracheva A.V., Semenenko T.A.**
The status of herd immunity to measles in Russia: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies*446

- Bukharin O.V., Perunova N.B.**
The role of microbiota in the regulation of homeostasis in the human body during infection*459

- Dolgushin I.I., Mezentseva E.A.**
Neutrophil extracellular traps in the fight against biofilm-forming microorganisms: hunters or prey?*469

- Levchenko D.A., Arhangelskaya I.V., Kruglikov V.D., Podoinitsina O.A.**
Atypicality of *Vibrio cholerae* O1 strains based on agglutability483

SCIENCE AND PRACTICE

- Lomonosova A.V.**
Causes and consequences of delayed vaccination against pertussis infection in the Russian Federation493

BOOK REVIEW

- Suvorov A.N.**
Review of the monograph by Boris A. Shenderov, Alexander V. Sinitza, Mikhail M. Zakharchenko, Christine Lang «Metabiotics. Present State, Challenges and Perspectives» (Springer Nature Switzerland AG, 2020).....503

* The article is published in Russian and English on the journal's website: <https://www.microbiol.elpub.ru>.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2020



Распределение серопревалентности к SARS-CoV-2 среди жителей Тюменской области в эпидемическом периоде COVID-19

Попова А.Ю.¹, Ежлова Е.Б.¹, Мельникова А.А.¹, Степанова Т.Ф.², Шарухо Г.В.³, Летюшев А.Н.^{2,3}, Фольмер А.Я.⁴, Шепоткова А.А.², Лялина Л.В.⁵, Смирнов В.С.⁵, Степанова К.Б.², Панина Ц.А.², Сидоренко О.Н.², Иванова Н.А.², Смирнова С.С.², Мальченко И.Н.², Охотникова Е.В.², Стахова Е.Г.², Тотолян А.А.⁵

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 127994, Москва, Россия;

²ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия;

³Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Тюменской области, 625026, Тюмень, Россия;

⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области», 625000, Тюмень, Россия;

⁵ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, 197101, Санкт-Петербург, Россия

Введение. В конце 2019 г. — начале 2020 г. была зарегистрирована вспышка инфекции, вызванная новым штаммом бета-коронавируса SARS-CoV-2. ВОЗ определила идентифицированное заболевание как «коронавирусная болезнь 2019» (COVID-19). В Тюменской области первый случай заболевания COVID-19 был диагностирован 31.01.2020 г. Источником инфекции была студентка, приехавшая из Цзинаня, провинция Шаньдун (КНР). С 16-й по 28-ю неделю 2020 г. наблюдался устойчивый рост заболеваемости. Максимальный уровень составил 36,87 на 100 тыс. человек. Впоследствии кумулятивная заболеваемость постепенно увеличивалась, хотя и с меньшей интенсивностью.

Целью сероэпидемиологического исследования было определение уровня и структуры популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Тюменской области в период интенсивного распространения COVID-19.

Материалы и методы. Отбор добровольцев для исследования проводился путем анкетирования и рандомизации. Критерием невключения являлась активная инфекция COVID-19 на момент обследования. На наличие специфических антител к SARS-CoV-2 были обследованы 2758 человек. Возраст опрошенных добровольцев составлял от 1 года до 70 лет и старше.

Результаты исследования. Среди населения Тюменской области в активной фазе заболеваемости COVID-19 наблюдалась умеренная (24,5%) серопревалентность к SARS-CoV-2. Одновременно с этим выявлена высокая (97,8%) частота случаев бессимптомной инфекции у серопозитивных людей, у которых в анамнезе не было заболевания COVID-19, положительного результата ПЦР и симптомов острых респираторных вирусных инфекций в день обследования. Максимальные показатели коллективного иммунитета, установленные у детей 1–6 лет (34,7%), были статистически значимыми по сравнению со средним уровнем серопревалентности для всей когорты. У реконвалесцентов COVID-19 антитела обнаруживались в 68,2% случаев. У лиц с положительным результатом ранее проведенного ПЦР-анализа антитела выявляются в 64% случаев.

Вывод. Результаты исследования состояния коллективного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 необходимы для разработки прогноза развития эпидемиологической ситуации, а также для планирования мероприятий по специфической и неспецифической профилактике COVID-19.

Ключевые слова: *коронавирус; эпидемия; серопревалентность; Тюменская область; население.*

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Степанова Т.Ф., Шарухо Г.В., Летюшев А.Н., Фольмер А.Я., Шепоткова А.А., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Степанова К.Б., Панина Ц.А., Сидоренко О.Н., Иванова Н.А., Смирнова С.С., Мальченко И.Н., Охотникова Е.В., Стахова Е.Г., Тотолян А.А. Распределение серопревалентности к SARS-CoV-2 среди жителей Тюменской области в эпидемическом периоде COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5): 392–400.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-1>

Поступила 23.09.2020
Принята в печать 01.10.2020

Distribution of SARS-CoV-2 seroprevalence among residents of the Tyumen Region during the COVID-19 epidemic period

Anna Yu. Popova¹, Elena B. Ezhlova¹, Albina A. Melnikova¹, Tatiana F. Stepanova², Galina V. Sharukho³, Aleksandr N. Letyushev^{2,3}, Aleksandr Ya. Folmer⁴, Anna A. Shepotkova², Lyudmila V. Lyalina⁵, Vyacheslav S. Smirnov⁵, Kseniya B. Stepanova², Tsakhik A. Panina², Olga N. Sidorenko², Natalia A. Ivanova², Svetlana S. Smirnova², Inna N. Malchenko², Elena V. Okhotnikova², Elena G. Stakhova², Areg A. Totolian⁵

¹Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 127994, Moscow, Russia;

²Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia;

³Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for Tyumen Region, 625026, Tyumen, Russia;

⁴Center for Hygiene and Epidemiology in the Tyumen Region, 625000, Tyumen, Russia;

⁵Saint Petersburg Pasteur Institute, 197101, Saint Petersburg, Russia

Introduction. In late 2019 – early 2020, an outbreak of infection caused by a novel strain of beta coronavirus SARS-CoV-2 was reported. The World Health Organization defined the disease as coronavirus disease 2019 (COVID-19). In the Tyumen Region, the first case of COVID-19 was diagnosed on 31/1/2020. The source of infection was a female student who came from Jinan, Shandong province (China). The number and rate of cases were steadily increasing from the 16th week through 28th week in 2020. The highest rate was 36.87 cases per 100 thousand people. Afterwards, the cumulative incidence kept increasing gradually, but not as quickly.

The purpose of the seroepidemiological study was to measure the level and to identify the structure of herd immunity against the SARS-CoV-2 virus among the population of the Tyumen Region during the rapid spread of the COVID-19 outbreak.

Materials and methods. Volunteers for participation in the study were selected through questionnaire surveys and random sampling. The exclusion criterion was an active COVID-19 infection at the time of the survey. A total of 2,758 individuals were tested for SARS-CoV-2 specific antibodies. The age of the surveyed volunteers ranged from 1 year to 70 years and older.

Results of the study. During the active phase of the COVID-19 incidence, the population of the Tyumen Region showed moderate (24.5%) seroprevalence of SARS-CoV-2. At the same time, the tests revealed a high (97.8%) rate of asymptomatic infection cases in seropositive individuals who had never been diagnosed with COVID-19 and did not have history of positive PCR test results or acute respiratory infection symptoms on the day of testing. The maximum level of herd immunity was identified in children aged 1–6 years (34.7%), which was significantly higher compared to the average level of seroprevalence in the entire cohort. In recovered COVID-19 patients, antibodies were detected in 68.2%. In individuals with positive PCR test results, antibodies were detected in 64%.

Conclusion. The results of the assessment of the level of herd immunity against the SARS-CoV-2 virus are crucial for prediction of the development trend of the epidemic and for planning specific and non-specific COVID-19 prevention measures.

Keywords: coronavirus; epidemic; seroprevalence; Tyumen Region; population.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Stepanova T.F., Sharukho G.V., Letyushev A.N., Folmer A.Ya., Shepotkova A.A., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Stepanova K.B., Panina Ts.A., Sidorenko O.N., Ivanova N.A., Smirnova S.S., Malchenko I.N., Okhotnikova E.V., Stakhova E.G., Totolian A.A. Distribution of SARS-CoV-2 seroprevalence among residents of the Tyumen Region during the COVID-19 epidemic period. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 392–400. (In Russ.)
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-1>

Received 23 September 2020
Accepted 1 October 2020

Введение

Пандемия COVID-19, стартовавшая 11.03.2020 г., стала беспрецедентным событием в новейшей истории цивилизации. Начавшись с единичного случая заболевания на рынке морепродуктов в Ухани (КНР), инфекция довольно быстро распространилась по миру, захватив по существу все государства планеты. Незатронутыми остались лишь несколько небольших государств Африки, и отсутствуют сведения о заболеваемости COVID-19 в Туркмении и Северной Корее. По состоянию на первую декаду июля 2020 г. во всем мире подтверждено 12,5 млн случаев COVID-19, из которых 6,89 млн пациентов выздоровели и 560 тыс. умерли¹.

В России, согласно официальным данным Роспотребнадзора, к 12.07.2020 г. выявлено 727 162 заболевших, 561 061 выздоровевших и 11 335 умерших. Случаи коронавируса регистрируются практически на всей территории РФ. Наибольшая заболеваемость зарегистрирована в Москве, наименьшая — в Чукотском и Ямало-Ненецком округах, а также на арктических островных территориях РФ.

В Тюменской области первый случай выявлен 31.01.2020 г., источником инфекции была гражданка КНР, прибывшая из г. Цзинань провинции Шаньдун. Спорадические случаи регистрировались до 9 апреля 2020 г. Устойчивый рост заболеваемости начался с 16-й недели 2020 г., максимальный уровень был

достигнут на 28-й неделе и составил 36,87 случая на 100 тыс. населения. В последующем кумулятивная заболеваемость постепенно увеличивалась и в период с 26-й по 30-ю неделю выросла на 195% (рис. 1). Таким образом, говорить о существенном прогрессе в ликвидации эпидемической вспышки COVID-19 на территории Тюменской области пока еще преждевременно.

С точки зрения текущей ситуации по COVID-19 и необходимости разработки эффективных мер управления эпидемическим процессом, важным направлением является исследование уровня популяционного иммунитета среди населения региона. Существует два пути достижения порогового уровня коллективного иммунитета: увеличение прослойки лиц, перенесших инфекционное заболевание, в данном случае COVID-19, в манифестной или бессимптомной формах, либо вакцинация населения с охватом не менее 60% восприимчивых лиц [1, 2]. Разработка вакцин, несмотря на интенсивные исследования со стороны производителей, — дело не быстрое и требует тщательного подхода к оценке безопасности, специфичности и эффективности [3]. В этих условиях единственно реальной остается надежда на формирование коллективного иммунитета в результате манифестной инфекции или инаппарантной сероконверсии. Принята точка зрения, что для прерывания инфекционного процесса необхо-

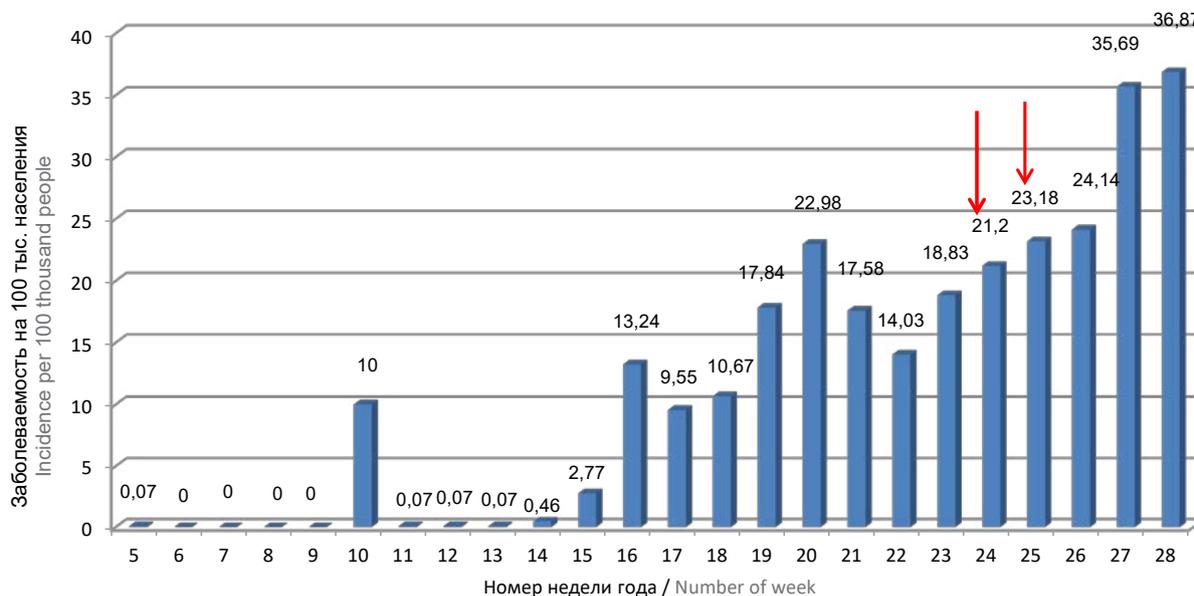


Рис. 1. Заболеваемость COVID-19 в Тюменской области.

Стрелками обозначен период проведения исследований по серопревалентности среди населения области (24–25-я недели года).

Fig. 1. COVID-19 incidence in Tyumen Region.

The arrows show the period when the seroprevalence study was conducted (the 24th–25th week of the year).

¹ <https://www.who.int/ru/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>

димо, чтобы невосприимчивость к инфекции сформировалась не менее чем у 50–60% восприимчивой популяции [2]. При этом необходимо тщательно отслеживать динамику процесса и степень гетерогенности популяции, от которой могут существенно зависеть темпы формирования как индивидуальной, так и коллективной резистентности к инфицированию SARS-CoV-2 [4].

В связи с изложенным целью проведенного сероэпидемиологического исследования было определено уровень и структуры популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Тюменской области в период интенсивного распространения COVID-19.

Материалы и методы

Работа проводилась в рамках первого этапа широкомасштабного проекта Роспотребнадзора по оценке популяционного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у населения России с учетом протокола, рекомендованного ВОЗ [5]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Перед его началом исследования все участники или их юридические были ознакомлены с целью, методикой исследования и подписали информированное согласие.

Отбор добровольцев для исследования проводили методом анкетирования и рандомизации. Критерием исключения была активная инфекция COVID-19 в момент анкетирования.

Объем выборки определяли по формуле:

$$n = \frac{t^2 \times p(1-p)}{m^2},$$

где:

n — объем выборки;

t — уровень точности (для 95% ДИ $t = 1,96$);

p — оценочная распространенность изучаемого явления (при 50% $p = 0,5$);

m — допустимая ошибка 5% [6].

Всего было проанкетировано 7163 волонтера, из них у 3030 человек отбирали пробы крови из вены для последующего исследования на наличие специфических антител к SARS-CoV-2. Всего было протестировано 2758 проб.

Возраст обследованных добровольцев варьировал от 1 года до 70 лет и старше (табл. 1).

Количество волонтеров во всех возрастных группах было сопоставимым, за исключением существенно меньшей численности в старшей возрастной группе. Учитывая особенности детского возраста, первую группу разделили на 3 подгруппы: 1–6, 7–13 и 14–17 лет. Из всей когорты волонтеров доля лиц, переболевших COVID-19, составила 0,7% (22 человека). Среди волонтеров в день исследования не было лиц с клиническими признаками острых респираторных вирусных инфекций.

Пробы крови волонтеров отбирали в вакутейнеры с ЭДТА и центрифугировали. Плазму отделяли от клеточных элементов, переносили в пластиковые пробирки и хранили до исследования при 4°C. Содержание антител к SARS-

Таблица 1. Серопревалентность у жителей Тюменской области разных возрастных групп

Table 1. Seroprevalence in residents of Tyumen Region, different age groups

Возрастная группа, лет Age group, years	Количество обследованных, человек Number of the examined, persons	В том числе / Including		Серопревалентность, % ($M \pm m$) Seroprevalence, % ($M \pm m$)
		серопозитивных seropositive	серонегативных seronegative	
1–17	356	94	262	26,4 ± 4,6
В том числе: Including:	1–6	75	26	34,7 ± 10,8
	7–13	144	33	22,9 ± 6,9
	14–17	137	35	25,5 ± 6,3
18–29	485	125	360	25,8 ± 3,9
30–39	452	119	333	26,3 ± 4,1
40–49	447	108	339	24,2 ± 4,0
50–59	482	126	356	26,1 ± 3,9
60–69	387	85	302	22,0 ± 4,1
70 и старше / 70 and older	149	20	129	13,4 ± 5,5
Итого / Total	2758	677	2081	24,5 ± 1,6

CoV-2 определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов для анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие специфических иммуноглобулинов класса G к нуклеокапсиду вируса SARS-CoV-2 производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора. Результаты оценивали качественным методом и считали положительными при превышении уровня cut-off.

Статистическую обработку проводили с применением методов вариационной статистики с помощью статистического пакета Excel и программного продукта «WinPeri» (версия 11.65). В связи с отсутствием репрезентативной выборки по районам Тюменской области основную часть статистических показателей рассчитывали только по результатам, полученным среди волонтеров Тюмени. Для оценки достоверности различий сравниваемых показателей использовали уровень вероятности $p < 0,05$.

Результаты

Определение серопревалентности

Серопревалентность среди жителей Тюменской области составила $24,5 \pm 1,6\%$ (677 из 2758), а по возрастным группам варьировала в диапазоне от $13,4 \pm 5,5$ до $26,4 \pm 4,6\%$ (табл. 1). Максимальный уровень сероконверсии выявлен в детской возрастной группе (преимущественно за счет подгруппы 1–6 лет). У лиц старшей возрастной группы (70 лет и более) серопревалентность была самой низкой ($13,4 \pm 5,5\%$), что может быть связано с недостаточным объемом выборки. Серопозитивность не имела достоверных гендерных различий и составила у мужчин $21,5 \pm 2,7\%$, у женщин — $26,0 \pm 2,0\%$ ($p > 0,05$), хотя видна была заметная тенденция к преобладанию сероконверсии среди женщин. По городу Тюмени, без учета нерепрезентативных данных по районам области, уровень серопревалентности составил $24,5 \pm 1,6\%$.

Определение факторов риска

Среди лиц, перенесших манифестную форму COVID-19, доля серопозитивных составила $68,2 \pm 19,5\%$, в то время как среди лиц, не имевших в анамнезе этой инфекции, показатель был достоверно ниже — $24,2 \pm 1,6\%$ ($p < 0,05$), что полностью соответствует результатам, полученным при обследовании населения других территорий [5, 7].

В группе лиц, никогда не имевших контакта с больными COVID-19, доля серопозитивных составила $21,1 \pm 1,6\%$, тогда как при

наличии подобных контактов на работе или в быту доля волонтеров, у которых были выявлены антитела к SARS-CoV-2, увеличилась до $32,1 \pm 7,2\%$. Это свидетельствует о возможности бытового формирования иммунного ответа в результате трансфера возбудителя от больного COVID-19, хотя и, вероятно, в низких дозах. Отсутствие достоверных различий на фоне роста доли серопозитивных в 1,5 раза может свидетельствовать только о недостаточном объеме выборки.

Определенный интерес представляет также оценка уровня серопозитивности среди волонтеров, имевших положительный результат определения РНК вируса в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Результаты обследования показали, что среди лиц с позитивной ПЦР уровень серопревалентности составил 64%, тогда как среди ПЦР-негативных добровольцев этот показатель — только 24,24%. Различия достоверны с вероятностью $p < 0,05$. Полученные результаты убедительно подтверждают наличие прочной функциональной связи между циркулирующей в организме РНК возбудителя и антител к SARS-CoV-2. Для проверки этого предположения был проведен анализ связи между заболеваемостью и серопревалентностью (рис. 2).

Как следует из проведенного анализа, существует прямая линейная зависимость между сравниваемыми показателями. Коэффициент корреляции по Пирсону и ранговой корреляции по Спирмену составил 0,44 ($p < 0,1$). И хотя достоверность выявленной связи невысока, тем не менее она демонстрирует очевидный факт, заключающийся в прямой зависимости между сравниваемыми показателями: повышение уровня заболеваемости сопровождается ростом серопревалентности (рис. 2).

Оценка доли бессимптомных форм

Бессимптомное течение является характерным признаком COVID-19 и, как считается, может служить важным фактором трансмиссии вируса [8]. С этих позиций определение доли бессимптомных форм в популяции имеет существенное значение в плане распространения инфекции среди здоровых субъектов [9] и может в значительной мере скорректировать спектр и направление противоэпидемических мероприятий [10].

Для расчета доли бессимптомных форм среди серопозитивных волонтеров вычисляли долю лиц, у которых отсутствует хотя бы один признак: диагноз COVID-19, либо положительная ПЦР, либо симптомы ОРЗ. У жителей Тюменской области в целом этот показатель соста-

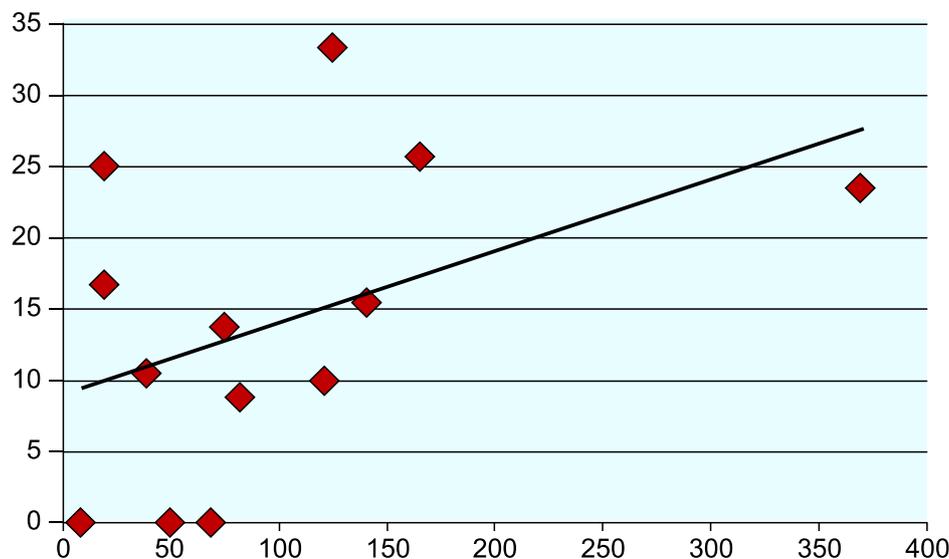


Рис. 2. Корреляционная зависимость между уровнем заболеваемости и серопревалентностью.

По оси ординат — серопревалентность, %; по оси абсцисс — заболеваемость на 100 тыс. населения.

Fig. 2. Correlation between the incidence rate and seroprevalence.

The vertical axis shows seroprevalence, %; the horizontal axis shows the incidence per 100 thousand people.

вил $97,8 \pm 1,1\%$, достигая максимального уровня у двух возрастных групп: 40–49 лет и старше 70 лет (табл. 2).

Таким образом, как и в других регионах, абсолютное число серопозитивных лиц демонстрируют бессимптомное течение. Учитывая, что серопозитивность не обязательно связана с циркуляцией РНК вируса, можно с достаточным основанием предполагать, что бессимптомное течение — больше благо, чем вред, поскольку существует определенная вероятность того, что наличие антител к нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2 может быть связано с повыше-

нием резистентности к заражению патогенным вирусом и является фактором, способствующим снижению эпидемической напряженности в популяции. Эта же тенденция лежит и в основе связи между серопревалентностью к вирусу SARS-CoV-2 и заболеваемостью COVID-19 (рис. 2).

Обсуждение

Результаты обследования населения Тюменской области, сосредоточившегося преимущественно на жителях Тюмени, показало, что уровень серопревалентности среди волонтеров

Таблица 2. Доля лиц с бессимптомным течением инфекции из общего числа серопозитивных жителей Тюменской области разных возрастных групп

Table 2. Proportion of asymptomatic cases in the total number of seropositive residents of different age groups in Tyumen Region

Возрастная группа, лет Age group, years	Число серопозитивных Total number of seropositives	Из них с бессимптомным течением Asymptomatic seropositives	Доля лиц с бессимптомным течением, % ($M \pm m$) Proportion of asymptomatic cases, % ($M \pm m$)
1–17	94	93	$98,9 \pm 2,1$
18–29	125	119	$95,2 \pm 3,8$
30–39	119	115	$96,6 \pm 3,3$
40–49	108	108	$100,0 \pm 1,9$
50–59	126	123	$97,6 \pm 2,7$
60–69	85	84	$98,8 \pm 2,3$
70 и старше / 70 and older	20	20	$100,0 \pm 4,4$
Итого / Total	677	662	$97,8 \pm 1,1$

варьировал в пределах от $13,4 \pm 5,5$ до $34,7 \pm 10,8\%$. Как и в других регионах (Санкт-Петербург и Ленинградская область) [1, 2], наиболее высокая серопревалентность отмечена среди детей. В настоящее время не представляется возможным дать исчерпывающее объяснение данной особенности. Можно лишь предположить, что определенное влияние на становление антительного коронавирусного пейзажа у детей оказывают перекрестные антитела, появляющиеся в результате острых респираторных вирусных инфекций, вызванных другими типами β -коронавирусов, имеющих общие детерминанты в нуклеокапсидных белках [11]. В остальных возрастных группах существенных отличий по уровню серопревалентности не отмечено. Довольно низкую долю лиц с наличием SARS-CoV-2-антител в старшей группе, вероятно, в некоторой степени можно объяснить малым числом лиц этого возраста среди обследованных.

При анализе других показателей серопревалентности необычных фактов не выявлено. Как и ожидалось, уровень сероконверсии был достоверно выше у реконвалесцентов после COVID-19, лиц, имевших производственный или бытовой контакт с больными, и у носителей РНК вируса, имеющих позитивный результат ПЦР.

Что касается бессимптомных форм, то обращает на себя внимание высокий уровень серопревалентности. Можно предположить две причины этого явления: с одной стороны, это характерный признак SARS-CoV-2 [10, 11], с другой стороны, нельзя исключать иннаппарантной сероконверсии, при которой даже в отсутствие манифестной формы инфекции может развиваться гуморальный иммунный ответ [5, 7].

Выводы

1. Коллективный иммунитет совокупного населения Тюменской области составил 24,5%. Максимальный уровень серопревалентности установлен у лиц в возрасте 1–6 лет (34,7%), минимальный — в группе 70 лет и старше (13,4%).

2. После инфекции COVID-19 антитела обнаруживаются в 68% случаев.

3. У лиц с позитивным результатом ПЦР-анализа, полученным ранее, антитела выявлялись в 64% случаев.

4. Уровень заболеваемости COVID-19 связан с серопревалентностью к SARS-CoV-2.

5. Доля бессимптомных форм инфекции среди серопозитивных жителей Тюменской области в целом составила 97,8%.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Г.В. Парфеновой, А.З. Умбитовой, Е.Н. Долгушиной, А.С. Хисматуллиной; сотрудникам АО «МСЧ "Нефтяник"» А.К. Купиной, И.В. Метафоновой; сотруднику ГБУЗ ТО «Городская поликлиника № 12» А.Е. Суворовой; сотрудникам Тюменской областной инфекционной больницы А.Н. Димадиевой, Н.А. Смагиной и Ю.Р. Даутовой за техническую помощь в организации работы.

ЛИТЕРАТУРА

- Manners C., Bautista E.L., Sidoti H., Lopez O.J. Protective adaptive immunity against severe acute respiratory syndrome coronaviruses 2 (SARS-CoV-2) and implications for vaccines. *Cureus*. 2020; 12(6): e8399. <https://doi.org/10.7759/cureus.8399>
- Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: understanding COVID-19 immunity. 2020; 52(5): 737–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>
- Funk C.D., Laferrière C., Ardakani A. A snapshot of the global race for vaccines targeting SARS-CoV-2 and the COVID-19 pandemic. *Front. Pharmacol.* 2020; 11: 937. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00937>
- Gomes M.G.M., Corder R.M., King J.G., Langwig K.E., Souto-Maior C., Carneiro J., et al. Individual variation in susceptibility or exposure to SARS-CoV-2 lowers the herd immunity threshold. *medRxiv*. 2020; 2020.04.27.20081893. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.20081893>
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В. и др. Популяционный иммунитет к вирусу SARS-COV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период эпидемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:124–130. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-124-130>
- Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat. Med.* 1998; 17(8): 857–87. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0258\(19980430\)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0258(19980430)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e)
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Историк О.А., Мосевич О.С., Лялина Л.В. и др. Опыт оценки популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Ленинградской области в период эпидемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:114–123. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-114-12>
- Lotfi M., Hamblin M.R., Rezaei N. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clin. Chim. Acta*. 2020; 508: 254–66. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.044>
- Yu X., Yang R. COVID-19 transmission through asymptomatic carriers is a challenge to containment. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2020; 14(4): 474–5. <https://doi.org/10.1111/irv.12743>
- Cai J., Sun W., Huang J., Gamber M., Wu J., He G. indirect virus transmission in cluster of COVID-19 cases, Wenzhou, China, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(6): 1343–5. <https://doi.org/10.1111/irv.12743>
- Vlasova A.N., Zhang X., Hasoksuz M., Nagesha H.S., Haynes L.M., Fang Y., et al. Two-way antigenic cross-reactivity between severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and group 1 animal CoVs is mediated through an antigenic site in the N-terminal region of the SARS-CoV nucleoprotein. *J. Virol.* 2007; 81(240022): 13365–77. <https://doi.org/10.1128/JVI.01169-07>

REFERENCES

1. Manners C., Bautista E.L., Sidoti H., Lopez O.J. Protective adaptive immunity against severe acute respiratory syndrome coronaviruses 2 (SARS-CoV-2) and implications for vaccines. *Cureus*. 2020; 12(6): e8399. <https://doi.org/10.7759/cureus.8399>
2. Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: understanding COVID-19 immunity. 2020; 52(5): 737–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>
3. Funk C.D., Laferrière C., Ardakani A. A snapshot of the global race for vaccines targeting SARS-CoV-2 and the COVID-19 pandemic. *Front. Pharmacol.* 2020; 11: 937. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00937>
4. Gomes M.G.M., Corder R.M., King J.G., Langwig K.E., Souto-Maior C., Carneiro J., et al. Individual variation in susceptibility or exposure to SARS-CoV-2 lowers the herd immunity threshold. *medRxiv*. 2020; 2020.04.27.20081893. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.20081893>
5. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., et al. Population immunity to the SARS-CoV-2 virus among the population of St. Petersburg in the active phase of the COVID-19 epidemic. *Problemy osobo opasnykh infektsii*. 2020; 3:124–130. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-124-130> (in Russian)
6. Newcombe R.G. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat. Med.* 1998; 17(8): 857–87. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0258\(19980430\)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0258(19980430)17:8%3C857::aid-sim777%3E3.0.co;2-e)
7. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Istorik O.A., Mosevich O.S., Lyalina L.V., et al. Experience in assessing population immunity to SARS-CoV-2 among the population of the Leningrad region during the COVID-19 epidemic. *Problemy osobo opasnykh infektsii*. 2020; 3:114–123. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-114-12> (in Russian)
8. Lotfi M., Hamblin M.R., Rezaeif N. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clin. Chim. Acta.* 2020; 508: 254–66. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.044>
9. Yu X., Yang R. COVID-19 transmission through asymptomatic carriers is a challenge to containment. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2020; 14(4): 474–5. <https://doi.org/10.1111/irv.12743>
10. Cai J., Sun W., Huang J., Gamber M., Wu J., He G. indirect virus transmission in cluster of COVID-19 cases, Wenzhou, China, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(6): 1343–5. <https://doi.org/10.1111/irv.12743>
11. Vlasova A.N., Zhang X., Hasoksuz M., Nagesha H.S., Haynes L.M., Fang Y., et al. Two-way antigenic cross-reactivity between severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and group 1 animal CoVs is mediated through an antigenic site in the N-terminal region of the SARS-CoV nucleoprotein. *J. Virol.* 2007; 81(240022): 13365–77. <https://doi.org/10.1128/JVI.01169-07>

Информация об авторах

Попова Анна Юрьевна — д.м.н., проф., руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 127994, Москва, Россия. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-2567-9037>. E-mail: depart@gsen.ru

Ежлова Елена Борисовна — к.м.н., зам. руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 127994, Москва, Россия. E-mail: ezhlova_eb@gsen.ru

Мельникова Альбина Андреевна — к.м.н., зам. начальника Управления эпидемиологического надзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 127994, Москва, Россия. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5651-1331>. E-mail: melnikova_aa@gsen.ru

Степанова Татьяна Федоровна — д.м.н., проф., директор ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6289-6274>. E-mail: stepanovaf@tniikip.rosptrebnadzor.ru

Шарухо Галина Васильевна — д.м.н., рук. Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Тюменской области, 625026, Тюмень, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0772-8224>. E-mail: nadzor72@tyumen-service.ru

Летюшев Александр Николаевич — к.м.н., в.н.с. ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия; рук. отдела эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Тюменской области, 625026, Тюмень, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4185-9829>. E-mail: nadzor72@tyumen-service.ru

Фольмер Александр Яковлевич — к.м.н., главный врач ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области», 625000, Тюмень, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8321-5637>. E-mail: tocgsen@fguz-tyumen.ru

Information about the authors

Anna Yu. Popova — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 127994, Moscow, Russia. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-2567-9037>. E-mail: depart@gsen.ru

Elena B. Ezhlova — Cand. Sci. (Med.), Deputy Head, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 127994, Moscow, Russia. E-mail: ezhlova_eb@gsen.ru

Albina A. Melnikova — Cand. Sci. (Med.), Deputy Head, Epidemiological surveillance department, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 127994, Moscow, Russia. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5651-1331>. E-mail: melnikova_aa@gsen.ru

Tatiana F. Stepanova — D. Sci. (Med.), Prof., Director, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6289-6274>. E-mail: stepanovaf@tniikip.rosptrebnadzor.ru

Galina V. Sharukho — D. Sci. (Med.), Head, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Tyumen Region, 625026, Tyumen, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0772-8224>. E-mail: nadzor72@tyumen-service.ru

Aleksandr N. Letyushev — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia; Head, Epidemiological surveillance department, Department of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Tyumen Region, 625026, Tyumen, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4185-9829>. E-mail: nadzor72@tyumen-service.ru

Aleksandr Ya. Folmer — Cand. Sci. (Med.), chief physician, Center for Hygiene and Epidemiology in the Tyumen Region, 625000, Tyumen, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8321-5637>. E-mail: tocgsen@fguz-tyumen.ru

Anna A. Shepotkova — medical statistician of the laboratory of epidemiological analysis and mathematical modeling, Tyumen

Шепоткова Анна Анатольевна — медстатистик лаб. эпидемиологического анализа и математического моделирования ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия;
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1930-5635>.
E-mail: shepotkovaaa@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Лялина Людмила Владимировна — д.м.н., проф., зав. лаб. эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9921-3505>.
E-mail: lyalina@pasteurorg.ru

Смирнов Вячеслав Сергеевич[✉] — д.м.н., проф., в.н.с. ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2723-1496>.
E-mail: vssmi@mail.ru

Степанова Ксения Борисовна — к.м.н., в.н.с. ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5420-0919>.
E-mail: stepanovakb@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Панина Цахик Арутовна — м.н.с. лаб. клиники и иммунологии биогельминтозов ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2490-4592>.
E-mail: lifa@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Сидоренко Ольга Николаевна — м.н.с. лаб. клиники и иммунологии биогельминтозов ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9032-1603>.
E-mail: lifa@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Иванова Наталья Александровна — м.н.с. лаб. клиники и иммунологии биогельминтозов ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6964-0039>.
E-mail: lifa@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Смирнова Светлана Сергеевна — м.н.с. лаб. клиники и иммунологии биогельминтозов ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2797-7570>.
E-mail: lifa@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Мальченко Инна Николаевна — врач клинического отделения ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2550-868X>.
E-mail: info@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Охотникова Елена Владимировна — врач клинического отделения ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8815-0916>.
E-mail: info@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Стахова Елена Георгиевна — врач клинического отделения ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, 625026, Тюмень, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8436-2409>.
E-mail: info@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Тололян Арег Артемович — д.м.н., проф., академик РАН, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.
E-mail: pasteur@pasteurorg.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1930-5635>.
E-mail: shepotkovaaa@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Lyudmila V. Lyalina — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Laboratory of epidemiology of infectious and non-infectious diseases, Saint Petersburg Pasteur Institute, 197101, St. Petersburg, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9921-3505>.
E-mail: lyalina@pasteurorg.ru

Vyacheslav S. Smirnov[✉] — D. Sci. (Med.), Prof., leading researcher, Saint Petersburg Pasteur Institute, 197101, St. Petersburg, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2723-1496>.
E-mail: vssmi@mail.ru

Kseniya B. Stepanova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5420-0919>.
E-mail: stepanovakb@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Tsakhik A. Panina — junior researcher, Laboratory of clinic and immunology of biohelminthiasis, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2490-4592>.
E-mail: lifa@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Olga N. Sidorenko — junior researcher, Laboratory of clinic and immunology of biohelminthiasis, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9032-1603>.
E-mail: lifa@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Natalia A. Ivanova — junior researcher, Laboratory of clinic and immunology of biohelminthiasis, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6964-0039>.
E-mail: lifa@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Svetlana S. Smirnova — junior researcher, Laboratory of clinic and immunology of biohelminthiasis, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2797-7570>.
E-mail: lifa@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Inna N. Malchenko — physician, Clinical department, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2550-868X>.
E-mail: info@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Elena V. Okhotnikova — physician, Clinical department, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8815-0916>.
E-mail: info@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Elena G. Stakhova — physician, Clinical department, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, 625026, Tyumen, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.
E-mail: info@tniikp.rosпотребнадзор.ru

Areg A. Tololian — D. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute, 197101, St. Petersburg, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.
E-mail: pasteur@pasteurorg.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Особенности изменений спектров жирных кислот бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в процессе формирования устойчивых (дормантных) клеточных форм

Андрюков Б.Г.[✉], Сомова Л.М., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В.

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

Введение. С появлением парадигмы гетерогенности популяции бактерий возросло внимание к фенотипу дормантных (дремлющих) клеток, активная генерация которых происходит при неблагоприятных условиях среды обитания микроорганизмов. Эти клетки характеризуются метаболическим и репродуктивным покоем, а также резистентностью к антибиотикам. Однако при наступлении благоприятных для них условий обитания они способны вновь прорасти и вызывать обострение инфекционных заболеваний. С этими фенотипами патогенных бактерий связывают угрожающее снижение эффективности антимикробной терапии, рост уровня заболеваемости персистирующими, хроническими и госпитальными инфекциями. С учетом ключевой роли в адаптации бактерий жирных кислот (ЖК) **целью** исследования было выявление специфических особенностей изменений ЖК-состава грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в процессе их многолетнего хранения в экстремальных условиях и формирования дормантных (некультивируемых) субпопуляций клеточных форм.

Материалы и методы. Для исследования использовали статические культуры эталонных штаммов: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enterica* Typhimurium и *Escherichia coli*, хранившиеся под вазелиновым маслом при 4–8°C в течение 5–10 лет. Дормантные клеточные формы получали путем удаления масляного слоя и сбора микробной массы. Ультроструктурные признаки дормантных клеточных форм были подтверждены трансмиссионной электронной микроскопией. Жизнеспособность дормантных клеток оценивали молекулярно-генетическим методом. Отсутствие репродуктивной активности дормантных форм проверяли путем многократных посевов на LB-бульон, среды Эндо и Серова и инкубации при 4–6, 22–24 и 37°C. Получение метиловых эфиров общих ЖК проводили по методике, утвержденной Европейским комитетом по стандартизации и рекомендованной Sherlock MIS-протоколом. Анализ метиловых эфиров ЖК осуществляли методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. После предварительной гомогенизации микробных масс бактерий липиды экстрагировали, спектры ЖК получали методом электронного удара при 70 эВ.

Результаты. Доказано, что в экстремальных условиях (низкая температура, недостаток питательных веществ, гипоксия) в популяции *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis* и *S. Typhimurium* формируется фенотипическая некультивируемая генерация дормантных клеток. Сравнительный анализ изменений ЖК-спектра в дормантном фенотипе выявил определенные особенности по сравнению с вегетативными клетками, связанные со снижением индекса ненасыщенности и доминированием длинноцепочечных насыщенных ЖК (C14–C18).

Выводы. Биологическое значение выявленных трансформаций связано, по-видимому, с особой ролью этих фракций ЖК в обратимом формировании дремлющего (некультивируемого) клеточного фенотипа и как альтернативного источника углеводов в метаболически неактивном состоянии, а также в их последующей реверсии в вегетативные клетки при наступлении благоприятных условий существования.

Ключевые слова: *Escherichia coli*; *Yersinia pseudotuberculosis*; *Salmonella Typhimurium*; дормантные (некультивируемые) клетки; жирные кислоты; резистентность; антибиотики.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР № 0545-2019-0007 «Молекулярные механизмы образования устойчивых некультивируемых форм бактерий».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В. Особенности изменений спектров жирных кислот бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в процессе формирования устойчивых (дормантных) клеточных форм. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5): 401–412.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-2>

Features of changes in spectra of fatty acids of the bacteria of the *Enterobacteriaceae* family in the process of forming stable (dormant) cell forms

Boris G. Andryukov[✉], Larisa M. Somova, Irina N. Lyapun, Marina P. Bynina, Ekaterina V. Matosova

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

Introduction. With the advent of the paradigm of heterogeneity of the bacterial population, attention has been drawn to the phenotype of dormant cells, the active generation of which occurs when adverse environmental conditions of microorganisms appear. These cells are characterized by metabolic and reproductive dormancy, as well as antibiotic resistance. However, upon the occurrence of favorable living conditions, they are able to germinate again and cause an exacerbation of infectious diseases. In recent years, a threatening decrease in the effectiveness of antimicrobial therapy and an increase in the incidence of persistent, chronic and hospital infections have been associated with these phenotypes of pathogenic bacteria. Given the key role of fatty acid (FA) in the adaptation of bacteria, the aim of this study was to identify the specific features of changes in the fatty acid composition of gram-negative bacteria from the *Enterobacteriaceae* family during their long-term storage under extreme conditions and the formation of dormant (uncultured) subpopulations of cell forms.

Materials and methods. Static cultures of following reference strains were used in the study: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enterica* Typhimurium, and *Escherichia coli*, stored under vaseline oil at 4–8°C for 5–10 years. Dormant cell forms were obtained by removing the oil layer and collecting the microbial mass. The ultrastructural features of the dormant cell forms were confirmed by transmission electron microscopy. The viability of dormant cells was assessed by a molecular genetic method. The lack of reproductive activity of dormant forms was checked by repeated inoculations on LB broth, Endo and Serov media and incubation at 4–6°C, 22–24°C, and 37°C. Methyl esters of total FAs were obtained according to the procedure approved by the European Committee for Standardization and recommended by the Sherlock MIS protocol. Analysis of fatty acid methyl esters was carried out by gas chromatography in combination with mass spectrometry. After preliminary homogenization of the bacterial masses, lipids were extracted, and FA spectra were obtained by electron impact at 70 eV.

Results. It was demonstrated that phenotypic uncultured generation of dormant cells is formed under extreme conditions (low temperature, nutrient deficiency, hypoxia) in populations of *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis* and *S. Typhimurium*. A comparative analysis of changes in the fatty acid spectrum in the dormant phenotype revealed certain features compared to vegetative cells associated with a decrease in the unsaturation index and the dominance of long-chain saturated FAs (C14–C18).

Conclusion. The biological significance of the observed transformations is apparently associated with the special role of these FA fractions in the reversible formation of dormant (uncultivated) cell phenotype and as an alternative source of carbohydrates in a metabolically inactive state, as well as their subsequent reversal to vegetative cells upon favorable living conditions.

Keywords: *Escherichia coli*; *Yersinia pseudotuberculosis*; *Salmonella Typhimurium*; dormant (uncultured) cells; fatty acids; resistance; antibiotics.

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the state assignment on the subject of research work No. 0545-2019-0007 "Molecular mechanisms of the formation of stable uncultivated forms of bacteria."

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Andryukov B.G., Somova L.M., Lyapun I.N., Bynina M.P., Matosova E.V. Features of changes in spectra of fatty acids of the bacteria of the *Enterobacteriaceae* family in the process of forming stable (dormant) cell forms. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 401–412. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-2>

Received 10 March 2020
Accepted 7 June 2020

Введение

Для сохранения жизнеспособности в условиях длительного воздействия низких температур, недостатка кислорода и питательных веществ патогенные бактерии формируют фенотипическую генерацию dormantных (устойчивых) клеточных форм. Они характеризуются резким замедлением (прекращением) метаболизма и отсутствием репродукции

на обычных питательных средах. Однако при наступлении благоприятных для них условий обитания они способны вновь прорасти и вызывать инфекционные заболевания [1, 2].

Внимание к dormantным (от англ. «dormant» — спящие) клеткам возросло в последние десятилетия в связи с активным изучением сообществ микроорганизмов мерзлотных почв Аркти-

ки. По современным представлениям, эти анабиотические клеточные фенотипы патогенных бактерий обладают высокой резистентностью ко всем антимикробным средствам и являются одной из причин возникновения госпитальных и хронических форм инфекций, в том числе ассоциированных с патогенными бактериями семейства *Enterobacteriaceae* [3, 4].

Данная таксономическая группа включает в себя важные с медицинской точки зрения виды энтеробактерий, в числе которых *Salmonella* spp., *Escherichia coli* и *Yersinia* spp., имеющие отличительные особенности и высокую клиническую значимость. Они представляют собой грамотрицательные, не образующие спор, факультативно анаэробные микроорганизмы, местом обитания которых являются внешняя среда и желудочно-кишечный тракт человека [1, 3].

В ходе исследований стратегий адаптации энтеробактерий к экстремальным условиям среды обитания выявлена ведущая роль изменений внутриклеточного спектра насыщенных (нЖК), моноеновых (моноЖК), полиненасыщенных (полиЖК) жирных кислот и их циклических изомеров (цисЖК) в жизнеобеспечении бактерий [2, 5–7]. Возможно, эти же механизмы лежат в основе формирования дормантного клеточного фенотипа в результате трансформации макромолекулярного состава и вязкоупругих характеристик энтеробактерий в процессе обратимого перехода в устойчивое и некультивируемое состояние.

Данные литературы свидетельствуют о сложности исследования дормантных фенотипов бактерий из-за трудностей создания лабораторных моделей этих анабиотических клеточных генераций в условиях длительного низкотемпературного культивирования, а также многолетнего трофического и кислородного истощения [2, 3, 8].

Цель настоящего исследования заключалась в выявлении специфических особенностей изменения жирнокислотного состава грамотрицательных бактерий из семейства *Enterobacteriaceae* в процессе их многолетнего хранения в экстремальных условиях и формирования дормантных (некультивируемых) субпопуляций клеточных форм.

Материалы и методы

Для исследования использовали статические культуры эталонных штаммов бактерий из коллекции НИИЭМ имени Г.П. Сомова: *Yersinia pseudotuberculosis* 512 серовара I-b, *Salmonella enterica* серовара Typhimurium 25902 и *Escherichia coli*, ATCC M17. Высев бактерий проводили уколом в столбик с полужидким агаром. Посевы инкубировали 24 ч при 37°C. При наличии роста пробирки заливали стерильным вазелиновым маслом, закрывали резиновыми пробками и хранили при 4–8°C в со-

ответствии с МУ 2.1.4.1057-01¹. В таком состоянии культуры находились в течение 5–10 лет (с 2010 г.). Дормантные клеточные формы получали путем удаления масляного слоя и сбора микробной массы. Клетки промывали стерильным физиологическим раствором с последующим центрифугированием.

Ультраструктурные признаки дормантных клеточных форм были подтверждены при трансмиссионной электронной микроскопии [8–11]. Образцы бактерий для электронной микроскопии отбирали путем центрифугирования культуральных сред в течение 20 мин при 1800 об/мин. Полученные бактериальные суспензии фиксировали при 20–22°C в течение 1 ч фиксатором Ито [12].

Отмытые от фиксатора суспензии дополнительно фиксировали 1% раствором OsO₄ в течение 18 ч. Далее клетки обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и последовательно проводили через смесь абсолютного этанола с акриловой смолой («Sigma Aldrich») в соотношении 2:1, 1:1. Заливку проводили чистой акриловой смолой с катализатором при 60°C в течение 48 ч.

Серийные ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме «LKB-V», контрастировали насыщенным раствором уранилацетата на 8% забуференном формалине и щелочным 0,02 М раствором цитрата свинца («Serva»). Срезы толщиной около 80 нм изучали при помощи трансмиссивного электронного микроскопа «JEM-100 S» («Jeol») при ускоряющем напряжении 80 кВ. Микрофото съемку проводили на фотопластинки ПФП-01 Т (ОАО «Компания Славич»). Фотопластинки обрабатывали в проявителе Д-19 в течение 5 мин при 20°C и фиксировали в водном растворе тиосульфата натрия 20 мин.

Анализ жизнеспособности персистирующих бактерий в исследованных изолятах проводили с помощью современной модификации метода ПЦР — viability PCR [11]. Метод основан на предварительной обработке исследуемых биообразцов специальными интеркалирующими нуклеиновые кислоты красителями, которые проникают через поврежденные мембраны клеток, связываются с ДНК и разрушают ее при последующей фотоактивации, а амплифицируется только ДНК из клеток с неповрежденными мембранами. В качестве интеркалирующего агента использовали бромистый этидий («Serva») [11, 12].

Амплификации ДНК *Salmonella* и *E. coli* проводили с использованием набора реагентов АмплиСенс® ОКИ скрин-FL (ООО «Компания Хеликон») с гибридационно-флуоресцентной детекцией («Интерлабсервис»). Для выявления ДНК

¹ Методические указания МУ 2.1.4.1057-01: Процедура ведения эталонных бактериальных культур (утв. 06.07.2001).

Y. pseudotuberculosis применяли «ScreenMix-HS» («Евроген») с идентификацией специфического гена цитотоксического некротизирующего фактора *cnfY*, который был амплифицирован в присутствии Taq-полимеразы с помощью праймеров 5'-GCAGGTGGGAGCAACAAGAT-3' и 3'-ACGGCGAACTTGATAATTGCTT-5'.

Тестирование проводили в соответствии с прилагаемыми инструкциями на биомассах персистирующих изолятов соответствующих микроорганизмов, полученных, как указано выше. ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология») по следующей программе: денатурация 1 цикл 95°C — 2 мин 30 с, затем отжиг 25 циклов: 95°C — 40 с, 56°C — 30 с, 72°C — 2 мин и синтез 1 цикл 72°C — 7 мин 40 с. Полученные ампликоны анализировали методом горизонтального электрофореза в 1% геле агарозы, содержащем бромистый этидий. Электрофорез продуктов ПЦР вели в 1% агарозном геле («Serva Electrophoresis GmbH») и в трис-боратном буфере. Гели окрашивали в бромистом этидии и фотографировали в ультрафиолетовом свете в системе гель-документирования «Bio-Rad XR» («Bio-Rad Laboratories Inc.»). В качестве маркера молекулярного веса использовали «PCR Markers» («Promega Corp.»).

Отсутствие репродуктивной активности дормантов проверяли путем многократных посевов на LB-бульон, среды Эндо и Серова и инкубации при 4–6, 22–24 и 37°C.

Вегетативные клетки исследованных штаммов энтеробактерий получали при периодическом культивировании в жидкой питательной среде (LB-бульон, ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) после 3–4 пассажей и инкубации в течение 7 сут при 37°C. Тестовые свойства культур проверяли в соответствии с МУ 2.1.4.1057-01. Перед дальнейшим этапом — гомогенизацией и экстракцией липидов — исследуемые культуры бактерий выдерживали в течение 48 ч при 4–6°C. Образцы 2-суточных культур обрабатывали сразу после отбора, клетки смывали стерильным физиологическим раствором с последующим центрифугированием.

Получение метиловых эфиров общих ЖК проводили по методике, утвержденной Европейским комитетом по стандартизации (CEN, 2003 г.) и рекомендованной Sherlock MIS-протоколом (редакция 2012 г.) [10]. Анализ метиловых эфиров ЖК осуществляли методом газовой хроматографии (ISO 5508:1990) в сочетании с масс-спектрометрией [9, 10]. При невозможности немедленного анализа их консервировали в органических растворителях или замораживали при –5°C [10]. Пробы промывали, центрифугировали, супернатант сливали, а осадок высушивали и подвергали кислотному метанолизу в 2,5 М HCl в метаноле. Безводный раствор HCl в метаноле готовили по методу [9]. Метанолиз прово-

дили в 0,5 мл реактива на 2–10 мг сухого остатка в течение 2 ч при 70°C [9, 10].

Исследовали по 6 проб каждого изолята изучаемых бактерий. После предварительной гомогенизации микробные пробы подвергались стандартной методике экстракции по Фолчу в модификации [13] с последующей переэтерификацией извлеченных ЖК в метиловые эфиры. В соответствии с описанной методикой каждый образец трижды экстрагировали смесью хлороформа и метанола (1:1) двукратным объемом экстрагирующей смеси по отношению к объему пробы. ЖК анализировали на хроматографе «Shimadzu GC-2010» с использованием капиллярной кварцевой колонки (30 м × 0,25 мм) с фазой «Supelcowax 10»; идентифицировали по данным газо-жидкостной масс-спектрометрии на приборе «Shimadzu GCMS QP5050A», используя два типа колонок: «Supelcowax 10» (при 210°C) и «MDN-5S» (в градиенте температуры 200–300°C со скоростью 2°C/мин). Все спектры получали методом электронного удара при 70 эВ. Все исследуемые изоляты бактерий были экстрагированы шестикратно для оценки воспроизводимости.

Для статистического анализа количественных данных был применен пакет программ «Statistica 6.1» («Statsoft Inc.») с использованием методов описательной статистики и непараметрических критериев (ANOVA). Количественные данные представлены в виде среднего арифметического значения и среднего квадратического отклонения при оценке данных естественного разброса. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез был равен 0,05. Для изучения колебаний относительных значений мажорных фракций ЖК вычисляли коэффициент вариации (CV).

Результаты

При проведении электронной трансмиссионной микроскопии в клеточных субпопуляциях энтеробактерий в условиях длительного низкотемпературного культивирования, а также многолетнего трофического и кислородного истощения выявлены признаки субтотального замещения вегетативных клеток дормантными клеточными формами. Это подтверждает выявление специфических ультраструктурных признаков бактерий, находящихся в покоящемся (некультивируемом) состоянии: клетки протопластного или сферопластного типов с пустым цитозолем, увеличенным периплазматическим пространством, нарушенной слоистостью клеточной стенки и целостностью цитоплазматической мембраны. Полученные признаки соответствовали ранее описанной ультраструктурной организации покоящихся (некультивируемых) клеток [8–10]. Аналогичные электронно-микроскопические исследования вегетативных культур выявили типичные морфологические признаки энтеробактерий (рис. 1).

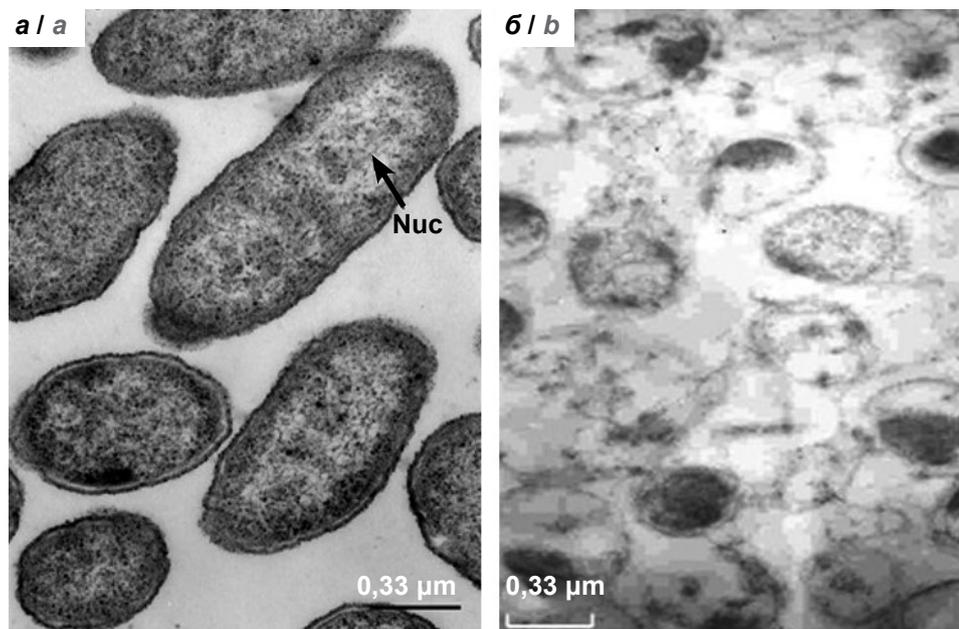


Рис. 1. Субтотальное замещение вегетативных клеток dormantными клеточными формами (а); ультраструктурные признаки dormantных некультивируемых клеточных форм (б) в статической культуре *Y. pseudotuberculosis*, штамм 512-1 серовариант I-b (9 лет, полужидкий агар, 4–8°C).

Трансмиссионная электронная микроскопия, × 15 000 (фото Л.М. Сомовой).

Fig. 1. Subtotal replacement of vegetative cells with dormant cell forms (a); ultrastructural signs of dormant uncultivated cell forms (b) in a static culture of *Y. pseudotuberculosis*, strain 512-1 serovariant I-b (9 years old, semi-liquid agar, 4–8°C).

Transmission electron microscopy, × 15,000 (photo by L.M. Somova).

Сравнительный анализ полученных спектров ЖК у вегетативных и dormantных клеточных форм выявил достаточно стабильные липидные профили у всех исследуемых энтеробактерий. Оценка относительных значений CV мажорных фракций ЖК вегетативных культур и dormantных клеточных форм исследуемых штаммов энтеробактерий (в сумме составлявших более 90%) показала, что они не превышают 10%. Эти показатели свидетельствуют о слабой колеблемости признака, а средние линейные отклонения в совокупности

варьировали от $8,80 \pm 1,63\%$ до $9,33 \pm 0,66\%$ для *Y. pseudotuberculosis*, от $8,24 \pm 1,54\%$ до $8,51 \pm 1,26\%$ для *S. Typhimurium* и от $8,26 \pm 1,49\%$ до $8,53 \pm 1,37\%$ для *E. coli*.

В экстрактах вегетативных и dormantных бактерий выявлены и идентифицированы метиловые эфиры ЖК, содержащие 12–18 атомов углерода. Полученные спектры содержали до 20 фракций кислот, которые анализировали и сравнивали по 11 мажорным пикам (типичная хроматограмма показана на **рис. 2**). Большинство минорных пиков не были

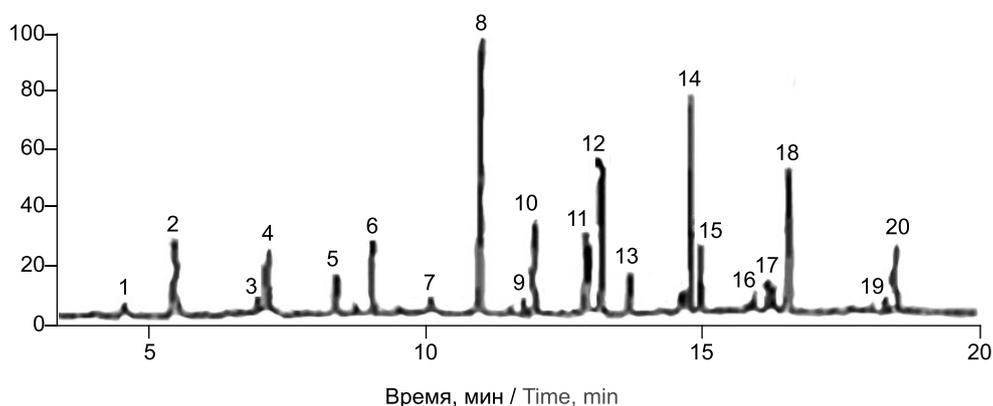


Рис. 2. Газовая хроматограмма метиловых эфиров ЖК из вегетативных клеток *S. Typhimurium*, штамм 25902.

Номерами обозначены пики ЖК, числовые значения мажорных пиков приведены в табл. 1.

Fig. 2. Gas chromatogram of FA methyl esters from vegetative cells of *S. Typhimurium*, strain 25902.

The numbers indicate the FA peaks, the numerical values of the major peaks are given in Table 1.

идентифицированы как метиловые эфиры ЖК и не анализировались.

ЖК, элюирующие ранее, чем C12, а также гидроксикислоты в исследование не включали из-за плохой воспроизводимости относительных площадей пиков.

Мажорные фракции выявленных ЖК у вегетативных клеток исследуемых штаммов (табл. 1) были представлены длинноцепочечными кислотами (C14–C18) с преобладанием C16:0 (пальмитиновой), C16:1 ω 7 (пальмитолеиновой), C17:1 (маргаринолеиновой), C18:1 ω 9 (олеиновой) и C18:1 ω 7 (цис-вакценовой). Вклад этих фракций в общий спектр у разных штаммов исследованных бактерий был разным, однако их суммарное содержание было статистически значимо выше совокупности других ЖК ($p < 0,05$).

Ранее в ряде работ [5–7] проводили анализ спектров ЖК из бактерий, принадлежащих к семейству *Enterobacteriaceae*, профили основных кислот которых были аналогичны полученным в настоя-

щем исследовании. Преобладание в спектрах указанных ЖК является стабильным и патогномичным признаком для энтеробактерий [14, 15].

Установлено статистически значимое ($p < 0,01$) преобладание в спектрах ЖК у исследованных штаммов насыщенной гексадекановой кислоты (C16:0), содержание которой варьировало в пределах 28–33%, что, по данным литературы, является патогномичным признаком энтеробактерий [14–17]. Расчетный индекс насыщенности ЖК [14, 16] вегетативных клеток составил от 0,53 (*S. Typhimurium*) до 0,97 (*Y. pseudotuberculosis*), что соответствует данным литературы [14–17]. Общая совокупность фракций нЖК (C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0) в спектрах вегетативных клеток составила более 50% (табл. 1).

Полученные результаты соответствуют выводам отечественных и зарубежных исследователей о высокой консервативности спектра ЖК у бактерий, который является их таксономической харак-

Таблица 1. Мажорные фракции ЖК вегетативных клеточных форм исследованных грамотрицательных бактерий
Table 1. Major fractions of fatty acids of vegetative cell forms of the studied gram-negative bacteria

№ проб Number of sample	ЖК (мажорные фракции), % Fatty acids (major fractions), %										
	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1 ω 7	C17:1	C18:0	C18:1 ω 9	C18:1 ω 7	C18:2 ω 6
<i>E. coli</i> , ATCC M17 ИН / Unsaturation index = 0,61											
1	1,04	2,91	0,26	0,31	33,72	11,97	11,28	6,48	14,29	7,18	5,38
2	1,01	2,89	0,33	0,24	32,97	11,97	12,00	6,40	13,80	6,92	5,12
...6	1,11	3,01	0,30	0,21	33,19	12,77	12,31	5,39	14,19	7,24	5,22
<i>M</i> \pm <i>m</i>	1,05 \pm 0,44	2,93 \pm 0,71	0,30 \pm 0,07	0,27 \pm 0,06	33,39 \pm 0,64	12,34 \pm 0,67	12,09 \pm 0,54	6,26 \pm 0,55	14,19 \pm 0,81	7,11 \pm 0,70	5,23 \pm 0,66
CV, %	6,85	9,18	6,29	6,30	9,68	8,48	9,47	8,78	9,97	8,21	7,69
<i>S. Typhimurium</i> , 25902 ИН / Unsaturation index = 0,53											
1	3,40	3,45	0,14	0,11	30,53	10,96	9,91	12,04	11,01	11,10	3,98
2	3,82	2,99	0,10	0,05	30,37	11,82	10,13	11,39	12,10	11,28	5,01
...6	2,81	3,76	0,11	0,10	31,28	11,90	10,13	11,40	11,19	10,99	3,57
<i>M</i> \pm <i>m</i>	3,34 \pm 0,43	3,40 \pm 0,46	0,11 \pm 0,03	0,11 \pm 0,04	30,73 \pm 0,81	11,56 \pm 0,84	10,05 \pm 0,64	11,24 \pm 0,75	11,61 \pm 0,81	11,12 \pm 0,65	4,18 \pm 0,72
CV, %	8,99	7,79	6,41	6,39	9,91	9,30	9,74	9,43	9,70	8,72	7,18
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , 512, I-b ИН / Unsaturation index = 0,97											
1	2,97	2,50	0,20	0,22	28,12	10,26	9,82	10,87	13,01	8,84	4,98
2	3,02	2,28	0,24	0,14	28,16	10,35	9,67	11,10	12,88	9,06	3,88
...6	3,01	2,48	0,20	0,22	27,99	10,52	9,35	10,91	13,00	8,99	4,56
<i>M</i> \pm <i>m</i>	3,00 \pm 0,45	2,42 \pm 0,24	0,24 \pm 0,08	0,19 \pm 0,07	28,08 \pm 0,72	10,37 \pm 0,59	9,61 \pm 0,49	10,96 \pm 0,44	12,93 \pm 0,77	8,96 \pm 0,55	4,47 \pm 0,69
CV, %	9,50	9,00	6,88	6,92	9,18	9,68	9,38	8,75	9,98	8,89	8,58

Примечание. ИН — индекс ненасыщенности.

теристикой [15–17]. Анализ ЖК-состава вегетативных популяций показал отсутствие статистически значимых различий в содержании отдельных фракций ЖК.

Качественный и количественный составы ЖК dormantных клеточных форм энтеробактерий, находящихся при 6–8°C в стационарном режиме, претерпевают существенные изменения. В исследованных изолятах, по сравнению с исходными значениями, существенно выросло относительное содержание среднецепочечных ЖК с числом атомов углерода 8–12 ($p < 0,05$) и сохранилось значительное количество насыщенных длинноцепочечных кислот (C14–C18). При этом ИН ЖК (отношение ненасыщенных жирных кислот к насыщенным) у dormantных форм снизился по сравнению с вегетативными клетками этих же бактерий (табл. 2).

При анализе изменений качественного состава ЖК в процессе обратимого перехода вегетативных клеток в dormantные клеточные формы исследуемых грамотрицательных бактерий была выявлена статистически значимая тенденция снижения относительного количества моноЖК у некультивируемых клеток. Кроме того, у dormantных форм по сравнению с вегетативными клетками было выявлено существенное снижение полиЖК, особенно выраженное у *S. Typhimurium* ($p < 0,02$), а также цисЖК (табл. 3).

Обсуждение

ЖК являются важными компонентами клеточных мембран бактерий, а их профили уникальны и предоставляют важную информацию для систематики микроорганизмов. Активность ферментов,

Таблица 2. Мажорные фракции ЖК dormantных клеточных форм исследованных грамотрицательных бактерий
Table 2. Major fractions of fatty acids of dormant cell forms of the studied gram-negative bacteria

№ проб Number of sample	ЖК (мажорные фракции), % Fatty acids (major fractions), %										
	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1ω7	C17:1	C18:0	C18:1ω9	C18:1ω7	C18:2ω6
<i>E. coli</i> , ATCC M17 ИН / Unsaturation index = 0,51											
1	4,82	5,71	5,21	4,83	27,32	9,01	6,91	6,02	14,31	6,28	3,61
2	5,22	5,92	4,91	5,01	25,38	8,98	7,11	6,11	15,76	6,22	3,71
...6	5,07	6,06	5,09	5,04	26,58	8,89	7,25	5,87	14,82	6,22	3,91
<i>M ± m</i>	5,05 ± 0,84	5,89 ± 0,71	5,07 ± 0,94	4,95 ± 0,81	26,42 ± 0,94	8,96 ± 0,18	7,09 ± 0,94	6,26 ± 0,82	14,96 ± 0,61	6,24 ± 0,38	3,74 ± 0,17
<i>p</i>	< 0,02	< 0,02	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05
CV, %	7,98	7,52	9,52	8,89	9,62	7,54	9,47	9,78	8,97	7,20	7,28
<i>S. Typhimurium</i> , 25902 ИН / Unsaturation index = 0,42											
1	3,81	2,68	2,41	3,57	28,03	10,02	8,71	8,52	11,85	8,37	2,22
2	4,21	3,41	3,03	3,46	29,07	10,14	9,02	9,08	11,32	7,89	2,12
...6	4,02	3,12	3,02	3,09	28,48	10,00	9,42	8,49	11,48	8,42	2,06
<i>M ± m</i>	4,02 ± 0,64	3,07 ± 0,71	3,15 ± 0,51	3,37 ± 0,44	28,53 ± 0,81	10,08 ± 0,61	9,05 ± 0,81	9,06 ± 0,71	11,55 ± 0,71	8,22 ± 0,80	2,14 ± 0,64
<i>p</i>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
CV, %	9,12	9,13	7,12	7,23	9,31	7,21	9,62	7,62	7,26	9,82	7,15
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , 512, I-b ИН / Unsaturation index = 0,37											
1	4,22	5,62	2,91	2,90	29,42	8,10	8,32	6,86	10,78	5,34	3,01
2	4,32	4,81	3,01	2,97	30,11	9,01	9,00	7,06	11,89	5,11	4,13
...6	5,19	5,22	3,00	2,82	29,92	8,02	8,95	6,97	11,76	6,08	4,32
<i>M ± m</i>	5,58 ± 0,44	5,19 ± 0,78	2,97 ± 0,77	2,90 ± 0,67	29,82 ± 0,68	8,37 ± 0,51	8,76 ± 0,63	6,97 ± 0,51	11,54 ± 0,47	5,51 ± 0,61	3,82 ± 0,71
<i>p</i>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
CV, %	9,12	9,06	9,50	8,00	9,18	9,64	9,32	9,71	9,98	9,68	9,52

Примечание. *p* — уровень значимости различий по сравнению с вегетативными клеточными формами энтеробактерий (табл. 1).
Note. *p* — level of significance of differences from vegetative cell forms of *Enterobacteria* (Table 1).

Таблица 3. Изменения качественного состава ЖК в процессе обратимого перехода вегетативных клеток в dormantные клеточные формы грамотрицательных бактерий (%)**Table 3.** Changes in the qualitative composition of fatty acids during the reversible transition of vegetative cells to dormant cell forms of gram-negative bacteria (%)

Энтеробактерии Enterobacteria	нЖК Saturated FA		моноЖК Monounsaturated FA		полиЖК Polyunsaturated FA		цисЖК cisFA	
	вегетативные vegetative	дормантные dormant	вегетативные vegetative	дормантные dormant	вегетативные vegetative	дормантные dormant	вегетативные vegetative	дормантные dormant
<i>E. coli</i>	42,85	43,52	46,84	42,32*	5,23	3,74	35,87	33,90
<i>S. Typhimurium</i>	45,48	44,03	44,45	42,05*	4,18	2,14**	38,47	31,99*
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	41,65	44,88	42,11	37,15*	4,47	3,82	36,73	29,24*

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$ по сравнению с вегетативными клеточными формами.**Note.** * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$ relative to vegetative bacteria cells.

участвующих в синтезе ЖК, определяется изменяющимися факторами окружающей среды. В связи с этим в различных условиях существования бактерий меняются относительное содержание ЖК, длина их цепей и насыщенность.

Газовая хроматография уже более полувека служит одним из наиболее стандартизированных методов анализа ЖК, являясь чувствительным, точным и воспроизводимым методом [13–15, 17–19]. С помощью этого аналитического инструмента изучен ЖК-спектр у большинства микроорганизмов, определены маркеры отдельных родов и видов бактерий [14, 17].

Это относится к представителям семейства *Enterobacteriaceae*, используемым в настоящем исследовании, у которых состав ЖК, по данным ранее проведенных исследований, отличается высокой однородностью (средний коэффициент Bousfield составляет от 0,89 у *Y. pseudotuberculosis* до 0,78 у *E. coli*) [16, 19].

Однако ряд исследователей справедливо отмечают зависимость полученных результатов газохроматографических спектров от условий экспериментов [14–16, 18]. Поэтому для оптимизации стабильности и получения воспроизводимых результатов мы проводили экстракцию в стандартных условиях, насколько это позволяли условия исследования. Известно, что спектр ЖК у бактерий зависит от фазы роста, возраста культур и температуры культивирования, влияющей на физическое состояние и текучесть мембраны [13–15, 17, 18]. Поэтому для нивелирования воздействия влияющих факторов перед экстракцией метиловых эфиров ЖК авторы инкубировали вегетативные пробы в течение 2 сут при 6–8°C в стационарной фазе роста.

Это исследование представляет собой первый анализ спектра ЖК у dormantных клеточных форм бактерий, полученных на лабораторной модели в условиях длительного воздействия экстремальных

факторов. Бактериальное восприятие различных сигналов окружающей среды приводит к фенотипическим трансформациям метаболизма и репродукции, а также переключает транскрипционный аппарат многочисленных регуляторных систем [20, 21]. Аналогичные процессы также протекают в энтеробактериях, которые содержат значительный набор регуляторов транскрипции, хорошо известных как сигма-факторы, реагирующие на стрессы [21], в том числе на гипоксию, дефицит питательных веществ и низкую температуру [22, 23].

В ходе эксперимента одновременно решались несколько задач, связанных с исследованием жизнеспособности некультивируемых клеточных форм, оценкой методов их реверсии и сохранением вирулентных свойств патогенных бактерий. Кроме того, в ходе эксперимента анализировали микромеханические свойства клеточной мембраны и макромолекулярной структуры одиночных dormantных клеток с использованием методов молекулярной микробиологии (неопубликованные данные).

Одна из задач этого исследования — проверка гипотезы о значении ЖК при адаптационных трансформациях патогенных бактерий в условиях длительного и экстремального по значениям воздействия неблагоприятных условий существования (низкая температура, дефицит питательных веществ и гипоксия). Моделируя условия эксперимента, авторы исходили из того, что некультивируемые бактерии в состоянии покоя используют механизмы сохранения жизнеспособности, сталкиваясь с низкой температурой природных экосистем, а также неблагоприятными условиями микроокружения внутри организма-хозяина, включая гипоксию и недостаток питательных веществ [21–23].

Во время исследования было сосредоточено внимание на ЖК как на критическом и потенциально ограниченном ресурсе, который является гидрофобным структурным компонентом клеточной

стенки грамотрицательных бактерий и их важнейшим энергетическим субстратом [20, 24, 25].

Поскольку синтез липидов у бактерий обычно зависит от внешних источников [26, 27], которые в настоящем эксперименте при формировании dormantных форм были перекрыты, основное внимание было сосредоточено на спектре ЖК.

В последние годы на моделях *E. coli* были установлены молекулярно-генетические механизмы формирования dormantных клеточных форм [28]. Выявлено, что большинство из них нацелены на ингибирование ключевых внутриклеточных звеньев метаболизма и репродукции — синтеза белков и репликации нуклеиновых кислот при активном участии вторичных мессенджеров-индукторов [26, 28].

К последним относят внутриклеточные нуклеотидные молекулы-алармоны (p)ppGpp (гуанозин пентафосфат и гуанозин тетрафосфат). Они играют ключевую роль в ответе бактериальной клетки на внешние раздражители, выполняют функцию одного из основных медиаторов «строгого контроля» и регулятора активности метаболизма [28].

Вероятно, неповрежденный липидный метаболизм у некультивируемых бактерий является важным фактором, который необходимо учитывать при изучении не только dormantного клеточного фенотипа бактерий, но и механизмов их последующей реверсии в вегетативные формы. Сравнительный анализ спектров ЖК показал, что у некультивируемого клеточного фенотипа доминировали длинноцепочечные кислоты, которые в условиях ингибирования белкового синтеза индуцировали формирование dormantных поколений бактерий и их свойства (повышение лекарственной толерантности и низкую метаболическую активность). Отчасти это предположение подтверждают результаты исследований зарубежных авторов [23, 26, 27].

Например, в недавней работе P. Del Portillo и соавт. (2019) установили изменение липидного метаболизма *Mycobacterium tuberculosis* при адаптации к условиям гипоксии. Основным источником углеводов бактерий в условиях недостатка кислорода становятся длинноцепочечные ЖК. Тем самым авторы подтвердили ключевую роль гипоксии в формировании персистирующих клеточных форм *M. tuberculosis*. Установлено, что в экстремальных условиях длинноцепочечные ЖК используются бактериями в качестве основного источника углеводов [24]. Этот же алармический путь метаболизма важен не только при гипоксии, но и при низкотемпературной адаптации, в условиях дефицита питательных веществ [25, 26].

Токсин-антитоксиновые системы *M. tuberculosis*, экспрессия которых регулируется сигналами из окружающей среды, являются актуальными для формирования персистенции бактерий и их выжи-

вания в условиях гипоксии. В частности, промоторы *sigE* и *sigB* выступали как факторы транскрипции, избирательно стимулируя экспрессию целевых генов, кодирующих длинноцепочечные ЖК [24].

A. Battesti (2006) на модели *E. coli* было показано, что при реакции бактерий на стресс, связанный с длительным голоданием, при участии длинноцепочечных нЖК происходит активация синтеза (p)ppGpp. В качестве кофактора при этом выступает ацильный белок-носитель (ACP), который может ингибировать рост клеток и индуцировать их переход в дремлющее (некультивируемое) состояние [27].

В ходе аналогичных исследований J.E. Cronan с соавт. (2009) установили, что структурная пластичность ACP и его ацитилированной формы проявляется в инициации синтеза ЖК у бактерий при стрессе как в отношении их насыщенности (снижение относительного количества моноЖК и полиЖК), так и длины ацильной цепи (укорочение) в условиях ингибирования активности ферментов при голодании бактерий [28].

Проведенный нами сравнительный анализ спектров ЖК при обратимом формировании dormantных клеточных форм и у вегетативных клеток энтеробактерий показал, что выводы о связи регуляции синтеза ЖК с формированием некультивируемого фенотипа у бактерий, сделанные на модели *E. coli* [27], справедливы и для других представителей семейства *Enterobacteriaceae*. При этом мы сделали предположение об исключительной важности роли длинноцепочечных нЖК как основного источника углеводов не только в формировании dormantных клеток, но и при их реверсии в вегетативные клетки при наступлении благоприятных условий.

Таким образом, в результате длительного хранения (до 10 лет) *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis* и *S. Typhimurium* в экстремальных условиях (низкая температура, недостаток питательных веществ, гипоксия) в популяции формируется фенотипическая некультивируемая генерация dormantных клеток [25, 29, 30]. Сравнительный анализ изменений ЖК-спектра в dormantном фенотипе выявил определенные особенности по сравнению с вегетативными клетками, связанные со снижением ИН и доминированием длинноцепочечных нЖК (C14–C18). Биологическое значение выявленных трансформаций у dormantных бактерий связано, по-видимому, с усилением роли этих фракций ЖК в обратимом формировании дремлющего (некультивируемого) клеточного фенотипа при появлении неблагоприятных условий обитания, а также в создании источника углеводов в метаболически неактивном состоянии и в процессе их последующей реверсии в вегетативные клетки при наступлении благоприятных условий существования.

ЛИТЕРАТУРА

- Miyaue S., Suzuki E., Komiyama Y., Kondo Y., Morikawa M., Maeda S. Bacterial memory of persisters: bacterial persister cells can retain their phenotype for days or weeks after withdrawal from colony-biofilm culture. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 1396. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01396>
- Hice S.A., Santoscoy M.C., Soupir M.L., Cademartiri R. Distinguishing between metabolically active and dormant bacteria on paper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 102(1): 367–75. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8604-y>
- Bublitz D.C., Wright P.C., Wright P.C., Bodager J.R., Rasambainarivo F.T., Bliska J.B., et al. Epidemiology of pathogenic Enterobacteria in humans, livestock, and peridomestic rodents in rural Madagascar. *PLoS One.* 2014; 9(7): e101456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101456>
- WHO. Antimicrobial resistance; 2015. Available at: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/>
- Barák I., Muchová K. The role of lipid domains in bacterial cell processes. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(2): 4050–65. <https://doi.org/10.3390/ijms14024050>
- Schennink A., Heck J.M., Bovenhuis H., Visker M.H., van Valenberg H.J., van Arendonk J.A. Milk fatty acid unsaturation: genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). *J. Dairy Sci.* 2008; 91(5): 2135–43. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0825>
- Yao J., Rock C.O. Exogenous fatty acid metabolism in bacteria. *Biochimie.* 2017; 141: 30–9. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.015>
- Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Матосова Е.В., Ляпун И.Н. фенотипическая пластичность бактерий как стратегия резистентности и объект современных антимикробных технологий (обзор). *Современные технологии в медицине.* 2019; 11(2): 164–82. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.22>
- Ichihara K., Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 2010; 51(3): 635–40. <https://doi.org/10.1194/jlr.D001065>
- Sherlock. Microbial Identification System. V. 6.2. MIS Operating Manual. Newark: Sandy Dr.; 2012.
- Cangelosi G.A., Meschke J.S. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(19): 5884–91. <https://doi.org/10.1128/aem.01763-14>
- Soejima T., Iida K., Qin T., Tani H., Seki M., Takade A., et al. Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. *Microbiol. Immunol.* 2007; 51(8): 763–75. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03966.x>
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37(8): 911–17. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Li Y., Wu S., Wang L., Li Y., Shi F., Wang X. Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 2010; 90(8): 1380–3. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3931>
- Tan Y., Wu M., Liu H., Dong X., Guo Z., Song Z., et al. Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2010; 50(1): 104–11. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02762.x>
- Viarengo G., Sciarra M.I., Salazar M.O., Kieffer P.M., Furlán R.L., García Véscovi E. Unsaturated long chain free fatty acids are input signals of the *Salmonella enterica* PhoP/PhoQ regulatory system. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(31): 22346–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.472829>
- Janßen H.J., Steinbüchel A. Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnol. Biofuels.* 2014; 7(1): 7. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-7>
- Huang C.B., Alimova Y., Myers T.M., Ebersole J.L. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch. Oral. Biol.* 2011; 56(7): 650–4. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011>
- Matsumoto K., Kusaka J., Nishibori A., Hara H. Lipid domains in bacterial membranes. *Mol. Microbiol.* 2006; 61(5): 1110–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05317.x>
- Bousfield I.J., Smith G.L., Dando T.R., Hobbs G. Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform and some other bacteria. *Microbiology.* 1983; 129(2): 375–94. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-2-375>
- Van Teeseling M.C.F., de Pedro M.A., Cava F. Determinants of bacterial morphology: from fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1264. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264>
- Paget M.S. Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: structure, function and distribution. *Biomolecules.* 2015; 5(3): 1245–65. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>
- Shen G., Li X. The multifaceted role of hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) in lipid metabolism, hypoxia and human diseases. <https://doi.org/10.5772/65340> Available at: <https://www.intechopen.com/books/hypoxia-and-human-diseases/the-multifaceted-role-of-hypoxia-inducible-factor-1-hif1-in-lipid-metabolism>
- Del Portillo P., García-Morales L., Menéndez M.C., Anzola J.M., Rodríguez J.G., Helguera-Repetto A.C., et al. Hypoxia is not a main stress when *Mycobacterium tuberculosis* is in a dormancy-like long-chain fatty acid environment. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2019; 8: 449. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00449>
- Mocali S., Chiellini C., Fabiani A., Decuzzi S., de Pascale D., Parrilli E., et al. Ecology of cold environments: new insights of bacterial metabolic adaptation through an integrated genomic-phenomic approach. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 839. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00876-4>
- Hassan N., Anesio A.M., Rafiq M., Holtvoeth J., Bull I., Halcem A., et al. Temperature driven membrane lipid adaptation in glacial psychrophilic bacteria. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00824>
- Battesti A., Bouveret E. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* 2006; 62(4): 1048–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05442.x>
- Cronan J.E., Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods Enzymol.* 2009; 459: 395–33. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04617-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04617-5)
- Jöers A., Vind K., Hernández S.B., Maruste R., Pereira M., Brauer A., et al. Muropeptides stimulate growth resumption from stationary phase in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 18043. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54646-5>
- Burkert A., Douglas T.A., Waldrop M.P., Mackelprang R. Changes in the active, dead, and dormant microbial community structure across a Pleistocene permafrost chronosequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(7): e02646-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02646-18>

REFERENCES

- Miyaue S., Suzuki E., Komiyama Y., Kondo Y., Morikawa M., Maeda S. Bacterial memory of persisters: bacterial persister cells can retain their phenotype for days or weeks after withdrawal from colony-biofilm culture. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 1396. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01396>
- Hice S.A., Santoscoy M.C., Soupir M.L., Cademartiri R. Distinguishing between metabolically active and dormant bacteria on paper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 102(1): 367–75. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8604-y>

3. Bublitz D.C., Wright P.C., Wright P.C., Bodager J.R., Rasambainarivo F.T., Bliska J.B., et al. Epidemiology of pathogenic Enterobacteria in humans, livestock, and peridomestic rodents in rural Madagascar. *PLoS One*. 2014; 9(7): e101456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101456>
4. WHO. Antimicrobial resistance; 2015. Available at: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/>
5. Barák I., Muchová K. The role of lipid domains in bacterial cell processes. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(2): 4050–65. <https://doi.org/10.3390/ijms14024050>
6. Schennink A., Heck J.M., Bovenhuis H., Visker M.H., van Valenberg H.J., van Arendonk J.A. Milk fatty acid unsaturation: genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). *J. Dairy Sci.* 2008; 91(5): 2135–43. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0825>
7. Yao J., Rock C.O. Exogenous fatty acid metabolism in bacteria. *Biochimie*. 2017; 141: 30–9. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.015>
8. Andryukov B.G., Somova L.M., Matosova E.V., Lyapun I.N. Phenotypic plasticity as a strategy of bacterial resistance and an object of advanced antimicrobial technologies (review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2019; 11(2): 164–82. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.22>
9. Ichihara K., Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 2010; 51(3): 635–40. <https://doi.org/10.1194/jlr.D001065>
10. Sherlock. Microbial Identification System. V. 6.2. MIS Operating Manual. Newark: Sandy Dr.; 2012.
11. Cangelosi G.A., Meschke J.S. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(19): 5884–91. <https://doi.org/10.1128/aem.01763-14>
12. Soejima T., Iida K., Qin T., Taniai H., Seki M., Takade A., et al. Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. *Microbiol. Immunol.* 2007; 51(8): 763–75. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03966.x>
13. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37(8): 911–17. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
14. Li Y., Wu S., Wang L., Li Y., Shi F., Wang X. Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 2010; 90(8): 1380–3. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3931>
15. Tan Y., Wu M., Liu H., Dong X., Guo Z., Song Z., et al. Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2010; 50(1): 104–11. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02762.x>
16. Viarengo G., Sciarra M.I., Salazar M.O., Kieffer P.M., Furlán R.L., García Vescovi E. Unsaturated long chain free fatty acids are input signals of the *Salmonella enterica* PhoP/PhoQ regulatory system. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(31): 22346–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.472829>
17. Janßen H.J., Steinbüchel A. Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnol. Biofuels*. 2014; 7(1): 7. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-7>
18. Huang C.B., Alimova Y., Myers T.M., Ebersole J.L. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch. Oral Biol.* 2011; 56(7): 650–4. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011>
19. Matsumoto K., Kusaka J., Nishibori A., Hara H. Lipid domains in bacterial membranes. *Mol. Microbiol.* 2006; 61(5): 1110–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05317.x>
20. Bousfield I.J., Smith G.L., Dando T.R., Hobbs G. Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform and some other bacteria. *Microbiology*. 1983; 129(2): 375–94. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-2-375>
21. Van Teeseling M.C.F., de Pedro M.A., Cava F. Determinants of bacterial morphology: from fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1264. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264>
22. Paget M.S. Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: structure, function and distribution. *Biomolecules*. 2015; 5(3): 1245–65. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>
23. Shen G., Li X. The multifaceted role of hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) in lipid metabolism, hypoxia and human diseases. <https://doi.org/10.5772/65340> Available at: <https://www.intechopen.com/books/hypoxia-and-human-diseases/the-multifaceted-role-of-hypoxia-inducible-factor-1-hif1-in-lipid-metabolism>
24. Del Portillo P., García-Morales L., Menéndez M.C., Anzola J.M., Rodríguez J.G., Helguera-Repetto A.C., et al. Hypoxia is not a main stress when *Mycobacterium tuberculosis* is in a dormancy-like long-chain fatty acid environment. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2019; 8: 449. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00449>
25. Mocali S., Chiellini C., Fabiani A., Decuzzi S., de Pascale D., Parrilli E., et al. Ecology of cold environments: new insights of bacterial metabolic adaptation through an integrated genomic-phenomic approach. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 839. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00876-4>
26. Hassan N., Anesio A.M., Rafiq M., Holtvoeth J., Bull I., Halceem A., et al. Temperature driven membrane lipid adaptation in glacial psychrophilic bacteria. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00824>
27. Battesti A., Bouveret E. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* 2006; 62(4): 1048–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05442.x>
28. Cronan J.E., Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods Enzymol.* 2009; 459: 395–33. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04617-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04617-5)
29. Jöers A., Vind K., Hernández S.B., Maruste R., Pereira M., Brauer A., et al. Muropeptides stimulate growth resumption from stationary phase in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 18043. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54646-5>
30. Burkert A., Douglas T.A., Waldrop M.P., Mackelprang R. Changes in the active, dead, and dormant microbial community structure across a Pleistocene permafrost chronosequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(7): e02646-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02646-18>

Информация об авторах

Андрюков Борис Георгиевич[✉] — д.м.н., в.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>. E-mail: andrukov_bg@mail.ru

Сомова Лариса Михайловна — д.м.н., г.н.с. лаб. клеточной биологии и гистопатологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия.

Information about the authors

Boris G. Andryukov[✉] — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>. E-mail: andrukov_bg@mail.ru

Larisa M. Somova — D. Sci. (Med.), main researcher, Laboratory of cell biology and histopathology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2023-1503>.
E-mail: l_somova@mail.ru

Ляпун Ирина Николаевна — к.б.н., н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>.
E-mail: irina-lyapun@list.ru

Бынина Марина Павловна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>.
E-mail: marina.bynina@mail.ru

Матосова Екатерина Владимировна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>.
E-mail: e_matosova@mail.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2023-1503>.
E-mail: l_somova@mail.ru

Irina N. Lyapun — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>.
E-mail: irina-lyapun@list.ru

Marina P. Bynina — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>.
E-mail: marina.bynina@mail.ru

Ekaterina V. Matosova — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>.
E-mail: e_matosova@mail.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Чувствительность биопленок *Bordetella pertussis* к поливалентной коклюшной сыворотке

Зайцев Е.М.[✉], Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г.

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия

Цель работы — изучение чувствительности биопленок *Bordetella pertussis* к поливалентной коклюшной сыворотке (ПКС).

Материалы и методы. Интенсивность образования биопленок штаммами *B. pertussis* в круглодонных полистироловых 96-луночных планшетах в присутствии ПКС оценивали окрашиванием 0,1% раствором генциан-фиолетового. За титр ПКС принимали наибольшее ее разведение, подавляющее рост биопленочных культур.

Результаты. Титры ПКС, полностью подавлявшие формирование биопленок исследованными штаммами, варьировали от 1 : 1000 до 1 : 20 000. Вакцинный штамм № 475а (серовар 1.2.3) отличался наиболее высокой чувствительностью к ПКС, титр которой составлял 1 : 20 000. Вакцинный штамм № 305 (серовар 1.2.0) и штаммы, выделенные от больных коклюшем в 2001–2010 гг.: № 287 (серовар 1.0.3), № 178 (серовар 1.2.0), № 317 (серовар 1.2.3), были чувствительны к ПКС в титрах 1 : 1000–1 : 2000. Вакцинный штамм № 703 (серовар 1.0.3) был устойчив ко всем исследованным разведениям сыворотки. При посеве супернатантов из лунок с биопленками на плотную питательную среду отмечен рост типичных для *B. pertussis* колоний. Аналогичные результаты получены при посеве супернатантов культур из лунок с отсутствием биопленок.

Закключение. Приведенные данные свидетельствуют о гетерогенности штаммов *B. pertussis* по чувствительности к ПКС. Рост типичных для *B. pertussis* колоний при посеве надосадочной жидкости культур на плотную питательную среду, при отсутствии биопленок в планшетах, свидетельствует о подавлении биопленкообразования ингибированием адгезии микробных клеток на субстрате, а не за счет бактерицидного действия сыворотки.

Ключевые слова: штаммы *B. pertussis*; биопленки; поливалентная коклюшная сыворотка.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Чувствительность биопленок *Bordetella pertussis* к поливалентной коклюшной сыворотке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5): 413–417.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-3>

Поступила 06.02.2020
Принята в печать 08.07.2020

Sensitivity of *Bordetella pertussis* biofilms to polyvalent pertussis serum

Eugene M. Zaytsev[✉], Marina V. Britsina, Maria N. Ozeretskovskaya, Natalia U. Mertsalova, Irina G. Bazhanova

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

Aim. Study of the sensitivity of *Bordetella pertussis* biofilms to polyvalent pertussis serum.

Materials and methods. The intensity of biofilm formation by strains of *B. pertussis* in round-bottomed polystyrene 96-well plates in the presence of polyvalent pertussis serum was estimated by staining with 0.1% gentian-violet solution. The serum titer was estimated as a highest dilution, which suppressed the growth of biofilm cultures.

Results. Serum titers that completely suppressed the formation of biofilms by the studied strains ranged from 1 : 1,000 to 1 : 20,000. Vaccine strain No. 475а (serotype 1.2.3) was characterized by the highest sensitivity to serum, the titer of which was 1 : 20,000. Vaccine strain No. 305 (serotype 1.2.0) and strains isolated from whooping cough patients in the period from 2001 to 2010: No. 287 (serotype 1.0.3), No. 178 (serotype 1.2.0), No. 317 (serotype 1.2.3) were sensitive to serum in the titers 1 : 1,000–1 : 2,000. Vaccine strain No. 703 (serotype

1.0.3) was resistant to all serum dilutions studied. When sowing supernatants from wells with biofilms on a dense nutrient medium, the growth of colonies typical for *B. pertussis* was observed. Similar results were obtained when seeding the supernatants of the cultures from the wells with no biofilm.

Conclusion. These data indicate that *B. pertussis* strains are heterogeneous in sensitivity to pertussis serum. The growth of colonies typical for *B. pertussis* when culture supernatants are sown on a dense nutrient medium, in the absence of biofilms in the wells, indicates that the biofilm formation is suppressed by inhibiting the adhesion of microbial cells on the substrate, and not due to the bactericidal action of the serum.

Keywords: *B. pertussis* strains; biofilms; polyvalent pertussis serum.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Sensitivity of *Bordetella pertussis* biofilms to polyvalent pertussis serum. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 413–417. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-3>

Received 6 February 2020

Accepted 8 July 2020

Введение

Коклюш остается актуальной проблемой здравоохранения во всем мире, в том числе в странах с высоким уровнем вакцинации. Наблюдаются активизация эпидемического процесса коклюша во всех возрастных группах населения, скрытая циркуляция *Bordetella pertussis*, рост заболеваемости и смертельных исходов [1, 2]. Одной из вероятных причин продолжающегося эпидемического процесса коклюшной инфекции могут быть биопленочные формы *B. pertussis* [3].

Большинство бактерий существуют в природе в виде биопленочных форм. Биопленки отличаются от планктонных (суспендированных) культур измененным спектром экспрессии генов и обладают повышенной устойчивостью к условиям внешней среды, антибиотикам, иммунным факторам [4, 5]. В связи с этим проблема подавления формирования и роста биопленочных форм бактерий продолжает оставаться актуальной для здравоохранения.

Формирование биопленок рассматривается как один из способов преодоления воздействия иммунной системы. Важное значение имеет понимание того, как иммунный ответ влияет на рост биопленок и особенности проявления вирулентности возбудителя. Все основные звенья иммунитета (врожденный и адаптивный, клеточный и гуморальный) имеют эффекторные механизмы, направленные на элиминацию биопленок. Возможны различные механизмы иммунного подавления образования и деструкции биопленок. Антитела к поверхностным адгезинам, фимбриям, участвующим в фиксации биопленок на субстрате, могут ингибировать образование биопленок. Антитела в присутствии компонента могут стимулировать опсонинзависимую активацию фагоцитоза, приводящую к деструкции биопленок. Важное значение для создания высокоэффективных антибиопленочных вакцин имеет выявление структур с антигенными свойствами, присутствующих в биопленках, но отсутствующих

у планктонных форм. Перспективным является изучение возможности использования антител для профилактики образования и деструкции биопленок [6–8].

Механизмы формирования биопленок разными штаммами *B. pertussis*, их чувствительность к иммунным факторам пока изучены недостаточно, по данной проблеме имеются лишь единичные публикации [3].

Цель работы заключалась в изучении чувствительности биопленок штаммов *B. pertussis* к поливалентной коклюшной сыворотке (ПКС).

Материалы и методы

В опытах использовали «вакцинные» штаммы *B. pertussis*, выделенные от больных коклюшем в 1950–1960-е гг., применяющиеся в России для изготовления корпускулярных коклюшных вакцин: штамм № 475а (серовар 1.2.3), селекционированный из штамма № 475, штамм № 305 (серовар 1.2.0), штамм № 703 (серовар 1.0.3), а также выделенные в России от больных коклюшем в 2001–2010 гг. штамм № 178 (серовар 1.2.0), штаммы № 287 (серовар 1.0.3) и № 317 (серовар 1.2.3). В опытах использовали ПКС для реакции агглютинации, полученную из сыворотки крови ослов или кроликов, гипериммунизированных инактивированными, а затем живыми коклюшными микробами (филиал «Медгамал» ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи). Титр ПКС в реакции агглютинации составлял 1 : 16 000, консервант — мертиолят 1 : 10 000. Контроль морфологических, серологических и культуральных свойств штаммов проводили в соответствии с методическими указаниями [9].

В качестве инокулята для получения биопленок использовали ночные культуры штаммов, выращенные на плотной питательной среде («Бордетеллагар», ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). Суспензию бактерий культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах («Nunc») в жидкой синтетической

питательной среде [10]. Культуры штаммов в жидкой синтетической питательной среде в концентрации 5,0 МОЕ в объеме 0,1 мл вносили в лунки планшетов. После этого в лунки добавляли по 0,1 мл ПКС в разведениях 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 20 000 и 1 : 40 000. Планшеты накрывали крышкой и ставили в термостат при 37°C в горизонтальном положении на ровную поверхность на 24 ч. После культивирования бактерий из лунок планшета с разведениями ПКС 1 : 1000 и 1 : 40 000 осторожно отбирали среду с планктонными клетками в объеме 0,1 мл и высевали на кассеты с плотной питательной средой («Бордетелагар»), которые инкубировали в термостате при 37°C в течение 2 сут.

Интенсивность образования биопленок в планшетах после окрашивания 0,1% раствором генциан-фиолетового оценивали по отношению оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя биопленки к негативному контролю (ОП питательной среды = 0,045 ± 0,003) как плотные (ОП > 0,192), умеренные (0,096 < ОП ≤ 0,192), слабые/отсутствие биопленок (ОП ≤ 0,096). Результаты оценивали по значениям титра ПКС, который определяли как наибольшее ее разведение, подавляющее рост биопленочных культур. Для достоверности результатов использовали 4 лунки на один опытный образец и рассчитывали среднюю величину ОП опытного образца и удвоенную ошибку. Сравнения проводили по критерию *t* Стьюдента [11].

Результаты

Результаты исследования чувствительности вакцинных и свежeweыделенных штаммов *B. pertussis*

к ПКС приведены в **таблице**. Для оценки влияния ПКС на рост биопленок определяли ее титр. Контрольные культуры исследованных штаммов, не содержавшие ПКС, различались по интенсивности образования биопленок. Штаммы № 475а и 703 формировали умеренные биопленки, а штаммы № 305, 317, 178 и 287 — плотные биопленки.

Вакцинный штамм № 475а отличался высокой чувствительностью к ПКС, титр которой составлял 1 : 20 000. Только в разведении сыворотки 1 : 40 000 микробные клетки этого штамма формировали умеренные биопленки. Титр ПКС с вакцинным штаммом № 305 составлял 1 : 1000. В присутствии остальных разведений ПКС формировались плотные биопленки. Вакцинный штамм № 703 проявлял устойчивость к действию ПКС и формировал умеренные биопленки при всех исследованных разведениях. Титр ПКС, полностью подавлявшей рост биопленок свежeweыделенных штаммов № 317 и 178, составлял 1 : 1000 с ростом умеренных и плотных биопленок при больших разведениях сыворотки. Титр ПКС со свежeweыделенным штаммом № 287 составлял 1 : 2000 с ростом умеренных и плотных биопленок при разведении ПКС 1 : 20 000 и 1 : 40 000 соответственно. При посеве надосадочной жидкости биопленочных культур всех исследованных штаммов в присутствии ПКС на плотную питательную среду отмечен сплошной рост типичных для *B. pertussis* колоний. Аналогичные результаты получены при посеве надосадочной жидкости культур всех штаммов из лунок с отсутствием биопленок. На плотной питательной среде росли мелкие колонии размером 0,5–1,0 мм, выпуклые,

Влияние ПКС на рост биопленок штаммов *B. pertussis*

Effect of polyvalent pertussis serum on the growth of biofilms of *B. pertussis* strains

Разведение сыворотки Serum dilutions	Значения ОП и интенсивность роста биопленок штаммов <i>B. pertussis</i> Optical density values and growth rate of biofilms of <i>B. pertussis</i> strains					
	вакцинные штаммы vaccine strains			свежeweыделенные штаммы freshly isolated strains		
	475а (1.2.3)	305 (1.2.0)	703 (1.0.3)	317 (1.2.3)	178 (1.2.0)	287 (1.0.3)
1 : 1000	0,068 ± 0,008 Нет No	0,089 ± 0,013 Нет No	0,119 ± 0,025 Умеренная Medium	0,067 ± 0,003 Нет No	0,093 ± 0,020 Нет No	0,061 ± 0,011 Нет No
1 : 2000	0,074 ± 0,004 Нет No	0,230 ± 0,009 Плотная Dense	0,101 ± 0,011 Умеренная Medium	0,104 ± 0,006 Умеренная Medium	0,107 ± 0,008 Умеренная Medium	0,077 ± 0,009 Нет No
1 : 20 000	0,096 ± 0,008 Нет No	0,196 ± 0,013 Плотная Dense	0,165 ± 0,049 Умеренная Medium	0,156 ± 0,008 Умеренная Medium	0,178 ± 0,013 Умеренная Medium	0,155 ± 0,009 Умеренная Medium
1 : 40 000	0,126 ± 0,008 Умеренная Medium	0,276 ± 0,019 Плотная Dense	0,188 ± 0,023 Умеренная Medium	0,204 ± 0,014 Плотная Dense	0,219 ± 0,007 Плотная Dense	0,227 ± 0,013 Плотная Dense
Контроль биопленки Control of biofilm	0,134 ± 0,011 Умеренная Medium	0,269 ± 0,002 Плотная Dense	0,192 ± 0,050 Умеренная Medium	0,218 ± 0,006 Плотная Dense	0,246 ± 0,019 Плотная Dense	0,201 ± 0,019 Плотная Dense

круглые, сероватого цвета, блестящие. Проверка морфологических свойств колоний показала, что это неподвижные, грамотрицательные, овоидной формы мелкие палочки, в мазках располагавшиеся отдельно или парами.

Обсуждение

Биопленки *B. pertussis* имеют важное значение для поддержания эпидемического процесса коклюшной инфекции. В связи с этим актуальным является исследование механизмов формирования биопленок и поиск факторов, влияющих на этот процесс. Механизмы антибиопленочного иммунитета при коклюше практически не изучены и могут быть связаны с эффекторными механизмами клеточного и гуморального иммунитета.

Результаты опытов выявили определенные различия между биопленками исследованных штаммов по чувствительности к ПКС. По отношению к 5 из 6 штаммов выявлена отчетливая зависимость интенсивности роста биопленок от разведения ПКС. Титры ПКС, полностью подавлявшие формирование биопленок исследованными штаммами, варьировали от 1 : 1000 до 1 : 20 000. Наиболее высокой чувствительностью к ПКС отличался вакцинный штамм № 475а. Вакцинный штамм № 305 и свежeweделенные штаммы были чувствительны к ПКС в титрах 1 : 1000–1 : 2000. Вакцинный штамм № 703 обладал устойчивостью ко всем исследованным разведениям ПКС. Полученные результаты указывают на гетерогенность исследованных нами вакцинных и свежeweделенных штаммов *B. pertussis* по чувствительности к ПКС.

Результаты высева супернатантов культур штаммов на плотную питательную среду позволяют сделать определенные выводы о механизме подавления биопленкообразования ПКС. Наличие роста типичных для *B. pertussis* колоний на плотной питательной среде при отсутствии роста биопленок в планшетах указывает на отсутствие бактерицидного действия ПКС и свидетельствует о подавлении биопленкообразования за счет ингибирования адгезии микробных клеток на субстрате. Используемая нами ПКС является суммарной фракцией антител к антигенам коклюшного микроба, среди которых можно предположить наличие антител к другим структурным компонентам помимо агглютиногенов, в том числе факторам, принимающим участие в адгезии микробных клеток на субстрате (пертактин, филаментозный гемагглютинин и др.). Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов о подавлении поликлональными антителами к филаментозному гемагглютинину образования биопленок штаммами *B. pertussis* [12]. Различия между интенсивностью образования биопленок могут быть обусловлены различным соотношением между уровнем экспрес-

сии этих факторов и уровнем антител к ним в составе ПКС.

Полученные нами результаты указывают на целесообразность дальнейшего изучения чувствительности биопленок *B. pertussis* в отношении антител к адгезинам и другим вирулентным факторам коклюшного микроба. Изучение факторов гуморального противококлюшного иммунитета, подавляющих образование биопленок или разрушающих зрелые биопленки, имеет важное научное и практическое значение. Выяснение механизмов антибиопленочного иммунитета будет способствовать расширению наших представлений о патогенезе коклюшной инфекции и причинах продолжающейся циркуляции возбудителя коклюша в условиях широкого охвата населения прививками, а также открывает перспективы для обоснования терапевтического воздействия на биопленки антителами к определенным структурным компонентам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Субботина К.А., Фельдблюм И.В., Кочергина Е.А., Лехтина Н.А. Эпидемиологическое обоснование к изменению стратегии и тактики специфической профилактики коклюша в современных условиях. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 18(2): 27–33. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-27-33>
2. Di Mattia G., Nicolai A., Frassanito A., Petrarca L., Nenna R., Midulla F. Pertussis: New preventive strategies for an old disease. *Paediatr. Respir. Rev.* 2019; 29: 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2018.03.011>
3. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. Bordetella biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): fiv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
4. Бехало В.А., Бондаренко В.М., Сысолятина Е.В., Нагурская Е.В. Иммунологические особенности бактериальных клеток медицинских биопленок. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010; (4): 97–105.
5. Del Pozo J.L. Biofilm-related disease. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2018; 16(1): 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>
6. Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012; 67(12): 22–9.
7. Chung P.Y., Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2017; 50(4): 405–10. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
8. Pletzer D., Coleman S.R., Hancock R.E Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016; 33: 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>
9. МУК 4.2.2317-08. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий. М.; 2009.
10. Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г. Культивирование биопленок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; (1): 49–53. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-49-53>
11. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Ленинград; 1962.
12. Serra D.O., Conover M.S., Arnal L., Sloan G.P., Rodriguez M.E., Yantorno O.M., et al. FHA-mediated cell-substrate and

cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28811.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028811>

REFERENCES

1. Subbotina K.A., Fel'dblyum I.V., Kochergina E.A., Lekhtina N.A. Epidemiological rationale for changing the strategy and tactics of vaccination of pertussis in current conditions. *Epidemiologiya i vaksinooprofilaktika*. 2019; 18(2): 27–33. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-27-33> (in Russian)
2. Di Mattia G., Nicolai A., Frassanito A., Petrarca L., Nenna R., Midulla F. Pertussis: New preventive strategies for an old disease. *Paediatr. Respir. Rev.* 2019; 29: 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2018.03.011>
3. Cattelan N., Dubey P., Arnal L., Yantorno O.M., Deora R. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016; 74(1): ftv108. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv108>
4. Bekhalo V.A., Bondarenko V.M., Sysolyatina E.V., Nagurskaya E.V. Immunological features of bacterial cells of medical biofilms. *Zhurnal mikrobiologii i immunobiologii*. 2010; (4): 97–105. (in Russian)
5. Del Pozo J.L. Biofilm-related disease. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2018; 16(1): 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>

Информация об авторах

Зайцев Евгений Михайлович[✉] — д.м.н., зав. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4813-9074>.
E-mail: pertussis@yandex.ru

Брицина Марина Васильевна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-0790>.
E-mail: britsinamarina@yandex.ru

Озерецковская Мария Николаевна — к.м.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9809-4217>.
E-mail: manja33@yandex.ru

Мерцалова Наталья Устиновна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9072-2538>.
E-mail: n.mertzalova@yandex.ru

Бажанова Ирина Глебовна — к.б.н., в.н.с. лаб. иммуномодуляторов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1404-1498>.
E-mail: ibajanowa@yandex.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

6. Chebotar' I.V. Mechanisms of antibiofilm immunity. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2012; 67(12): 22–9. (in Russian)
7. Chung P.Y., Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2017; 50(4): 405–10. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
8. Pletzer D., Coleman S.R., Hancock R.E. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016; 33: 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>
9. МЯК 4.2.2317-08 Selection, validation and storage of industrial strains of pertussis, paracoccus and bronchiseptica bacteria. Moscow; 2009. (in Russian)
10. Zaytsev E.M., Britsina M.V., Ozeretskovskaya M.N., Mertsalova N.U., Bazhanova I.G. Cultivation of *Bordetella pertussis* biofilms on abiotic substrate. *Zhurnal mikrobiologii i immunobiologii*. 2019; (1): 49–53. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-49-53> (in Russian)
11. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad; 1962. (in Russian)
12. Serra D.O., Conover M.S., Arnal L., Sloan G.P., Rodriguez M.E., Yantorno O.M., et al. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028811>

Information about the authors

Eugene M. Zaytsev[✉] — Doct. Sci. (Med.), Head, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4813-9074>.
E-mail: pertussis@yandex.ru

Marina V. Britsina — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-0790>.
E-mail: britsinamarina@yandex.ru

Maria N. Ozeretskovskaya — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9809-4217>.
E-mail: manja33@yandex.ru

Natalia U. Mertsalova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9072-2538>.
E-mail: n.mertzalova@yandex.ru

Irina G. Bazhanova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of immunomodulators, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1404-1498>.
E-mail: ibajanowa@yandex.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Колонизационная активность клинических изолятов дрожжевых грибов рода *Candida* и их антибиотикочувствительность

Ахапкина И.Г.^{1✉}, Глушакова А.М.^{1,2}, Родионова Е.Н.¹, Качалкин А.В.^{2,3}

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

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Россия;

³ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина» РАН, 142290, Пущино, Россия

Введение. Развитие микозов связывают с иммунокомпрометацией макроорганизма. Задачей исследования было изучение колонизационной активности и резистентности дрожжевых грибов рода *Candida*, выделенных из клинического материала в 2014 и 2019 гг. в Москве.

Материалы и методы. Диско-диффузным методом определяли антибиотикочувствительность 75 штаммов дрожжевых грибов следующих видов: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C. intermedia*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae* (*Clavispora lusitanae*), *C. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*). В 2014 г. выделены 34 штамма у людей с гиперчувствительностью в анамнезе (27 — с кожных покровов, 7 — со слизистой ротовой полости), в 2019 г. выделили 41 штамм со слизистой влагалища людей с онкологическими заболеваниями. Использовали диски с флуконазолом (40 мкг), нистатином (80 мкг), клотримазолом (10 мкг), итраконазолом (10 мкг), амфотерицином В (40 мкг).

Результаты. В 2014 г. колонизационная активность убывала в ряду: *C. albicans* (23,53%), *C. tropicalis* (20,59%), *C. guilliermondii* (20,59%), *C. parapsilosis* (17,65%), *C. glabrata* (17,65%); в 2019 г. — *C. parapsilosis* (21,95%), *C. albicans* (17,07%), *C. tropicalis* (12,19%), *C. guilliermondii* (12,19%), *C. krusei* (9,76%), *C. glabrata* (9,76%), *C. lusitanae* (9,76%), *C. intermedia* (7,32%). Выделенные в 2014 г. грибы обладали чувствительностью ко всем антимикотикам, за исключением 16,67% штаммов *C. glabrata* (флуконазол) и 14,28% штаммов *C. tropicalis* (нистатин). Выделенные в 2019 г. 11,11% *C. parapsilosis* и 40% *C. tropicalis* были резистентны ко всем антимикотикам; 71,43% *C. albicans*, 50% *C. glabrata*, 20% *C. guilliermondii* — к флуконазолу; 28,57% *C. albicans* — к нистатину, клотримазолу, итраконазолу, амфотерицину В; 25% *C. glabrata* — к амфотерицину В; *C. krusei* — к клотримазолу (100%), флуконазолу и нистатину (50%), итраконазолу и амфотерицину В (25%); *C. lusitanae* — к флуконазолу и нистатину (100%), клотримазолу и амфотерицину В (75%), итраконазолу (50%).

Заключение. В течение 5 лет в Московском регионе расширился спектр выявляемых видов грибов за счет *C. krusei*, *C. lusitanae* и *C. intermedia* (26,86% кандидозов в 2019 г.). При этом дрожжевые грибы, выделенные в 2019 г., отличаются высоким количеством резистентных штаммов по сравнению с грибами, выделенными в 2014 г.

Ключевые слова: дрожжевые грибы; *Candida*; кандидоз; резистентность; оппортунистические инфекции.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Ахапкина И.Г., Глушакова А.М., Родионова Е.Н., Качалкин А.В. Колонизационная активность клинических изолятов дрожжевых грибов рода *Candida* и их антибиотикочувствительность. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5): 418–423. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-4>

Поступила 22.10.2019

Принята в печать 06.04.2020

Colonization activity of *Candida* clinical isolates and their antibiotic sensitivity

Irina G. Akhapkina^{1✉}, Anna M. Glushakova^{1,2}, Evgeniya N. Rodionova¹, Aleksey V. Kachalkin^{2,3}

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

²M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia;

³G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, 142290, Pushchino, Russia

Background. The development of fungal infections is associated with immunocompromising of a macroorganism.
Aim. To study the colonization activity and resistance of *Candida* yeast strains isolated from clinical specimens in 2014 and 2019 in Moscow.

Materials and methods. Antibiotic sensitivity of 75 strains of the following yeast species was determined by disc-diffuse method: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C. intermedia*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*), *C. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*). In 2014, 34 strains were isolated in people with hypersensitivity history (27 — from the skin, 7 — from the oral mucosa). In 2019, 41 strains were isolated from the vaginal mucosa in people with cancer. Discs with fluconazole (40 µg), nystatin (80 µg), clotrimazole (10 µg), itraconazole (10 µg), amphotericin B (40 µg) were used.

Results. Among strains isolated in 2014, colonization activity was detected, in descending order, in *C. albicans* (23.53%), *C. tropicalis* (20.59%), *C. guilliermondii* (20.59%); *C. parapsilosis* (17.65%), *C. glabrata* (17.65%); in 2019 — *C. parapsilosis* (21.95%), *C. albicans* (17.07%), *C. tropicalis* (12.19%), *C. guilliermondii* (12.19%), *C. krusei* (9.76%), *C. glabrata* (9.76%), *C. lusitaniae* (9.76%), *C. intermedia* (7.32%). The yeasts isolated in 2014 were resistant to all antimicrobics except 16.67% strains of *C. glabrata* (fluconazole) and 14.28% strains of *C. tropicalis* (nystatin). 11.11% *C. parapsilosis* and 40% *C. tropicalis* isolated in 2019 were sensitive to all antimicrobics; 71.43% *C. albicans*, 50% *C. glabrata*, 20% *C. guilliermondii* were resistant to fluconazole; 28.57% *C. albicans* were resistant to nystatin, clotrimazole, itraconazole, amphotericin B; 25% *C. glabrata* resistant to amphotericin B; *C. krusei* — were resistant to clotrimazole (100%), fluconazole and nystatin (50%), itraconazole и amphotericin B (25%); *C. lusitaniae* resistant to fluconazole and nystatin (100%), clotrimazole and amphotericin B (75%), itraconazole (50%).

Conclusion. The range of detected species has expanded over five years in the Moscow region due to *C. krusei*, *C. lusitaniae* and *C. intermedia* (26.86% of candidiasis in 2019). Moreover, yeast fungi isolated in 2019 have a high number of resistant strains, compared to fungi isolated in 2014.

Keywords: yeasts; *Candida*; candidiasis; resistance; opportunistic infections.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Akhapkina I.G., Glushakova A.M., Rodionova E.N., Kachalkin A.V. Colonization activity of *Candida* clinical isolates and their antibiotic sensitivity. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 418–423. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-4>

Received 22 October 2019
Accepted 6 April 2020

Введение

Системные кандидозы стали общемировой проблемой, обусловленной высокой смертностью, скоростью распространения инфекции, курсированием резистентных штаммов, особенно в условиях стационара. Полагают, что это связано с развитием медицинских технологий и увеличением количества иммунокомпрометированных людей [1–3]. Современные исследования направлены на изучение механизмов, лежащих в основе изменения вирулентности и адгезивных свойств микроорганизмов, демонстрации ими резистентности или промежуточной чувствительности в случаях применения рекомендованных концентраций антимикотиков [4–9]. Значительное место в исследованиях занимают вопросы видовой разнообразия и частоты встречаемости разных видов дрожжевых грибов в клинической практике в различных регионах мира, условий, влияющих на устойчивость грибов к антифунгальным препаратам [1, 2, 10, 11].

Задачей исследования было изучение колонизационной активности и резистентности разных видов дрожжевых грибов рода *Candida*, выделенных в 2014 и 2019 гг. в Москве из клинического материала группы иммунокомпрометированных людей.

Материалы и методы

В работе использовали 75 штаммов дрожжевых грибов следующих видов: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C. intermedia*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*), *C. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*). В 2014 г. в Москве выделены 34 штамма (27 штаммов с кожных покровов, 7 — со слизистой ротовой полости) у людей с аллергическими заболеваниями в анамнезе (пациенты аллергологического центра НИИВС им. И.И. Мечникова). Затем штаммы были размещены в рабочей коллекции культур дрожжей кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова. В 2019 г. в ФГБУ «НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» выделили 41 штамм со слизистой влагиалища пациенток.

Антибиотикочувствительность грибов определяли диско-диффузным методом при помощи расширенного набора дисков с противогрибными препаратами согласно прилагаемой инструкции (НИЦФ, Россия; НИИЭМ им. Пастера, Россия). Использовали агаризованную глюкозо-пептонную среду лабораторного приготовления (агар — 20 г/л, пептон — 5 г/л, дрожжевой экстракт — 2,5 г/л, глюкоза — 10 г/л). Готовили разведение каждого штамма, соответствующего по плотности 0,5 по

стандарту МакФарланда и содержащего примерно $1,4 \times 10^8$ КОЕ/мл. Разведения в объеме 1 мл наносили на поверхность плотной среды в чашках Петри и тщательно растирали шпателем до тех пор, пока поверхность не становилась полностью сухой. Через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды помещали диски с антибиотиками (амфотерицин В — 40 мкг, нистатин — 80 мкг, клотримазол — 10 мкг, флуконазол — 40 мкг, итраконазол — 10 мкг). Чашки со всеми исследуемыми штаммами параллельно инкубировали при 25°C и 37°C в течение 72 и 24 ч соответственно. Учет результатов проводили в отраженном свете при помощи штангенциркуля. Диаметр зон подавления роста измеряли с точностью до 1 мм. Все штаммы исследовали для каждого антибиотика в 3 повторностях.

Результаты

Виды дрожжевых грибов, выделенные в 2014 г., по колонизационной активности можно разделить на 3 группы:

- *C. albicans* (23,53%);
- *C. tropicalis* (20,59%), *C. guilliermondii* (20,59%);
- *C. parapsilosis* (17,65%), *C. glabrata* (17,65%).

Виды дрожжевых грибов, выделенные в 2019 г., по частоте выявления можно распределить на 5 групп:

- *C. parapsilosis* (21,95%);
- *C. albicans* (17,07%);
- *C. tropicalis* (12,19%), *C. guilliermondii* (12,19%);
- *C. krusei* (9,76%), *C. glabrata* (9,76%), *C. lusitaniae* (9,76%);
- *C. intermedia* (7,32%).

В **таблице** представлены данные по относительному количеству штаммов дрожжевых грибов, продемонстрировавших резистентность и промежуточную чувствительность *in vitro* к антимикотикам.

Обсуждение

В исследовании, проведенном с 1992 по 2001 г., сообщалось, что частота выявления *C. albicans* в качестве доминирующего этиологического агента кандидозов составляла 55,92% [12]. С течением времени во многих странах в качестве инфекционных агентов кандидозов стали выявлять другие виды, которые постепенно заняли ведущее положение, как, например, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* [13]. В исследовании, проведенном в Москве в 2013–2015 гг. в группе больных туберкулезом, были выявлены следующие основные виды: *C. albicans* (26,9%), *C. glabrata* (22,07%), *C. krusei* (16,55%), *C. tropicalis* (11,72%), *C. parapsilosis* (6,9%); 15,86% штаммов принадлежали к следующим видам — *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyi*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides* (от 1 до 4 штаммов) [14]. Интересен

но, что в нашем исследовании в этот период времени ведущим этиологическим агентом был также *C. albicans*, но, например, *C. guilliermondii* занимал второе место по частоте выявления. Однако количество обнаруженных видов грибов было значительно меньше. В нашем случае в течение 5 лет расширился спектр выявляемых видов за счет *C. krusei*, *C. lusitaniae* и *C. intermedia*. В Московском регионе в 2019 г. этими видами были обусловлены 26,86% кандидозов. В первую группу видов грибов по колонизационной активности переместился *C. parapsilosis*, а *C. albicans* занял место во второй группе. Однако разница в частоте выявления между этими видами в разные периоды времени невелика — 5,88% в 2014 г. и 4,88% в 2019 г. Виды *C. tropicalis* и *C. guilliermondii* в 2019 г. выявлялись значительно реже, практически в 2 раза относительно показателей 2014 г. Очевидно, это связано с появлением в клиническом материале дополнительных трех видов дрожжевых грибов (*C. krusei*, *C. lusitaniae* и *C. intermedia*). Но результатом исследования, требующим особого внимания, является разница в чувствительности к антимикотикам дрожжевых грибов, выделенных в 2014 и в 2019 гг. Грибы, выделенные в 2014 г., демонстрировали чувствительность *in vitro* ко всем антифунгальным препаратам. Исключением стали небольшая часть штаммов *C. glabrata* и *C. tropicalis*, резистентные к флуконазолу и нистатину соответственно (см. **таблицу**). Также часть штаммов этих видов продемонстрировала промежуточную чувствительность к итраконазолу. В 2019 г., несмотря на меньшую частоту встречаемости в клиническом материале *C. albicans*, порядка трети штаммов этого вида оказались резистентными *in vitro* к 4 антимикотикам, а к флуконазолу — 71,43% штаммов. Виды кандид, ранее (в 2014 г.) не выявлявшиеся в клинической практике в качестве инвазивных агентов, но выделенные в 2019 г., отличаются высокой степенью распространения резистентных штаммов, за исключением *C. intermedia* (см. **таблицу**). Некоторые исследователи отмечают, что одной из причин демонстрации резистентности дрожжевыми грибами, например к флуконазолу, является проведение профилактической антифунгальной терапии [2]. Стоит заметить, что устойчивость к азольным антифунгальным препаратам отмечалась у *C. glabrata* и *C. krusei* ранее [2, 12]. В 2005 г. в Московском регионе было показано, что порядка 10% штаммов грибов рода *Candida*, выделенных из клинического материала, демонстрировали резистентность к флуконазолу и итраконазолу [15]. В связи с этим разрабатываются новые антимикотические средства, имеющие другие мишени воздействия, например пептидные или иммунологические препараты [3, 16].

Таким образом, в настоящее время наиболее высокой степенью колонизационной активности в

Относительное количество штаммов дрожжевых грибов, продемонстрировавших резистентность и промежуточную чувствительность *in vitro* к антимикотикам

Relative number of yeast strains demonstrating resistance and intermediate sensitivity *in vitro* to antimycotics

Вид грибов Yeast species	Год выделения Year of isolation	Чувствительность Sensitivity	Относительное количество штаммов, % Relative number of strains, %					
			флуконазол fluconazole	нистатин nystatin	клотримазол clotrimazole	итраконазол itraconazole	амфотерицин В amphotericin B	
<i>C. albicans</i>	2014	+	0	0	0	0	0	
		±	0	0	0	0	0	
	2019	+	71,43	28,57	28,57	28,57	28,57	
		±	28,57	0	0	28,57	0	
	<i>C. parapsilosis</i>	2014	+	0	0	0	0	0
			±	100	0	0	0	0
2019		+	11,11	11,11	11,11	11,11	11,11	
		±	55,56	0	0	0	0	
<i>C. glabrata</i>		2014	+	16,67	0	0	0	0
			±	0	0	0	16,67	0
	2019	+	50	0	0	0	25	
		±	50	0	0	50	0	
	<i>C. tropicalis</i>	2014	+	0	14,28	0	0	0
			±	0	0	0	14,28	0
2019		+	40	40	40	40	40	
		±	60	0	0	20	0	
<i>C. guilliermondii</i>		2014	+	0	0	0	0	0
			±	42,86	0	0	0	0
	2019	+	20	0	0	0	0	
		±	80	0	0	20	0	
	<i>C. krusei</i>	2019	+	50	50	100	25	25
			±	25	0	0	25	0
<i>C. lusitaniae</i>	2019	+	100	100	75	50	75	
		±	0	0	0	50	0	
<i>C. intermedia</i>	2019	+	0	0	0	0	0	
		±	0	0	0	0	0	

Примечание. «+» — резистентность; «±» — промежуточная чувствительность (фунгистатическое действие антимикотика).

Note. «+» — resistance; «±» — intermediate sensitivity (fungistatic effect of antimycotic).

отношении человеческого организма отличаются *C. parapsilosis* и *C. albicans*. При этом происходит значительное изменение видового разнообразия, сопровождающееся выявлением в клиническом материале *C. krusei*, *C. lusitaniae* и *C. intermedia*, причем первые два вида отличаются высоким процентом резистентных штаммов. Среди доминирующих видов дрожжевых грибов также отмечено появление антибиотикоустойчивых штаммов.

ЛИТЕРАТУРА

- Kremery V., Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J. Hosp. Infect.* 2002; 50(4): 243–60. <https://doi.org/10.1053/jhin.2001.1151>
- Aquino V.R., Lunardi L.W., Goldani L.Z., Barth A.L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 2005; 9(5): 411–8. <https://doi.org/10.1590/s1413-86702005000500009>

3. Di Mambro T., Guerriero I., Aurisicchio L., Magnani M., Marra E. The yin and yang of current antifungal therapeutic strategies: how can we harness our natural defenses? *Front. Pharmacol.* 2019; 10: 80. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00080>
4. Леонов В.В., Миронов А.Ю., Леонова Л.В., Никитина Л.Ю. Этиологическая структура и биологические свойства возбудителей инфекций кровотока. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(11): 790–3. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-11-790-793>
5. Gale C., Finkel D., Tao N., Meinke M., McClellan M., Olson J., et al. Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93(1): 357–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.357>
6. Jensen R.H. Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. *Dan. Med. J.* 2016; 63(10): B5288.
7. Yao D., Chen J., Chen W., Li Z., Hu X. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* from two hospitals in China. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 771–81. <https://doi.org/10.2147/IDR.S202058>
8. Arastehfar A., Daneshnia F., Zomorodian K., Najafzadeh M.J., Khodavaisy S., Zarrinfar H., et al. Low level of antifungal resistance in iranian isolates of *Candida glabrata* recovered from blood samples in a Multicenter Study from 2015 to 2018 and potential prognostic values of genotyping and sequencing of PDR1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63(7): e02503-18. <https://doi.org/10.1128/aac.02503-18>
9. Jacobsen I.D., Wilson D., Wächter B., Brunke S., Naglik J.R., Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 2012; 10(1): 85–93. <https://doi.org/10.1586/eri.11.152>
10. Muñoz P., Sánchez-Somolinos M., Alcalá L., et al. *Candida krusei fungaemia*: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 55(2): 188–93. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh532>
11. Tan T.Y., Tan A.L., Tee N.W., Ng L.S. A retrospective analysis of antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates from Singapore hospitals. *Ann. Acad. Med. Singap.* 2008; 37(10): 835–40.
12. Pfaller M.A., Diekema D.J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10(Suppl. 1): 11–23. <https://doi.org/10.1111/j.1470-9465.2004.t01-1-00844.x>
13. Karabiçak N., Alem N. Antifungal susceptibility profiles of *Candida* species to triazole: application of new CLSI species-specific clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of antifungal resistance. *Mikrobiyol. Bul.* 2016; 50(1): 122–32. (in Turkish)
14. Кулько А.Б. Активность *in vitro* анидулафунгина в отношении дрожжевых грибов – возбудителей системных и диссеминированных микозов. *Онкогематология.* 2015; 10(3): 51–55. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2015-10-3-53-57>
15. Кулько А.Б., Митрохин С.Д., Мороз А.М. Микотическая инфекция дыхательных путей во фтизиатрической практике: видовой состав и чувствительность клинических штаммов грибов рода *Candida* к антифунгальным препаратам. *Антибиотики и химиотерапия.* 2005; 50(4): 14–7.
16. Li R., Zhang L., Zhang H., Yi Y., Wang L., Chen L., et al. Protective effect of a novel antifungal peptide derived from human chromogranin a on the immunity of mice infected with *Candida krusei*. *Exp. Ther. Med.* 2017; 13(5): 2429–34. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4290>

REFERENCES

1. Krcmery V., Barnes A.J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J. Hosp. Infect.* 2002; 50(4): 243–60. <https://doi.org/10.1053/jhin.2001.1151>
2. Aquino V.R., Lunardi L.W., Goldani L.Z., Barth A.L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 2005; 9(5): 411–8. <https://doi.org/10.1590/s1413-86702005000500009>
3. Di Mambro T., Guerriero I., Aurisicchio L., Magnani M., Marra E. The yin and yang of current antifungal therapeutic strategies: how can we harness our natural defenses? *Front. Pharmacol.* 2019; 10: 80. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00080>
4. Leonov V.V., Mironov A.Yu., Leonova L.V., Nikitina L.Yu. The etiologic structure and biologic characteristics of agents of infections of bloodstream. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 61(11): 790–3. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-11-790-793> (in Russian)
5. Gale C., Finkel D., Tao N., Meinke M., McClellan M., Olson J., et al. Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93(1): 357–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.357>
6. Jensen R.H. Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. *Dan. Med. J.* 2016; 63(10): B5288.
7. Yao D., Chen J., Chen W., Li Z., Hu X. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* from two hospitals in China. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 771–81. <https://doi.org/10.2147/IDR.S202058>
8. Arastehfar A., Daneshnia F., Zomorodian K., Najafzadeh M.J., Khodavaisy S., Zarrinfar H., et al. Low level of antifungal resistance in iranian isolates of *Candida glabrata* recovered from blood samples in a Multicenter Study from 2015 to 2018 and potential prognostic values of genotyping and sequencing of PDR1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63(7): e02503-18. <https://doi.org/10.1128/aac.02503-18>
9. Jacobsen I.D., Wilson D., Wächter B., Brunke S., Naglik J.R., Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 2012; 10(1): 85–93. <https://doi.org/10.1586/eri.11.152>
10. Muñoz P., Sánchez-Somolinos M., Alcalá L., et al. *Candida krusei fungaemia*: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 55(2): 188–93. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh532>
11. Tan T.Y., Tan A.L., Tee N.W., Ng L.S. A retrospective analysis of antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates from Singapore hospitals. *Ann. Acad. Med. Singap.* 2008; 37(10): 835–40.
12. Pfaller M.A., Diekema D.J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10(Suppl. 1): 11–23. <https://doi.org/10.1111/j.1470-9465.2004.t01-1-00844.x>
13. Karabiçak N., Alem N. Antifungal susceptibility profiles of *Candida* species to triazole: application of new CLSI species-specific clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of antifungal resistance. *Mikrobiyol. Bul.* 2016; 50(1): 122–32. (in Turkish)
14. Kul'ko A.B. *In vitro* anidulafungin activity against yeasts — system and disseminated mycosis pathogens. *Onkogematologiya.* 2015; 10(3): 51–55. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2015-10-3-53-57> (in Russian)

15. Kul'ko A.B., Mitrokhin S.D., Moroz A.M. Mycotic respiratory tract infection in phthisiatric practice: species composition and sensitivity of clinical strains of *Candida* fungi to antifungal drugs. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2005; 50(4): 14–7. (in Russian)

Информация об авторах

Ахапкина Ирина Гавериловна[✉] — к.б.н., в.н.с. ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5825-2302>.
E-mail: isun17@yandex.ru

Глушак Анна Марковна — к.б.н., н.с. ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия; м.н.с. каф. биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4116-4445>.
E-mail: annglushakova@yandex.ru

Родионова Евгения Николаевна — лаборант ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-2025-2630>.

Качалкин Алексей Владимирович — к.б.н., в.н.с. каф. биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Россия; Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, 142290, Пушкино, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4494-2468>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

16. Li R., Zhang L., Zhang H., Yi Y., Wang L., Chen L., et al. Protective effect of a novel antifungal peptide derived from human chromogranin a on the immunity of mice infected with *Candida krusei*. *Exp. Ther. Med.* 2017; 13(5): 2429–34.
<https://doi.org/10.3892/etm.2017.4290>

Information about the authors

Irina G. Akhapkina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5825-2302>.
E-mail: isun17@yandex.ru

Anna M. Glushakova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia; junior researcher, Department of soil biology, Faculty of soil science, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4116-4445>.
E-mail: annglushakova@yandex.ru

Evgeniya N. Rodionova — laboratory assistant, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-2025-2630>.

Aleksey V. Kachalkin — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of soil biology, Faculty of soil science, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia; All-Russian collection of microorganisms, Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G.K. Skryabin RAS, 142290, Pushchino, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4494-2468>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Изучение *in vitro* влияния ДНК пробиотического штамма *Bifidobacterium bifidum* на количественный уровень и колонизационные свойства кишечных микросимбионтов

Захарова Ю.В.[✉], Сухих А.С., Леванова Л.А., Плотникова Е.Ю.

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», 650056, Кемерово, Россия

Цель — оценка *in vitro* влияния ДНК, выделенной из пробиотического штамма *Bifidobacterium bifidum* 791, на количественный уровень и адгезивные свойства фекальных изолятов бифидобактерий и условно-патогенных микроорганизмов разных видов.

Материалы и методы. ДНК выделяли из пробиотического штамма *B. bifidum* 791. Биомассу бифидобактерий отмывали от питательной среды. Взвесь бактерий в буферном растворе трижды подвергали ультразвуковой обработке с частотой 40 кГц в течение 30 мин с последующим центрифугированием. Супернатанты объединяли и очищали хроматографически на Сефарозе CL-4В. В качестве тест-культур использовали *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli lac*–, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, изолированные из кишечника взрослых относительно здоровых людей.

Результаты. Раствор нуклеиновой кислоты концентрацией 3,54 мкг/мл не влиял на количественный уровень бифидобактерий ($p = 0,61$). Содержание ДНК в растворе 14,15–21,23 мкг/мл способствовало увеличению титров *B. bifidum* и *B. breve* на 2 lg КОЕ/мл по сравнению с контролем ($p = 0,01$), но не влияло на титры *S. aureus*, *E. coli lac*–, *E. faecalis*, *C. albicans* ($p = 0,73$). Раствор ДНК повышал аутоагрегацию бифидобактерий в 1,5–2,0 раза. Способность к аутоагрегации под влиянием бифидобактериальной ДНК у *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* не изменялась, у *E. coli lac*– увеличивалась в 2,3 раза ($p = 0,05$).

Заключение. Раствор ДНК пробиотического штамма *B. bifidum* 791 концентрацией 14,15–21,23 мкг/мл стимулирует размножение и аутоагрегацию *B. breve*, *B. bifidum* фекального происхождения.

Ключевые слова: ДНК; бифидобактерии; количественный уровень; аутоагрегация.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Захарова Ю.В., Сухих А.С., Леванова Л.А., Плотникова Е.Ю. Изучение *in vitro* влияния ДНК пробиотического штамма *Bifidobacterium bifidum* на количественный уровень и колонизационные свойства кишечных микросимбионтов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5): 424–430.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-5>

Поступила 21.03.2020

Принята в печать 01.08.2020

In vitro study of the effect of *Bifidobacterium bifidum* probiotic strain DNA on the cell concentration and colonization properties of intestinal microsymbionts

Yulia V. Zakharova[✉], Andrey S. Sukhikh, Lyudmila A. Levanova, Ekaterina Yu. Plotnikova

Kemerovo State Medical University, 650056, Kemerovo, Russia

Aim. To estimate *in vitro* the effect of DNA isolated from the probiotic strain *Bifidobacterium bifidum* 791 on the cell concentration and adhesive properties of fecal isolates of bifidobacteria and opportunistic microorganisms of different species.

Materials and methods. DNA was isolated from the probiotic strain *Bifidobacterium bifidum* 791. Biomass containing bifidobacteria was washed from the nutrient medium. The suspension of bacteria in the buffer solution was subjected to ultrasonic disintegration with a frequency of 40 kHz three times for 30 minutes, followed by centrifugation. The supernatants were combined and purified chromatographically on CL-4B Sepharose. *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli lac*–, *Enterococcus faecalis*, and *Candida albicans* were used as test cultures, isolated from the intestines of conditionally healthy adults.

Results. The nucleic acid solution with a concentration of 3.54 µg/ml did not affect the cell number of bifidobacteria ($p = 0.61$). The DNA content in the solution of 14.15–21.23 µg/ml increased the titers of *B. bifidum* and *B. breve* by 2 lg CFU/ml compared to the control ($p = 0.01$), but did not affect the titers of *S. aureus*, *E. coli lac*–, *E. faecalis*, *C. albicans* ($p = 0.73$). The DNA solution stimulated the self-aggregation of bifidobacteria in 1.5–2.0 times. The ability to autoaggregate under the influence of bifidobacterial DNA in *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* did not change, in *E. coli lac*– increased 2.3 times ($p = 0.05$).

Conclusion. A DNA solution of the probiotic strain *B. bifidum* 791 with a content 14.15–21.23 µg/ml stimulates the reproduction and autoaggregation of fecal *B. breve*, *B. bifidum*.

Keywords: DNA; bifidobacteria; cell concentration; self-aggregation.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Zakharova Yu.V., Sukhikh A.S., Levanova L.A., Plotnikova E.Yu. *In vitro* study of the effect of *Bifidobacterium bifidum* probiotic strain DNA on the cell concentration and colonization properties of intestinal microsymbionts. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 424–430. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-5>

Received 21 March 2020

Accepted 1 August 2020

Введение

В настоящее время продолжается активное изучение кишечного микробиома. Это связано с многосторонним влиянием микробиоты на гомеостаз макроорганизма, которое осуществляется за счет ее участия во всех видах обмена веществ [1], нейрофизиологических процессах [2], поддержании иммунологической реактивности, реализации генетической программы человека [3]. Известно, что с качественными и количественными изменениями кишечной микробиоты связаны многие патологические состояния: метаболический синдром [4], колоректальный рак [5], атеросклероз [6]. Это не только предопределяет необходимость лечения основного заболевания, но и требует коррекции кишечного микробного сообщества. Основной задачей при коррекции является восстановление количественного уровня индигенных микросимбионтов — бифидобактерий и лактобацилл. Для этого назначают пробиотические препараты [7]. Однако нередко коррекция с помощью пробиотиков является неэффективной или дает непродолжительный эффект. Пробиотические микроорганизмы, особенно те, которые не заключены в кишечнорастворимую капсулу, при прохождении через разные отделы желудочно-кишечного тракта гибнут, поэтому толстого кишечника достигает лишь небольшая часть их популяции. Нередко штаммы пробиотических микроорганизмов испытывают антагонизм со стороны нормобиоты человека и гибнут в межвидовой борьбе либо транзитом проходят через толстокишечный биотоп вследствие лиганд-рецепторной несовместимости [8]. В связи с этим для нормализации микробиологического равновесия приоритетом является стимуляция роста и размножения собственной микробиоты.

Факторами, стимулирующими активность бифидобактерий, являются углеводы [9], ненасыщен-

ные жирные кислоты, антиоксиданты, аминокислоты [10]. Однако большинство средств, оказывающих пребиотическое и метабиотическое действие, не обладают селективностью, что затрудняет коррекцию микробиологических нарушений. Кроме того, некоторые препараты имеют противопоказания. В связи с этим востребованными являются средства, способные стимулировать размножение и колонизационные свойства только у бифидобактерий, но не у факультативной микробиоты.

В естественных условиях микроорганизмы формируют биопленки, которые представляют собой высокоорганизованное структурированное микробное сообщество, характеризующееся высокой устойчивостью к неблагоприятным воздействиям [11, 12]. В составе биопленок обнаруживают внеклеточные нуклеиновые кислоты [13], которые играют огромную роль в функционировании многовидовых бактериальных консорциумов. Данные биополимеры наряду с экзополисахаридами формируют межбактериальный матрикс [14]. При экзогенном воздействии и разрушении внеклеточных ДНК структура биопленки нарушается, что приводит к увеличению чувствительности бактерий к окружающим неблагоприятным факторам [12]. Кроме того, биополимеры выполняют роль аутоиндукторов, позволяющих бактериям контролировать численность популяции. Изучение структуры и механизмов функционирования биопленок патогенных и условно-патогенных микроорганизмов позволило разработать методы и способы борьбы с биопленочными инфекциями [15, 16]. Так, ферментативное разрушение внеклеточных нуклеиновых кислот используется для повышения чувствительности патогенных бактерий к антибиотикам [17].

Индигенная микробиота кишечника также заключена в полисахаридный матрикс. От стабильности пристеночной бактериальной биопленки

зависит здоровье человека, поэтому возникает необходимость изучения особенностей жизнедеятельности и способов управления популяцией бифидобактерий, основанных на естественных механизмах функционирования биопленочных микробных сообществ.

Цель исследования — оценка *in vitro* влияния ДНК, выделенной из пробиотического штамма *Bifidobacterium bifidum* 791, на количественный уровень и адгезивные свойства фекальных изолятов бифидобактерий и условно-патогенных микроорганизмов разных видов.

Материалы и методы

ДНК извлекали из штамма *B. bifidum* 791, полученного из Государственной коллекции нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Использование штамма данного вида было связано с преобладанием среди бифидобактерий у детей с эубиозом *B. bifidum* и высокой частотой его встречаемости у взрослых людей [1].

Предварительно выращивали культуру *B. bifidum* 791 в течение 48 ч на жидкой Бифидум-среде (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск) при температуре культивирования 37°C. Содержание бифидобактерий в биомассе составило 10⁸ КОЕ/мл. Бульонную культуру помещали в стерильные центрифужные пробирки и отмывали трижды фосфатным буфером (3 мМ хлорида калия, 8 мМ гидрофосфата натрия, 140 мМ хлорида натрия, 2 мМ дигидрофосфата натрия pH 7,2) от питательной среды. На каждом этапе отмывки культуры от питательной среды проводили центрифугирование при 3–4 тыс. об/мин.

Для ресуспендирования клеточной массы использовали буферную систему в объеме 2 мл на 1 г бактериальной массы. Взвесь бактерий в буферном растворе трехкратно обрабатывали ультразвуком в дезинтеграторе «ТИ-Н20 MF3» («Elma») с частотой 40 кГц на протяжении 30 мин. Порционная дезинтеграция микробных клеток была направлена на разрушение их клеточных стенок с максимальной возможностью сохранения целостности внутриклеточных структур. Далее при 5 тыс. об/мин проводили центрифугирование.

Полученные супернатанты очищали от разрушившихся бактериальных компонентов хроматографически на Сефарозе CL-4В. Элюирование ДНК проводили физиологическим раствором.

Наличие двуцепочечной ДНК определяли при электрофорезе аликвоты образца объемом 10 мкл в 3% агарозном геле с применением бромистого этидия в качестве красителя. Электрофорез осуществляли при напряжении электрического поля 200 В в течение 15 мин.

С полученной ДНК снимали инфракрасные спектры на спектрофотометре «СФ-2000». Согласно методике [18] измеряли поглощение пробы при

$\lambda = 260$ и $\lambda = 280$, что позволило определить чистоту образца и концентрацию ДНК.

Для определения характера воздействия выделенной ДНК в качестве тест-культур использовали *B. bifidum* ($n = 10$), *B. infantis* ($n = 12$), *B. breve* ($n = 15$), изолированные из кишечника взрослых относительно здоровых людей. Влияние раствора ДНК на размножение условно-патогенных кишечных микросимбионтов оценивали на кишечных изолятах *Escherichia coli lac-* ($n = 8$), *Staphylococcus aureus* ($n = 10$), *Candida albicans* ($n = 10$), *Enterococcus faecalis* ($n = 8$). Идентификацию всех микроорганизмов проводили на основании комплекса морфологических, культуральных и биохимических свойств. Биохимическую идентификацию вели с использованием коммерческих тест-систем «ENTERO-TEST» («Lachema»), «ANAERO-TEST 23» («Lachema»), «AUXOCOLOR» («BioRad»). Оценивали влияние раствора ДНК на специфическую адгезию, аутоагрегацию бифидобактерий и условно-патогенных микросимбионтов. Показатели специфической адгезии изучали на модели эритроцитов человека 0(I) группы Rh+ [19]. Определяли индекс адгезии микроорганизмов (ИАМ). Низкоадгезивными считали микроорганизмы при ИАМ = 1,76–2,5; среднеадгезивными — при ИАМ = 2,51–4,0; высокоадгезивными — при ИАМ > 4,0. Аутоагрегацию бактерий (А) исследовали по методу [20]. Культуры относили к низкоагрегативным штаммам при А < 10%, к среднеагрегативным — при А = 10–40% и к высокоагрегативным — при А > 40%.

Изучали *in vitro* влияние выделенного фактора на бифидофлору и условно-патогенные микросимбионты. Бифидобактерии предварительно выращивали на плотной Бифидум-среде (все среды — производства ФБУН ГНЦ ПМБ) в анаэробных условиях с использованием газогенерирующих пакетов («Новое дело») и анаэрометров («BBL»). Факультативные бактерии выращивали на мясо-пептонном агаре, грибы — на среде № 2 Сабуро.

Брали 4 стерильные пробирки и разливали следующие ингредиенты:

- в первую пробирку помещали 9,5 мл жидкой Бифидум-среды и 0,5 мл раствора ДНК;
- во вторую пробирку — 8 мл среды и 2 мл раствора нуклеиновой кислоты;
- в третью пробирку — 7 мл среды и 3 мл раствора ДНК. Конечная концентрация ДНК в каждой пробирке в расчете на 1 мл составила 3,54, 14,15 и 21,23 мкг соответственно;
- в четвертую пробирку — жидкую Бифидум-среду в объеме 10 мл (контроль).

Во все пробирки вносили по одной колонии тест-культур (*B. infantis*, *B. bifidum*, *B. breve*) и культивировали 1 сут при 37°C. Содержимое пробирок титровали от 10⁻¹ до 10⁻⁹ КОЕ/г, затем проводили высеив на плотную питательную среду. Чашки ин-

кубировали в анаэробных условиях в течение 2 сут при 37°C, после этого в высевах из наибольших разведений подсчитывали колонии, результат выражали в КОЕ/мл.

Влияние раствора ДНК на факультативных представителей кишечного микробиоценоза изучали аналогичным образом на мясо-пептонном бульоне и жидкой среде Сабуро. После сокультивирования раствора ДНК и условно-патогенных микроорганизмов проводили высеив на плотные питательные среды. Лактозонегативные *E. coli* культивировали на среде Эндо, энтерококки — на энтерококкагаре, стафилококки — на желточно-солевом агаре, грибы *C. albicans* — на агаризированной среде № 2 Сабуро.

Для обработки полученных данных использовали программный комплекс «PS IMAGO» («IBM SPSS Statistics»). Описательная статистика представлена средними значениями количественных показателей в виде медианы и значений 25-го и 75-го квартилей. Характер распределения данных оценивали с помощью визуального метода, путем построения гистограмм. В связи с тем, что данные были распределены асимметрично, достоверность различий оценивали, используя критерий *U* Манна–Уитни и критерий χ^2 . Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Выделенная ДНК по спектрофотометрическим характеристикам соответствовала ДНК высокой степени очистки, т.к. соотношение ОП₂₆₀/ОП₂₈₀ образца составило 1,88 [18]. В полученном растворе содержалось 70,75 мкг/мл двуцепочечной ДНК.

Установлено, что раствор ДНК с концентрацией 3,54 мкг/мл не обладал способностью стимулировать размножение бифидобактерий, т.к. коли-

чественное содержание тест-культур не отличалось от контрольной пробирки (таблица) ($p = 0,61$). Раствор с содержанием ДНК 14,15–21,23 мкг/мл стимулировал размножение *B. bifidum* и *B. breve*, т.к. их титры были на 2 lg КОЕ/мл выше, чем в контроле ($p = 0,01$). Однако он не влиял на размножение *B. infantis*, потому что количество бифидобактерий в опытных пробирках не отличалось от их содержания в контрольной пробе ($p = 0,64$).

При оценке влияния раствора ДНК на количественный уровень условно-патогенной микробиоты установлено отсутствие его стимулирующего влияния на *E. coli lac-*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis*. После соинкубирования факультативной микробиоты с ДНК *B. bifidum* 791 содержание вышеуказанных условно-патогенных бактерий не отличалось от контроля ($p = 0,73$).

Количественный уровень является важным, но не единственным фактором для формирования биопленок и поддержания стабильности микробного сообщества. Поддержание гомеостаза макроорганизма возможно только при контактном взаимодействии микросимбионтов и слизистой кишечника. Установлено, что выделенная ДНК не влияла на показатели специфической адгезии бифидобактерий. Среднее значение ИАМ бифидобактерий до культивирования с раствором ДНК для штаммов *B. bifidum* составило 2,71 (2,53; 3,43), для *B. infantis* — 3,2 (2,7; 3,54), для *B. breve* — 3,4 (2,9; 3,8), после культивирования бифидобактерий с раствором ДНК — 2,87 (2,67; 3,1), 3,3 (2,8; 3,5) и 3,1 (2,8; 3,3) соответственно ($p = 0,8$). При этом аутоагрегация фекальных штаммов *B. bifidum* увеличилась с 34,41 до 54,3% ($p = 0,04$), *B. infantis* — с 24,3 до 48,1% ($p = 0,01$), *B. breve* — с 28,4 до 45,6% ($p = 0,05$).

Количественное содержание *Bifidobacterium* spp. и условно-патогенных бактерий при культивировании *in vitro* с ДНК пробиотического штамма, lg КОЕ/мл, Me (LQ; UQ)

Quantitative content of *Bifidobacterium* spp. and opportunistic bacteria cultivated *in vitro* with DNA of probiotic strain, lg CFU/ml, Me (LQ; UQ))

Тест-культура Test culture	n	Контроль (без раствора ДНК) Control (without DNA solution)	Конечная концентрация ДНК в растворе, мкг/мл Final DNA concentration in solution, µg/ml		
			3,54	14,15	21,23
<i>B. bifidum</i>	10	8,0 (7; 9)	8,0 (8; 10)	9,5 (8; 10)	10,0 (8; 11)*
<i>B. infantis</i>	12	8,5 (8; 9)	8,0 (7; 9)	8,0 (7; 9)	8,5 (7; 10)
<i>B. breve</i>	15	8,0 (7; 10)	8,0 (7; 9)	10,0 (8; 10)*	10,0 (8; 10)
<i>E. coli lac-</i>	8	7,0 (5; 8)	7,0 (6; 8)	7,0 (5; 8)	7,0 (5; 8)
<i>S. aureus</i>	10	6,0 (5; 7)	5,5 (4; 6)	6,0 (5; 7)	5,5 (5; 6)
<i>C. albicans</i>	10	3,0 (2; 4)	3,5 (2; 4)	3,5 (2; 4)	3,0 (2; 4)
<i>E. faecalis</i>	8	6,0 (4; 8)	5,0 (4; 7)	6,0 (5; 8)	6,0 (5; 7)

Примечание. * Статистически значимые различия между опытом и контролем при достигнутом уровне значимости $p = 0,01$.
Note. * Statistically significant differences between experiment and control at the achieved significance level $p = 0.01$.

Раствор ДНК *B. bifidum* 791 не оказывал влияния на адгезивные свойства условно-патогенных микроорганизмов. Так, показатели адгезии до и после обработки раствором ДНК у *E. coli lac*– составили 2,8 (2,7; 3,8) и 3,08 (2,7; 3,8) ($p = 0,8$), у *S. aureus* — 3,54 (2,72; 3,9) и 3,95 (2,9; 4,0) ($p = 0,6$), у *E. faecalis* — 3,1 (2,6; 3,3) и 3,48 (2,8; 3,5) ($p = 0,8$), у *C. albicans* — 2,1 (1,5; 2,2) и 3,08 (1,7; 3,2) ($p = 0,6$). При этом установлено увеличение показателей аутоагрегации у *E. coli lac*– с 10,9 до 25,3% ($p = 0,05$).

Обсуждение

Микробиота кишечника представляет собой многокомпонентное сообщество, которое функционирует в виде биологических пленок [11, 15]. Формирование биопленок рассматривают как механизм, позволяющий успешно выживать популяциям в изменяющейся и неблагоприятной окружающей среде. Наиболее значимыми являются коммуникативные взаимодействия между микроорганизмами [21], которые представляют собой целую систему, обеспечивающую популяционный ответ на любой экзогенный раздражитель. В качестве сигналов, модулирующих поведение всей популяции микроорганизмов, используются бактериальные метаболиты [21], а также продукты микробного распада, например нуклеиновые кислоты [13, 21]. Однако известно также, что бактерии еще при жизни способны выделять ДНК в межклеточный матрикс биопленок [13, 18]. Основное ее отличие от ДНК, попавшей в матрикс из погибших клеток, — это одинаковый размер фрагментов, равный 21 000 кД. Такую ДНК рассматривают как продукт метаболизма бактерий.

В опытах *in vitro* показано, что выделенная из бульонной культуры *B. bifidum* 791 ДНК обладает бифидогенным эффектом. Стимуляция размножения бифидобактерий, вероятно, обусловлена несколькими механизмами. Основной механизм — аутоиндукторная роль ДНК бифидобактерий с последующей активацией генов, ответственных за размножение [13, 14]. Еще один механизм — стимуляция факторов колонизации за счет использования микробным сообществом внеклеточной ДНК как дополнительного источника нутриентов: фосфатов, связанного азота и углерода. Установлено, что в присутствии раствора ДНК увеличивается аутоагрегация как бифидобактерий, так и некоторых условно-патогенных микросимбионтов, потому что ДНК представляет собой «липкую» молекулу, способную связываться как с гидрофильными, так и с гидрофобными поверхностями бактериальных клеток [13]. Аутоагрегативные свойства микроорганизмов способствуют формированию микроколоний, что повышает возможность выживания бактерий при воздействии неблагоприятных условий. Увели-

чение аутоагрегации индигенной микробиоты ведет к увеличению антагонизма бифидобактерий к условно-патогенным микроорганизмам, т.к. высокоагрегативные бифидобактерии способны выводить из кишечника транзиторные бактерии, блокируя их взаимодействие с рецепторами слизистой оболочки [11]. Однако рост аутоагрегации *E. coli lac*– в присутствии раствора ДНК является нежелательным эффектом, поэтому данный компонент целесообразно использовать после селективной деконтаминации кишечника.

Заключение

Раствор ДНК пробиотического штамма *B. bifidum* 791 является бактериальным продуктом, который *in vitro* способен регулировать количественный уровень и аутоагрегативные свойства фекальных изолятов *B. bifidum*, *B. breve*, что свидетельствует о перспективности использования данного компонента в качестве средства для коррекции кишечного микробиоценоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бовбель И.Э. Современные представления о микробиоте кишечника и возможности эффективного применения пробиотиков в практике врача-педиатра. *Медицинские новости*. 2017; (2): 25–31.
2. Аверина О.В., Даниленко В.Н. Микробиота кишечника человека: роль в становлении и функционировании нервной системы. *Микробиология*. 2017; 86(1): 5–24. <https://doi.org/10.7868/S0026365617010050>
3. Шендеров Б.А., Голубев В.Л., Данилов А.Б. Роль питания и симбиотической микробиоты в эпигенетике нейродегенеративных заболеваний. *Лечение заболеваний нервной системы*. 2015; (1): 3–14.
4. Щербакова М.Ю., Власова А.В., Роживанова Т.А. Роль микробиоты кишечника в развитии ожирения в возрастном аспекте. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015; (2): 11–6.
5. Meng C., Bai C., Brown T.D., Hood L.E., Tian Q. Human gut microbiota and gastrointestinal cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2018; 16(1): 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2017.06.002>
6. Конев Ю.В., Лазебник Л.Б. Роль эндотоксина кишечной микробиоты в патогенезе атеросклероза. *Терапия*. 2015; 2(2): 19–27.
7. Yahfoufi N., Mallet J.F., Graham E., Matar C. Role of probiotics and prebiotics in immunomodulation. *Curr. Opin. Food Sci*. 2018; 20: 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.04.006>
8. Глушанова Н.А., Шендеров Б.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2005; (2): 56–61.
9. Moniz P., Ho A.L., Duarte L.C., Kolida S., Rastall R.A., Pereira H., et al. Assessment of bifidogenic effect of substituted xylo-oligosaccharides obtained from corn straw. *Carbohydr. Polym*. 2016; 136: 466–73. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.046>
10. Хорошилова И.А., Гранитов В.М. Применение про- и пребиотиков в лечении инфекционных поражений кишечника. *Медицинское обозрение. Наука и практика*. 2015; (3): 26–31.
11. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В., Орлова О.Г. Бактериальные биопленки условно-патогенных бактерий и их

- подавление пробиотическими лактобациллами. *Лечение и профилактика*. 2014; (2): 28–35.
- Петрова Н.В. Биопленки: этапы формирования, свойства и клинические последствия. *Клиническая патофизиология*. 2015; (3): 9–16.
 - Jakubovics N., Burgess J.G. Extracellular DNA in oral microbial biofilms. *Microbes Infect.* 2015; 17(7): 531–7. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.03.015>
 - Тец Г.В., Артеменко Н.К., Заславская Н.В., Тец В.В. Состояние бактериальных биопленок при длительном культивировании. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013; 155(4): 460–3.
 - Тюляндина Е.В., Годовалов А.П. Изучение действия лейкоцитов, активированных индуктором интерферона, на биопленки *Staphylococcus aureus*. *Авиценна*. 2016; 1(9): 21–2.
 - Данилова Т.А., Данилина Г.А., Аджиева А.А., Минко А.Г., Николаева Т.Н., Жуховицкий В.Г. и др. Влияние Мирамистина и Фоспренила на микробные биопленки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 163(4): 435–9.
 - Рахматулина М.Р., Нечаева И.А. Биопленки микроорганизмов и их роль в формировании резистентности к антибактериальным препаратам. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2015; (2): 58–62.
 - Holmes D.S., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 1981; 114(1): 193–7. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90473-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90473-5)
 - Брилис В.И., Брилине Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. *Лабораторное дело*. 1986; 4: 210–2.
 - Del Re B., Sgorbati B., Miglioli M., Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000; 31(6): 438–42. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845>
 - Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микробное распознавание «своей-чужой» в условиях кишечного микросимбиоза человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; (6): 46–51.
 - Konev Yu.V., Lazebnik L.B. Role of endotoxin of intestinal microbiota in the pathogenesis of atherosclerosis. *Terapiya*. 2015; 2(2): 19–27. (in Russian)
 - Yahfoufi N., Mallet J.F., Graham E., Matar C. Role of probiotics and prebiotics in immunomodulation. *Curr. Opin. Food Sci.* 2018; 20: 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.04.006>
 - Glushanova N.A., Shenderov B.A. Relationships between the probiotic and host indigenous lactobacilli under the conditions of mixed cultivation *in vitro*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2005; (2): 56–61. (in Russian)
 - Moniz P., Ho A.L., Duarte L.C., Kolida S., Rastall R.A., Pereira H., et al. Assessment of bifidogenic effect of substituted xylooligosaccharides obtained from corn straw. *Carbohydr. Polym.* 2016; 136: 466–73. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.046>
 - Khoroshilova I.A., Granitov V.M. The use of pro- and prebiotics in the treatment of infectious intestinal lesions. *Meditsinskoe obozrenie. Nauka i praktika*. 2015; (3): 26–31. (in Russian)
 - Bondarenko V.M., Rybal'chenko O.V., Orlova O.G. The bacterial biofilms of opportunistic bacteria and their suppression of probiotic lactobacilli. *Lechenie i profilaktika*. 2014; (2): 28–35. (in Russian)
 - Petrova N.V. Biofilms: stages of formation, properties and clinical consequences. *Klinicheskaya patofiziologiya*. 2015; (3): 9–16. (in Russian)
 - Jakubovics N., Burgess J.G. Extracellular DNA in oral microbial biofilms. *Microbes Infect.* 2015; 17(7): 531–7. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.03.015>
 - Tets G.V., Artemenko N.K., Zaslavskaya N.V., Tets V.V. Characteristics of bacterial biofilms during long-term culturing. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2013; 155(4): 460–3. (in Russian)
 - Tyulyandina E.V., Godovalov A.P. Study of the effect of white blood cells activated by an interferon inducer on biofilms *Staphylococcus aureus*. *Avitsenna*. 2016; 1(9): 21–2. (in Russian)
 - Danilova T.A., Danilina G.A., Adzhieva A.A., Minko A.G., Nikolaeva T.N., Zhukhovitskiy V.G., et al. Effects of miramistin and phosprenil on microbial biofilms. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2017; 163(4): 435–9. (in Russian)
 - Rakhmatulina M.R., Nechaeva I.A. Biofilms of microorganisms and their role for the formation of resistance to anti-bacterial drugs. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2015; (2): 58–62. (in Russian)
 - Holmes D.S., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 1981; 114(1): 193–7. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90473-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90473-5)
 - Brilis V.I., Briline T.A., Lentsner Kh.P., Lentsner A.A. The methodology of studying the adhesion process of microorganisms. *Laboratornoe delo*. 1986; 4: 210–2. (in Russian)
 - Del Re B., Sgorbati B., Miglioli M., Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000; 31(6): 438–42. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845>
 - Bukharin O.V., Perunova N.B. Microbial «friend-foe» identification in human intestine microsimbiocenosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011; (6): 46–51. (in Russian)

REFERENCES

- Bovbel' I.E. Intestinal microbiota and use of probiotics in pediatric practice. *Meditsinskie novosti*. 2017; (2): 25–31. (in Russian)
- Averina O.V., Danilenko V.N. Human intestinal microbiota: role in development and functioning of the nervous system. *Mikrobiologiya*. 2017; 86(1): 5–24. <https://doi.org/10.7868/S0026365617010050> (in Russian)
- Shenderov B.A., Golubev V.L., Danilov A.B. The role of nutrition and symbiotic microbiota in epigenetics of neurodegenerative disorders. *Lechenie zabolovaniy nervnoy sistemy*. 2015; (1): 3–14. (in Russian)
- Shcherbakova M.Yu., Vlasova A.V., Rozhivanova T.A. The role of the intestine microbiota in the development of obesity. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2015; (2): 11–6. (in Russian)
- Meng C., Bai C., Brown T.D., Hood L.E., Tian Q. Human gut microbiota and gastrointestinal cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2018; 16(1): 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2017.06.002>

Информация об авторах

Захарова Юлия Викторовна[✉] — к.м.н., доц., доц. каф. микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», 650056, Кемерово, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3475-9125>.
E-mail: yvz@bk.ru

Сухих Андрей Сергеевич — к.фарм.н., доц., с.н.с. Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО

Information about the authors

Yulia V. Zakharova[✉] — Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Chair of microbiology, immunology and virology, Kemerovo State Medical University, 650056, Kemerovo, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3475-9125>.
E-mail: yvz@bk.ru

Andrey S. Sukhikh — Cand. Sci. (Pharm.), Assoc. Prof., senior researcher, Central research laboratory, Kemerovo State Medical University, 650056, Kemerovo, Russia.

«Кемеровский государственный медицинский университет»,
650056, Кемерово, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9300-5334>.
E-mail: suhih_as@list.ru

Леванова Людмила Александровна — д.м.н., доц., зав. каф.
микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО
«Кемеровский государственный медицинский университет»,
650056, Кемерово, Россия
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5977-9149>
E-mail: micro@kemsma.ru

Плотникова Екатерина Юрьевна — д.м.н., проф., проф.
каф. поликлинической терапии, последипломной подготовки и
сестринского дела ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный
медицинский университет», 650056, Кемерово, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6150-1808>.
E-mail: eka-pl@rambler.ru

Участие авторов: Захарова Ю.В. — выполнение бактериологических исследований, написание статьи; Сухих А.С. — разработка методики и выделение ДНК бифидобактерий; Леванова Л.А. — дизайн и организация исследований; Плотникова Е.Ю. — статистическая обработка материала, написание статьи.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9300-5334>.
E-mail: suhih_as@list.ru

Lydmila A. Levanova — D. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Head, Chair
of microbiology, immunology and virology, Kemerovo State Medical
University, 650056, Kemerovo, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5977-9149>
E-mail: micro@kemsma.ru

Ekaterina Yu. Plotnikova — D. Sci. (Med.), Prof., Professor of the
Department of outpatient therapy, postgraduate training and nursing,
Kemerovo State Medical University, 650056, Kemerovo, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6150-1808>.
E-mail: eka-pl@rambler.ru

Contribution: Zakharova Yu.V. — performing bacteriological research, writing an article; Sukhikh A.S. — development of methods and isolation of bifidobacteria DNA; Levanova L.A. — design and organization of research; Plotnikova E.Yu. — statistical processing of the material, writing the article.

ОБЗОРЫ

© Коллектив авторов, 2020



SARS, снова SARS и MERS. Обзор животных моделей респираторных синдромов человека, вызываемых коронавирусными инфекциями

Нагорных А.М.[✉], Тюменцев А.И., Тюменцева М.А., Акимкин В.Г.

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора,
111123, Москва, Россия

Крупные вспышки респираторных синдромов человека, вызываемых коронавирусными инфекциями, с начала XXI в. стали причиной гибели более миллиона человек на планете. Несмотря на то что первая волна коронавирусной инфекции случилась еще в 2002 г., до сегодняшнего дня не существует ни одной адекватной животной модели, одновременно удовлетворяющей потребности научного сообщества в воспроизведении патогенеза, клинических проявлений, иммуногенности, разработке и испытании средств специфической профилактики и терапии тяжелого острого респираторного синдрома, ближневосточного респираторного синдрома и коронавирусного заболевания 2019 г. (COVID-19).

Цель работы — представить актуальную информацию по известным животным моделям респираторных синдромов человека, вызываемых коронавирусными инфекциями, и акцентировать внимание читателя на их адекватности, заключающейся в максимально точной имитации клинических признаков и патоморфологических изменений.

Ключевые слова: *коронавирус; SARS-CoV; MERS-CoV; SARS-CoV-2; животные модели; обзор.*

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Нагорных А.М., Тюменцев А.И., Тюменцева М.А., Акимкин В.Г. SARS, снова SARS и MERS. Обзор животных моделей респираторных синдромов человека, вызываемых коронавирусными инфекциями. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(5): 431–444.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-6>

Поступила 16.07.2020
Принята в печать 28.08.2020

SARS, SARS again, and MERS. Review of animal models of human respiratory syndromes caused by coronavirus infections

Aleksey M. Nagornykh[✉], Alexander I. Tyumentsev, Marina A. Tyumentseva, Vasily G. Akimkin

Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia

Since the beginning of the 21st century, major outbreaks of human respiratory syndromes caused by coronavirus infections have caused more than million deaths on the planet. Despite the fact that the first wave of the coronavirus infection took place back in 2002, even now there is not any adequate animal model that would meet the needs of the scientific community for reproducing the pathogenesis, clinical manifestations, immunogenicity, development and testing of preventive and therapeutic compounds specific to Severe Acute Respiratory Syndrome, Middle East Respiratory Syndrome, and Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).

The purpose of the study is to provide relevant information on known animal models of human respiratory syndromes caused by coronavirus infections and to focus the reader's attention on their adequacy, which consists in the most accurate imitation of clinical signs and pathomorphological changes.

Keywords: *coronavirus; SARS-CoV; MERS-CoV; SARS-CoV-2; animal models, review.*

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Nagornykh A.M., Tyumentsev A.I., Tyumentseva M.A., Akimkin V.G. SARS, SARS again, and MERS. Review of animal models of human respiratory syndromes caused by coronavirus infections. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 431–444. (In Russ.).
 DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-6>

Received 16 July 2020
 Accepted 28 August 2020

Введение

Всемирную печальную известность коронавируса получили вследствие регистрации вспышки заболевания, случившейся в южных провинциях КНР в 2002 г. Тогда уровень инфицированности человеческой популяции, по мнению некоторых политических деятелей, не принял угрожающих масштабов в связи с низким уровнем информирования властями КНР компетентных подразделений Всемирной организации здравоохранения. За 2002–2003 гг. вспышка тяжелого острого респираторного синдрома (severe acute respiratory syndrome, SARS) унесла жизни 774 человек, что составило 9,6% от общего числа заболевших (8096 лабораторно подтвержденных диагнозов) [1]. Причиной вспышки заболевания посчитали гастрономические предпочтения населения: в южных регионах КНР является традиционным употребление в пищу мяса гималайских цивет (*Paguma larvata*), енотовидных собак (*Nyctereutes procyonoides*), домашних кошек (*Felis catus*), обыкновенных лисиц (*Vulpes vulpes*), китайских барсуков (*Melogale moschata*) и других аборигенных представителей фауны. В населенных пунктах КНР существуют рынки, на которых осуществляется продажа указанных видов животных — как свободно живущих, так и размножающихся на специальных фермах. Именно у персонала, работающего на этих рынках, а также у посетителей данных торговых точек были зафиксированы первые случаи заболевания, получившего известность как «атипичная пневмония».

Следующим очагом коронавирусной инфекции с острым респираторным синдромом оказался Ближний Восток. В 2012 г. коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (Middle East respiratory syndrome, MERS-CoV) был выделен у жителя Саудовской Аравии, а позже были зарегистрированы случаи еще в 20 государствах мира. За 2012–2013 гг. были выявлены более 1900 случаев заражения MERS-CoV, 36% которых окончились летальным исходом [2]. При этом точный путь передачи вируса окончательно не ясен, а патологоанатомические данные умерших от MERS отсутствуют. На сегодняшний день рабочей версией передачи MERS-CoV считается контакт человека с верблюдом. Верблюды же, в свою очередь, заражаются от летучих мышей родов *Pipistrellus* и *Nycterus*, хотя

путь передачи вируса от рукокрылых, являющихся насекомоядными животными, верблюдам также остается не выясненным.

В третий раз коронавирус проявил себя опять же в южных провинциях КНР в ноябре 2019 г. Возбудитель имел сходные с SARS-CoV признаки, поэтому получил название SARS-CoV-2. С момента регистрации первых случаев заражения до сегодняшнего времени в мире зафиксировано почти 40 млн случаев, около 1,1 млн из которых окончились летальным исходом¹.

Коронавирусы широко распространены среди представителей животного мира. Они приспособились к тому, чтобы поражать множество видов животных, включая птиц, представителей семейств кошачьих и псовых, копытных, мышей, китообразных, приматов, хорьков и верблюдов. Описаны сотни коронавирусов, которые подразделяются на четыре генетически разных рода: альфа и бета поражают в основном млекопитающих, в то время как гамма и дельта инфицируют преимущественно птиц [3]. У домашних животных среди возбудителей коронавирусной инфекции можно выделить альфа-, бета- и дельта-коронавирусы [4].

Альфа-коронавирусы поражают собак (кишечная форма), кошек, свиней (трансмиссивный гастроэнтерит), норок и хорьков (кишечная и системная формы). Бета-коронавирусы инициируют заболевание у крупного рогатого скота (BCoV), собак (респираторная форма), лошадей и свиней (гемагглютинирующий энцефаломиелит), а дельта-коронавирус поражает свиней. Следует сказать, что разработаны и активно применяются вакцины лишь против нескольких заболеваний — альфа-коронавирусов собак и кошек, а также бета-коронавирусов крупного рогатого скота и свиней. Данные вакцины частично повышают устойчивость хозяина к спайковому (от англ. *spike* — шип) гликопротеинам коронавирусов. Однако даже внутри одного рода коронавирусов сами шипы различаются, в первую очередь рецепторсвязывающим доменом, который специфически распознает ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) своего хозяина [5]. Так,

¹ WHO. Novel Coronavirus (2019-nCoV). Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>

коронавирус крупного рогатого скота и возбудители острых респираторных синдромов принадлежат к одному роду, однако BCoV отнесен к линии 2A бета-коронавирусов, вирусы SARS-CoV — к линии 2B бета-коронавирусов, а MERS-CoV вообще является единственным известным патогенным коронавирусом человека линии C [6]. Эти линии коронавирусов настолько отличаются друг от друга генетически, что стимулируют выработку совершенно разных антител, которые не вступают в перекрестную реакцию.

Несмотря на такое кажущееся широкое многообразие животных — кандидатов на роль моделей для имитации патогенеза коронавирусных инфекций человека, количество адекватных животных моделей сильно ограничено. Проблема заключается в узости круга животных, восприимчивых к спайковым гликопротеинам коронавирусов человека.

Животные модели SARS

Специфической мишенью для SARS-CoV является ангиотензинпревращающий фермент 2 [7]. Попав в организм хозяина, вирус в случае активной репликации вызывает поражения легочной ткани и иногда эпителия кишечника, выражающиеся интерстициальной пневмонией с лихорадкой и диареей.

Естественно, что основами для первых животных моделей стали лабораторные грызуны, в частности мыши. Опубликованные данные свидетельствуют о неоднозначности результатов использования мышей в качестве моделей для SARS. Так, D. Wentworth и его коллеги использовали 4-недельных самок мышей линии BALB/c, инокулируя им интраназально и перорально 2×10^5 TCID₅₀/мл SARS-CoV штамм Urbani. Клинические признаки заболевания проявлялись в потере до 6% массы тела и взъерошенности шерсти у животных из экспериментальной группы. Вируснейтрализующие антитела обнаруживались с 7-го по 28-й день после заражения, причем максимальный их титр достигался на 28-й день. Данные серологического исследования, а также обнаружение субгеномной РНК в легких и кишечнике мышей, по мнению членов исследовательской группы, служили доказательством, что SARS-CoV реплицируется в этих тканях. Результаты исследования продемонстрировали раннее достижение пиковых значений концентрации вируса в легочной ткани и кишечнике (на 3–5-й день после заражения) и следующий за этим клиренс, завершающийся к 10-му дню после инокуляции возбудителя [8].

Согласно статистическим данным, SARS наиболее тяжело протекает у пожилых людей, что натолкнуло исследователей на возможность применения в качестве моделей возрастных мышей дикого типа. Так, группа под руководством A. Roberts проводила интраназальное заражение мышей ли-

нии BALB/c 12–14-месячного возраста 10^5 TCID₅₀ SARS-CoV штамм Urbani. Сходные с SARS клинические признаки, за исключением лихорадки, которая так и не была диагностирована, проявились спустя 3 дня после инокуляции вируса. Однако клиренс наступал уже к 7-му дню, а летальных случаев вовсе не отмечалось [9].

Отсутствие высокого уровня специфической летальности, а также позднее наступление пика сероконверсии у животных дикого типа послужило причиной создания трансгенных мышей, способных экспрессировать ангиотензинпревращающий фермент 2 человека (hACE2). В 2007 г. две группы ученых независимо друг от друга опубликовали результаты инокуляции SARS-CoV hACE2-трансгенным мышам [10, 11]. В обоих случаях осуществлялось интраназальное заражение созданных моделей штаммом Urbani. В ходе исследования у инфицированных трансгенных мышей регистрировались уменьшение массы тела, снижение активности и затрудненное дыхание на 3–5-й день после инокуляции возбудителя. На 7–8-й день после заражения все мыши из экспериментальных групп погибли, причем более ранняя гибель наблюдалась у животных, имеющих наибольшее количество копий hACE2-трансгена (гибель начали регистрировать с 4-го дня) [10]. Гистологическое исследование показало инфильтрацию легких макрофагами и лимфоцитами, а также повышенную экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов в легких и головном мозге, что сходно с картиной SARS у человека [11]. Кроме того, для демонстрации умеренной адекватности полученных моделей авторы провели исследование эффективности упреждающей терапии инфицированных животных моноклональными антителами человека, специфичными к SARS-CoV. Выявлено, что предварительное внутривенное введение моноклональных антител в дозе 25 мг/кг массы тела за 1 сут перед инокуляцией патогена полностью предотвращало гибель мышей [10].

Даже эту модель нельзя назвать полностью адекватной, хотя она и позволила сделать большой шаг в понимании патогенеза SARS: несмотря на снижение титра вводимого вируса в десятки раз [10], летальность у трансгенных мышей наступала гораздо раньше, чем это наблюдалось у людей.

Другая группа ученых проводила интраназальное заражение рекомбинантными штаммами SARS-CoV с делециями области ORF7ab в количестве 10^3 TCID₅₀/мл иммунодефицитных сирийских хомячков, иммуносупрессия у которых была вызвана циклофосфамидом, причем увеличение дозы и кратности введения циклофосфамида прямо пропорционально увеличивало потерю массы тела и летальность. С другой стороны, осталось не ясным, чем было обусловлено увеличение этих показателей: повышенной или продолжительной реплика-

цией вируса или увеличением повреждения тканей, вызванным цитокинами. При этом гистологическая оценка органов зараженных иммунодефицитных хомяков выявила наличие хронической интерстициальной бронхопневмонии на 19-й день после инокуляции вируса. Изменения, обнаруженные в сердце, почках и носовой полости, были единичны, с небольшой степенью поражения. Сомнительно, что эта модель была бы полезна при исследовании вакцин, но она может быть адекватной при оценке эффективности противовирусных соединений или методов терапии [12].

Домашние кошки и хорьки, имеющие свои коронавирусные патогены, оказались подвержены и носительству SARS-CoV. Для подтверждения этой теории кошкам и хорькам интратрахеально было инокулировано по 10^6 TCID₅₀ четырехкратно пассированного *in vitro* на клеточной культуре Vero-118 изолята, полученного от пациента 5568, умершего от SARS. Во время наблюдения кошки не проявляли клинических признаков развивающейся инфекции, в то время как у 3 хорьков наступило состояние летаргии на 2–4-й день после инфицирования, 1 из них погиб на 4-й день после инокуляции патогена. Начиная со 2-х суток после заражения и у кошек, и у хорьков при исследовании глоточных смывов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией обнаруживался SARS-CoV. Вирусовыделение продолжалось до 10-го дня у кошек и до 14-го дня у хорьков, причем поголовное выделение вируса регистрировалось только до 8-го дня. Что касается исследования носовых и ректальных мазков, то лишь у 2 кошек было подтверждено выделение вируса на 4-й и 6-й дни после заражения. Количественное определение в гомогенатах легких продемонстрировало у кошек низкие титры вируса ($1 \times 10^3 \pm 0,51$ TCID₅₀/мл), в то время как у хорьков титры были более высокими ($1 \times 10^6 \pm 0,70$ TCID₅₀/мл). Титры вируснейтрализующих антител у всех животных достигли уровня 40–320 к 28-му дню. При этом кошки из контрольной группы, не инфицированные SARS-CoV, содержащиеся совместно с животными из экспериментальной группы, к тому же времени продемонстрировали более низкий уровень сероконверсии (титры вируснейтрализующих антител были 40 и 160), без проявления клинических признаков заболевания. У неинфицированных хорьков развились вялость и конъюнктивиты, а гибель наступила на 16-й и 21-й дни, при этом подтверждение того, что животные погибли от SARS-CoV-ассоциированной пневмонии, не оказалось, несмотря на посмертное выделение вируса из образцов легких у одного из павших хорьков [13]. Несомненно, что результаты этого эксперимента оказались полезны для понимания возможностей передачи вируса от животного человеку, однако быстрый клиренс вируса и отсутствие явных клинических признаков,

характерных для заболевшего SARS человека, не позволили сделать эти модели адекватными для оценки терапевтических протоколов.

На хорьках проводилось тестирование синтезированного моноклонального антитела IgG1 CR3014, при этом для заражения использовался штамм HKU-39849, хозяевами которого могут быть человек, хорек и макак-резус. Предварительное, за 1 сут до заражения, введение моноклональных антител существенно снизило репликацию вируса в тканях легких, а выделение SARS-CoV с отделяемым глотки у 75% подвергнувшихся терапии животных было полностью исключено. Однако оставшиеся 25% животных выделяли вирус с той же интенсивностью, что и хорьки, не подвергшиеся лечению [14].

Что же касается экспериментального заражения физиологически и анатомически наиболее близких человеку и доступных лабораторных животных — нечеловекообразных приматов (НЧП), то наибольшее количество данных получено при исследованиях на макаках-резусах (*Macaca mulatta*), африканских зеленых мартышках (*Chlorocebus sabaeus*) и макаках-крабоедах (*Macaca fascicularis*). В обширном исследовании [15] использовались все три упомянутых выше вида приматов. Заражение происходило двумя способами — интраназально и интратрахеально — штаммом Urbani по 1 мл 10^6 TCID₅₀/мл. Мониторинг состояния животных показал, что вирус способен реплицироваться в легочной ткани НЧП, при этом уровень сывороточных вируснейтрализующих антител прямо пропорционально коррелирует с уровнем репликации вируса в респираторном тракте. Как сообщалось, ни у одной из обезьян не отмечалось признаков респираторного заболевания, сопровождающегося лихорадкой. Интересно, что уровень репликации вируса в верхнем и нижнем отделах респираторного тракта был максимальным у африканских зеленых мартышек (среднее значение 10^3 TCID₅₀/мл), а минимальным — у макак-резусов. Среднее значение титров вируснейтрализующих антител у макак-резусов составляло 1 : 27, у макак-крабоедов — 1 : 31, а у африканских зеленых мартышек — 1 : 57 [15].

Другая группа исследователей ограничила свой выбор модели только макаками-крабоедами. Заражение происходило штаммом Urbani, однако было выбрано несколько способов инокуляции возбудителя в организм моделей. Животные первой группы были заражены интраназально и интрабронхиально, второй — интраназально и конъюнктивально, третья группа получила внутривенную инъекцию вируса. Как отмечается, животные первых двух групп имели клинические признаки заболевания легкой и средней тяжести, демонстрировали выработку антител, у них даже рентгенографически была зафиксирована пневмония, однако, как и в предыдущем исследовании, у приматов от-

существовал главный симптом SARS — лихорадка. Титр вируса к 28-му дню после заражения у подавляющего большинства макак-крабоедов был равен нулю [16]. Дополнительные исследования показали отсутствие возможности повторного заражения SARS-CoV африканских зеленых мартышек и макак-крабоедов, по крайней мере, в краткосрочной перспективе.

В связи с изложенным выше полезность моделей НЧП, безусловно, высокая, но демонстрируемые клинические признаки накладывают ограничения на применение приматов для изучения патогенных или иммуногенных свойств SARS-CoV.

Животные модели MERS

Абсолютно понятно, что проведение заражения штаммом вируса MERS таких естественно восприимчивых животных, как верблюды, является очень дорогостоящим исследованием, тем более что верблюды не смогут отразить всю полноту патогенеза инфекции. К тому же экспериментальное заражение культур клеток дыхательных путей животных, применяемых для имитации респираторных заболеваний человека (мыши дикого типа, хомяка, хорька), с целью определения возможных кандидатов на роль животной модели показало неспособность MERS-CoV реплицироваться в этих клетках [17]. Это связано с различиями аминокислотного состава во внеклеточном домене дипептидилпептидазы 4 (DPP4), которая является специфическим рецептором для S-гликопротеина MERS-CoV. Филогенетический анализ вируссвязывающей области DPP4 позволил сгруппировать DPP4 человека (hDPP4), макаки, лошади, кролика с DPP4 крупного рогатого скота, свиньи и летучей мыши, несмотря на то что они сильно различаются по результатам филогенетического анализа полного DPP4 [18]. Поэтому попытки воспроизвести MERS на иммунодефицитных линиях мышей также не увенчались успехом [19].

С другой стороны, предварительная, за 5 дней до заражения MERS-CoV, трансдукция молодым и пожилым мышам штаммов C57BL/6 и BALB/c аденовирусного вектора, несущего DPP4 человека (Ad5-hDPP4), позволила достигнуть уровня репликации вируса 7×10^7 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на 1 г в легочной ткани ко 2–3-му дню после заражения. При этом к 7-му дню после инокуляции вируса у животных регистрировалась интерстициальная пневмония, в течение 10 дней после заражения молодые мыши BALB/c не набирали массу, а пожилые животные обоих штаммов ее теряли, но ни одного летального исхода не зафиксировано. Молодые мыши достигали клиренса вируса к 6–8-му дню после заражения, а пожилые — к 10–14-му дню [20].

Соответственно, дальнейшие исследования MERS-CoV могли продолжаться по трем основным

направлениям: поиск подходящих видов животных, модификация традиционных животных и адаптация вируса к невосприимчивым животным.

Исследования на клеточных культурах показали, что введение 2 аминокислот, соответствующих в человеческой последовательности позициям 288 и 330 в рецепторе mDPP4, поддерживает прикрепление, проникновение и репликацию MERS-CoV [21]. Поэтому в одной серии экспериментов редактирование генома мышей C57BL/6J дикого типа проводилось с применением технологии CRISPR/Cas9, а для придания патогенных свойств возбудитель пассировался на мышах 15 раз. Особенностью данной модели считается отсутствие проявлений неврологических признаков [22]. В другом исследовании адаптация штамма вируса проводилась посредством 30 последовательных пассажей на мышах, несущих замененный человеческим локус гена *DPP4*. В результате полученный вирус отличался от исходного оригинала EMC-2012 в 3 локусах, один из которых характеризовал шип вириона (T1015N) [2].

С одной стороны, неоспоримая полезность этих исследований заключается в создании летальной мышинной модели, адаптированной для заражения MERS-CoV, но с другой стороны, и штамм вируса был изменен. В итоге получена генетически измененная мышь, при заражении которой генетически модифицированным вирусом летальность достигает 80%. Даже если отбросить постулаты Коха, найдется немало критиков подобного подхода к изучению патогенеза заболевания, смертельно опасного для некоторых категорий людей. Однако для изучения столь угрожающих здоровью населения инфекций любые данные, позволяющие понять механизм заболевания, будут полезны.

В 2015 г. были опубликованы результаты успешного создания летальной мышинной модели MERS посредством инокуляции трансгена, содержащего кДНК hDPP4, в зиготы мышей штаммов B6C3F1/J × C57BL/6J или C57BL/6J. После заражения MERS-CoV у полученных Tg⁺-мышей развивалась прогрессирующая пневмония, характеризующаяся обширной воспалительной инфильтрацией, в то время как поражения мозга были незначительны [23]. У полученных трансгенных мышей отмечался дозозависимый летальный исход со 100% смертностью: при интраназальном введении штамма EMC-2012 MERS-CoV в дозе 10^6 TCID₅₀ мыши погибали в течение 4–6 дней после инокуляции, в то время как при введении дозы 10^2 TCID₅₀ гибель 100% животных происходила в течение 6–12 дней [24].

В настоящее время hDPP4-трансгенная мышь является единственной доступной летальной моделью тяжелой инфекции MERS-CoV на мелких животных. Хотя эти мыши экспрессируют hDPP4 глобально во всех типах клеток, в отличие от нормальной экспрессии DPP4 у людей, тем не менее

эта модель может быть использована в целях скрининга эффективности противовирусных препаратов и вакцин для смягчения или предотвращения MERS-CoV-индуцированного респираторного заболевания.

Учитывая, что хорьки продемонстрировали относительную восприимчивость к SARS-CoV, а также к некоторым другим респираторным инфекциям [25, 26], на них были осуществлены и попытки воспроизведения патогенеза MERS-CoV. Однако интраназальное и интратрахеальное заражение хорьков MERS-CoV в дозе 10^6 TCID₅₀ не вызвало сероконверсии, а сам инфекционный вирус у животных не обнаружен [18].

Поскольку область связывания вируса и DPP4 кролика имеет много общего с аналогичной областью у человека [18], исследовали возможность заражения кроликов MERS-CoV. Полученная модель имеет ограниченную ценность, поскольку кролики выделяли вирус из верхних дыхательных путей, но у них не проявлялись симптомы заражения, поэтому изучение заболевания в контексте развития и нарастания клинических признаков оказалось невозможным. Как правило, вирус обнаруживался в мазках из носовой полости в течение 7 дней после заражения [6].

Хотя обозначенные выше модели, бесспорно, внесли огромный вклад в изучение патогенеза MERS-CoV и дали основу для скрининговых исследований противовирусных терапевтических препаратов и эффективности вакцин, следует напомнить, что первой животной моделью, на которой были выполнены постулаты Коха для MERS-CoV, стали макаки-резусы. Животных в возрасте 6–12 лет заражали вирусом в дозе 7×10^6 TCID₅₀ комбинированным способом, используя интраназальную, интратрахеальную, конъюнктивальную и оральную инокуляцию возбудителя [27, 28]. Клинические признаки, проявляющиеся снижением аппетита, лихорадкой, учащением дыхания, кашлем и сторбленной позой, развились в течение 24 ч у всех животных и длились 4 дня. Грубые поражения, представляющие собой плотные отечные светло- или темно-красные очаги, развивались только в легких. Также из легких был выделен инфекционный вирус, а РНК MERS-CoV была обнаружена в некоторых тканях верхних и нижних дыхательных путей. РНК MERS-CoV была также идентифицирована в мазках из носовой полости, образцах бронхоальвеолярного лаважа и нескольких мазках из ротоглотки. Несмотря на наличие вирусной РНК и свидетельство выделения вируса из верхних дыхательных путей, поражения и репликация вируса наблюдались только в тканях нижних дыхательных путей, при этом репликация вируса происходила в пневмоцитах I и II типов. Как было показано с помощью иммуногистохимического исследования, вирусный антиген в легких присут-

ствовал исключительно в зонах пневмонии. Вирусную РНК в крови, как и в любых органах брюшной полости, обнаружить не удалось [6].

В свою очередь, группа китайских исследователей показала, что выработка специфических антител против MERS-CoV у макак-резусов начинается с 7-го дня после инфицирования и с течением времени титр антител увеличивается. Кроме того, вырабатываемые вируснейтрализующие антитела обеспечивали защиту, предотвращая развитие инфекции при повторном заражении макак-резусов [29].

Основываясь на отсутствии различий между 14 аминокислотными остатками DPP4 человека и обыкновенной игрунки (*Callithrix jacchus*) в областях взаимодействия рецепторсвязывающего домена спайкового гликопротеина, группа исследователей под руководством D. Falzarano предположила возможность связывания S-гликопротеина MERS-CoV с DPP4 обыкновенной игрунки. Начиная с 1-го дня после инокуляции штамма EMC-2012 комбинированным способом, аналогичным описанному ранее для макак-резусов, у животных наблюдалось возникновение и прогрессирование клинических признаков инфекции: учащенное и затрудненное дыхание, снижение аппетита и активности. Пиковые значения данных клинических показателей наблюдались между 4-м и 6-м днями после заражения, причем на 13-й день показатели вернулись к исходному уровню. С 3-го дня после заражения у животных наблюдалось снижение температуры тела, которая нормализовалась к 9-му дню после инокуляции возбудителя. Клинически значимых изменений химического состава и цитологических показателей крови не отмечалось ни у одного из животных, по сравнению с моделью макак-резусов [30].

В отличие от макак-резусов основными сайтами репликации вируса были пневмоциты I типа и альвеолярные макрофаги, а иммуногистохимическое исследование показало, что эти типы клеток экспрессируют DPP4. В легких были обнаружены высокие уровни вирусной РНК, в то время как более низкие уровни РНК присутствовали в тканях верхних дыхательных путей и мазках, полученных из носовой полости и ротоглотки, а также в крови и некоторых внутренних органах, включая почку. Инфекционный вирус выделяли из тканей как верхних, так и нижних дыхательных путей. Выявление вирусной РНК в системах нескольких органов показало, что MERS-CoV широко распространяется по всему организму игрунок, однако поражения присутствовали только в дыхательных путях [6].

Животные модели COVID-19

На момент распространения инфекции, вызванной SARS-CoV-2, научное сообщество уже имело представление о возможных животных моделях для исследования этого нового заболевания. Хо-

тя вспышки SARS-CoV происходили более 15 лет назад, исследования продолжались и после их окончания. Поэтому первоначально, исходя из того, что идентичность нуклеотидных последовательностей SARS-CoV-2 и SARS-CoV составляет 79–82% [31, 32], были задействованы модели, эффективные при исследовании SARS-CoV, а учитывая динамику роста количества заболевших и умерших от COVID-19 людей, даже авторитетные печатные издания пошли на риск опубликовать нерцензированные доклады.

В одном из докладов сообщается об интраназальном инфицировании hACE2-трансгенных мышей штаммом NB-01 SARS-CoV-2 в дозе 10^5 TCID₅₀/мышь. Спустя 5 дней после заражения у этих мышей отмечались взъерошенная шерсть и потеря массы тела на 8%, однако других признаков, указывающих на развитие инфекции, не наблюдалось. Вирусная РНК обнаруживалась в легких и кишечнике спустя 1 день после заражения. Гистологическое исследование также показало наличие очагов интерстициальной пневмонии у зараженных животных, в то время как в других органах, включая головной мозг, повреждений не выявлено [33]. Как и в подавляющем большинстве исследований, примеры которых приводились в этом обзоре ранее, данная модель не летальная. К тому же начиная с 7-го дня после инфицирования очаги пневмонии начали организовываться, что относит эту модель в категорию подходящих для изучения патогенеза SARS-CoV-2, но оставляет немало вопросов о ее пригодности для исследования поствакцинального иммунитета.

Тестирование восприимчивости путем комбинированной инокуляции (интраназально и внутривенно) штамма USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 в дозе 10^5 фокусобразующих единиц иммунокомпрометированным штаммам лабораторных мышей (BALB/c, DBA/2J, Stat1^{-/-} C57BL/6, AG129, Rag1^{-/-} C57BL/6) показало отсутствие потери массы тела у всех животных на протяжении 1-й недели исследования, а в собранных спустя 10 дней после заражения легких количество вирусной РНК было очень мало [34].

В продолжение данного исследования ту же дозу штамма USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 инокулировали мышам BALB/c интраназальным и внутривенным способами спустя 5 дней после внедрения аденовируса, кодирующего hACE2 (AdV-hACE2). В течение 1-й недели у животных отмечалась потеря 10–25% массы тела. На 4-й день после заражения в легочной ткани были обнаружены высокие уровни SARS-CoV-2 и вирусной РНК, тогда как более низкие уровни присутствовали в сердце, селезенке и мозге при почти полном отсутствии в тканях почек, желудочно-кишечного тракта и в сыворотке крови. Поскольку трансдукция AdV-hACE2 инициирует лишь временную сенсibilизацию hACE2 у мышей, то к 8–10-му дням после заражения уровни вирус-

ной РНК снизились в 1000 раз, хотя все еще легко детектировались. И конечно, недостатком данной модели является само применение аденовирусного вектора, т.к. он может быть самостоятельным инициатором или протагонистом повреждений, возникающих в легких [34].

Другой способ доставки hACE2 в дыхательные пути мышей линии C57BL/6J (B6J) — посредством аденоассоциированного вируса. Инфицирование производилось интраназально штаммом USA-WA1/2020 в дозе 10^6 БОЕ/мышь. На протяжении 14 дней у мышей не отмечалось снижения массы тела или гибели. Авторы заявляют, что у зараженных мышей сохранялся продуктивный инфекционный процесс, однако представленные иллюстрации демонстрируют снижение количества вирусной РНК начиная со 2-го дня после инокуляции возбудителя, причем практически с тем же уровнем прогрессии, что и у животных, не инфицированных SARS-CoV-2. Гистопатологические изменения в легких характеризовались наличием незначительных диффузных перибронхиальных инфильтратов [35].

На сегодняшний день венцом в создании гуманизированных мышинных моделей коронавирусных заболеваний человека, экспрессирующих hACE2, можно считать направленное редактирование генома посредством технологии CRISPR/Cas9. С помощью данной технологии последовательность кДНК, кодирующая hACE2, была интегрирована в экзон 2, являющийся первым кодирующим экзоном гена мышинного ACE2 (*mACE2*), модифицируя и таким образом прекращая его экспрессию. Направляющая РНК, мРНК, кодирующая Cas9, и донорная последовательность, кодирующая hACE2, были инъецированы в зиготы мышей линии C57BL/6. Успешная инсерция была подтверждена у почти 22% полученных детенышей. Затем основателей подвергли обратному скрещиванию с мышами C57BL/6, и полученное потомство F1⁺ было подвергнуто скринингу. Дополнительные исследования показали отсутствие случайных вставок у всех полученных мышей, при этом ген *mACE2* полностью отсутствовал у гомозиготных особей, но в легких, тонком отделе кишечника, селезенке и почках в достаточном количестве стабильно экспрессировался ген *hACE2*. Полученные мыши были названы hACE2-KI/NIFDC (hACE2-мышь) [31].

Для подтверждения восприимчивости гуманизированных мышей было осуществлено их интраназальное инфицирование SARS-CoV-2 в дозе 4×10^5 БОЕ. Следует отметить, что заражению подверглись не только молодые животные в возрасте 4,5 нед, но и пожилые особи в возрасте 30 нед, что очень важно, т.к. в группе риска находятся именно пожилые люди и лица, страдающие хроническими заболеваниями. Начиная с 3-го дня после инокуляции патогена у пожилых мышей регистрировалась

потеря до 10% массы тела, однако затем наступало выздоровление, при этом явных клинических признаков прогрессирования инфекции SARS-CoV-2 ни у одного из животных не наблюдалось. Устойчивая репликация вирусной РНК была обнаружена в легких, трахее и тканях головного мозга hACE2-мышей, независимо от возраста, однако вирусная РНК не выявлялась в селезенке, почке, печени, сыворотке крови и кишечнике, несмотря на то что в кале пожилых мышей был обнаружен высокий уровень вирусных РНК ($2,9 \times 10^5$ копий/г). Обнаружение РНК в кале совпадало с данными о пациентах, имевших желудочно-кишечные симптомы после инфицирования SARS-CoV-2 [36, 37]. Пероральное введение вируса hACE2-мышам также привело к его репликации в трахее и легких у 40% животных в количестве, сопоставимом с таковым у животных, зараженных интраназальным путем. Хотя клинических признаков развивающегося заболевания у животных по-прежнему не наблюдалось [31].

Гистологическое исследование показало наличие независимой от возраста интерстициальной пневмонии, характеризующейся инфильтрацией воспалительных клеток, утолщением альвеолярной перегородки и характерным повреждением сосудистой системы. Кроме того, у пожилых мышей отмечалась обширность поражений альвеолярных эпителиальных клеток и очаговых кровоизлияний, а также повышенная инфильтрация тканей нейтрофилами и макрофагами, а непосредственное инфицирование макрофагов в легких приводило к значительному апоптозу [31], что повторяет клинические признаки у большинства пациентов, пораженных COVID-19. К сожалению, авторы публикации не указывают, была ли разработанная модель летальной, ведь животных выводили из эксперимента на 6-й день после заражения. В связи с этим можно говорить о безусловной ценности полученной модели, но адекватность ее под сомнением, и, возможно, в скором времени мы увидим опровержение этих сомнений.

Исходя из аналогии с SARS-CoV, в качестве моделей для COVID-19 используются золотистые сирийские хомяки. Большинство исследований на них проводятся для демонстрации патогенеза и возможных путей передачи используемого штамма или клинического изолята от инфицированного животного наивным хомякам [38–40]. Эффективными оказались как интраназальное введение вируса [41], так и его комбинация с конъюнктивальным способом [40], причем более эффективным признан комбинированный способ. Во всех опубликованных результатах проявление клинических признаков COVID-19 достаточно условное, заболевание протекает зачастую с незначительной потерей массы тела — на 10–15%, в основном пожилыми животными. Постепенное восстановление массы тела

происходит в течение 7 дней. Инфекционная вирусная нагрузка в верхних дыхательных путях достигала своего пика на 2–3-й день после заражения, затем происходило ее быстрое снижение [38], а клиренс вируса достигался к 7-му дню. Вирусный антиген возбудителя COVID-19 обнаруживался в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки на 2-й день после заражения при отсутствии признаков воспаления. Кроме того, вирусная РНК выявлялась в свежих пробах фекалий, собранных со 2-го по 7-й день после инокуляции патогена [38].

Гистологические исследования показали наличие в легочной ткани инфицированных животных воспалительных инфильтратов, характерных для легкой формы течения COVID-19 [39].

Хотя у первично инфицированных хомяков вирусная РНК выделялась из носовой полости на протяжении 10–14 дней, способность заражать здоровых животных контактным и аэрозольным путями у них сохранялась только в течение первых 3 дней после инокуляции возбудителя [38].

Исследование дозозависимого эффекта продемонстрировало возникновение обширных повреждений нижних отделов дыхательной системы на более ранних сроках у животных, получавших повышенное количество вирусных частиц, хотя к 6-му дню после заражения объемы повреждений сравнялись с таковыми у животных, получавших умеренную дозу [41].

Повторное заражение хомяков SARS-CoV-2, по крайней мере, в краткосрочной перспективе оказалось невозможным ввиду образования вируснейтрализующих антител [42]. Они были выделены у хомяков-реконвалесцентов спустя 14 дней после заражения, и их средний титр составил не менее 1 : 427. Использование полученных таким образом сывороток значительно снизило вирусную нагрузку на легкие хомяков, но не смогло предотвратить развитие в них патологии [39].

На сегодняшний день опубликовано немного сообщений об имитации COVID-19 у хорьков [43, 44]. Большую адекватность продемонстрировала модель, созданная Y.I. Kim [44], хотя она также не является летальной. Она отличается от предыдущих животных моделей COVID-19 проявлением лихорадки с периодическим кашлем, устойчивым снижением массы тела и пониженной активностью на протяжении 4–6 дней после интраназальной инокуляции возбудителя. Зараженные SARS-CoV-2 хорьки выделяли вирус с носовым отделяемым, слюной, мочой и калом в течение 8 дней после инокуляции возбудителя, а наибольшая его репликация достигалась в носовых раковинах, трахее, легких, почках и кишечнике [44].

Более того, удалось показать возможность заражения наивных хорьков при прямом контакте с животными, демонстрирующими клинические

признаки заболевания, хотя зараженные наивные хорьки демонстрировали только повышенную температуру тела и сниженную активность без потери массы тела. У наивных животных, имевших косвенный контакт с инфицированными хорьками, не развивалось клинических признаков, однако у нескольких животных обнаруживалась вирусная РНК, что свидетельствует о возможности воздушного пути передачи.

Созданная модель уже продемонстрировала свою практическую значимость — на ней производилось тестирование противовирусной эффективности одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Министерства здравоохранения и социальных служб США препаратов против COVID-19: лопинавира-ритонавира, гидроксихлорохинсульфата и эмтрицитабина-тенофовира [45].

Сравнительный анализ вариаций рецептора ACE2 у различных видов приматов показал, что все обезьяны Старого Света (катаррины) с большой долей вероятности будут очень восприимчивы к SARS-CoV-2, в отличие от обезьян Нового Света (платиррины). Особенность заключается в 3 различиях в аминокислотных остатках, в 2 из которых, H41Y и E42Q, различия существенны [46].

Выбор НЧП для имитации инфицирования COVID-19 обычно ограничивается их стандартными видами: макаком-крабоедом, макаком-резусом, обитающими в Старом Свете, и обыкновенной игрункой, эндемиком Нового Света. Хотя существуют сообщения об исследованиях SARS-CoV-2 на павианах и бабуинах [47].

Пол и возраст не влияли на развитие и клинические проявления COVID-19 у НЧП [48, 49], что подтверждает версию о том, что не преклонный возраст, а наличие сопутствующих заболеваний является причиной высокой летальности среди пожилых людей. После инфицирования у катарринов отмечалось повышение температуры тела, например у макак-резусов она поднималась до 40,9°C, в то время как у трети макак-крабоедов и игрунок температура тела поднималась незначительно. Заболевание сопровождается снижением массы тела: у макак-резусов на 6–29%, а у макак-крабоедов — на 2–11% [49], при этом повторное заражение макак-резусов не вызывало рецидива COVID-19 [50]. Начиная с 10-го дня после инокуляции вируса при исследованиях методами лучевой диагностики у катарринов фиксируется патология легких. В образцах смывов уже на 2-й день после инокуляции вируса наблюдается высокий уровень вирусной РНК, а пика он достигает на 6–8-й день после инфицирования и может обнаруживаться до 14-го дня после инокуляции. По сравнению с анальными и назальными смывами, меньшее количество вирусной РНК наблюдается в смывах из гортани, несмотря на то

что выделение вируса с фекалиями происходит не у всех приматов Старого Света. В периферической крови вирусная РНК появляется на 2–6-й день после заражения и исчезает к 10-му дню, сохраняясь в селезенке [49]. В отличие от катарринов, у приматов Нового Света на протяжении 2 нед после инфицирования в смывах обнаруживаются низкие уровни вирусной РНК.

Гистопатологические изменения у катарринов варьируют от обширных кровоизлияний в легочной ткани [49] до мультифокальной интерстициальной пневмонии [47]. Отек бронхолегочных и средостенных лимфатических узлов, экссудативный перикардит и воспаление брыжеечных лимфоузлов дополняют патогистологическую картину. В отличие от приматов Старого Света, у платирринов наблюдалась легкая инфильтрация разрушенных альвеолярных перегородок клетками воспаления. Незначительные геморрагии присутствуют в паренхиме селезенки, зародышевый центр которой находился в состоянии активной пролиферации [49].

Несмотря на относительно успешную имитацию на макаках инфицирования COVID-19, послужившую основанием для исследования на них предполагаемой противовирусной эффективности, например, гидроксихлорохина [51], существует мнение, что бабуины являются более предпочтительной моделью, т.к. развивающаяся у них патология обширнее и сопровождается более распространенными и тяжелыми воспалительными поражениями по сравнению с макаками-резусами [47]. В то же время использование приматов Нового Света, например обыкновенных игрунок, по меньшей мере, нерационально, т.к. количество допустимых с ними контрольных процедур ограничено, клинические признаки заболевания не выражены, а в образцах тканей, полученных при некропсии, вирусная РНК не обнаруживается [49].

Заключение

Как и для подавляющего большинства заболеваний человека, для коронавирусных инфекций, сопровождающихся острым респираторным синдромом, нет однозначной адекватной животной модели. В этой статье мы сделали попытку осветить животные модели, адекватно воспроизводящие клинические (табл. 1), патоморфологические (табл. 2) и другие признаки респираторных синдромов человека, вызываемых коронавирусными инфекциями.

Возможно, изучение естественных резервуаров возбудителей позволило бы пролить свет на этиологию возникновения у них таких опасных для человечества мутаций. К сожалению, основные подозреваемые в качестве источника заражения животные ведут скрытный образ жизни и недостаточно изучены. К тому же для их гуманного изучения достаточно сложно обеспечить подходящее содер-

жание в условиях научно-исследовательских вивариев. Поэтому пока нам остается довольствоваться моделями на основе стандартных видов лабораторных животных, изучая патогенез и симптоматику на одних, а специфическую терапию и иммунопро-

филактику — на других. Так, модель трансгенных мышей, экспрессирующих hACE2, предложенная Р.В. McCray [10], оказалась наиболее адекватной среди моделей мелких лабораторных животных для SARS в связи с демонстрацией схожих с человеком

Таблица 1. Характеристика животных моделей респираторных синдромов человека, вызываемых коронавирусными инфекциями, с позиции адекватности воспроизведения клинических признаков

Table 1. Characteristics of animal models of human respiratory syndromes caused by coronavirus infections from the point of view of their adequacy and capability to simulate clinical features

Животное Animal		Наблюдаемые адекватные клинические признаки Observed adequate clinical features		
		SARS	MERS	COVID-19
Мыши Mice	BALB/c, молодые BALB/c, young	Потеря веса [8] Weight loss [8]	Признаки респираторного дистресса [20] Respiratory distress symptoms [20]	Потеря веса [34] Weight loss [34]
	BALB/c, пожилые BALB/c, aged	Потеря веса [9] Weight loss [9]	Признаки респираторного дистресса [20] Respiratory distress symptoms [20]	–
	C57BL/6	–	Признаки респираторного дистресса [20], летальный исход [2, 22] Respiratory distress symptoms [21], lethal outcome [2, 22]	–
	Трансгенные Transgenic	Летальный исход [10] Lethal outcome [10]	Потеря веса [23], летальный исход [24] Weight loss [23], lethal outcome [24]	Потеря веса [33] Weight loss [33]
Золотистые сирийские хомяки Golden Syrian hamsters		Летальный исход [12] Lethal outcome [12]	–	Потеря веса [38], признаки респираторного дистресса [39, 41] Weight loss [38], respiratory distress symptoms [39, 41]
Кролики Rabbits		–	–	–
Хорьки Ferrets		Летальный исход [13] Lethal outcome [13]	–	Признаки респираторного дистресса [44] Respiratory distress symptoms [44]
Кошки Cats		–	–	–
НЧП Non-human primates	Макаки-резусы Rhesus monkeys	–	Взъерошенность шерсти [28], потеря веса [27–29] Ruffled hair [28], weight loss [27–29]	Признаки респираторного дистресса [47, 49] Respiratory distress symptoms [47, 49]
	Африканские зеленые мартышки African Green monkeys	–	–	–
	Макаки-крабоеды Cynomolgus	Признаки респираторного дистресса [16] Respiratory distress symptoms [16]	–	Признаки респираторного дистресса [47, 49] Respiratory distress symptoms [47, 49]
	Обыкновенные игрунки Common marmosets	–	Взъерошенность шерсти, потеря веса, признаки респираторного дистресса [30] Ruffled hair, weight loss, respiratory distress symptoms [30]	–

Таблица 2. Характеристика животных моделей респираторных синдромов человека, вызываемых коронавирусными инфекциями, с позиции адекватности воспроизведения патоморфологических изменений

Table 2. Characteristics of animal models of human respiratory syndromes caused by coronavirus infections from the point of view of their adequacy and capability to simulate pathomorphological changes

Животное Animal		Обнаруженные адекватные патоморфологические изменения Detected adequate pathomorphological changes		
		SARS	MERS	COVID-19
Мыши Mice	BALB/c, молодые BALB/c, young	–	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [20] Damage to the organs of the lower respiratory system [20]	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [34] Damage to the organs of the lower respiratory system [34]
	BALB/c, пожилые BALB/c, aged	Поражение органов верхнего и нижнего отделов дыхательной системы [9] Damage to the organs of the upper and lower respiratory system [9]	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [20] Damage to the organs of the lower respiratory system [20]	–
	C57BL/6	–	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [2, 20, 22] Damage to the organs of the lower respiratory system [2, 20, 22]	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [35] Damage to the organs of the lower respiratory system [35]
	Трансгенные Transgenic	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы, желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы [10] Damage to the organs of the lower respiratory system, gastrointestinal tract and central nervous system [10]	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [23, 24], желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы [24] Damage to the organs of the lower respiratory system [23, 24], gastrointestinal tract and central nervous system [24]	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [31, 33] Damage to the organs of the lower respiratory system [31, 33]
Золотистые сирийские хомяки Golden Syrian hamsters	Поражение органов верхнего и нижнего отделов дыхательной системы [12] Damage to the organs of the upper and lower respiratory system [12]	–	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [38, 39, 41] и органов желудочно-кишечного тракта [39] Damage to the organs of the lower respiratory system [38, 39, 41] and gastrointestinal tract [39]	
Кролики Rabbits	–	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [6] Damage to the organs of the lower respiratory system [6]	–	
Хорьки Ferrets	Поражение органов верхнего и нижнего отделов дыхательной системы [13] Damage to the organs of the upper and lower respiratory system [13]	–	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [44] Damage to the organs of the lower respiratory system [44]	
Кошки Cats	Поражение органов верхнего и нижнего отделов дыхательной системы [13] Damage to the organs of the upper and lower respiratory system [13]	–	Поражение органов верхнего и нижнего отделов дыхательной системы [43] Damage to the organs of the upper and lower respiratory system [43]	
НЧП Non-human primates	Макаки-резусы Rhesus monkeys	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [15] Damage to the organs of the lower respiratory system [15]	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [27–29] Damage to the organs of the lower respiratory system [27–29]	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [47, 49] Damage to the organs of the lower respiratory system [47, 49]

См. окончание табл. 2
See the end of Table 2

Окончание табл. 2.
 End of Table 2

Животное Animal	Обнаруженные адекватные патоморфологические изменения Detected adequate pathomorphological changes		
	SARS	MERS	COVID-19
Африканские зеленые мартышки African Green monkeys	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [15] Damage to the organs of the lower respiratory system [15]	–	–
Макаки-крабоеды Cynomolgus	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [15] Damage to the organs of the lower respiratory system [15]	–	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [47, 49] Damage to the organs of the lower respiratory system [47, 49]
Обыкновенные игрунки Common marmosets	–	Поражение органов нижнего отдела дыхательной системы [30] Damage to the organs of the lower respiratory system [30]	–

клинических признаков и летальностью. Подобными качествами при исследовании MERS обладали hDPP4-трансгенные мыши [24], хотя и макаки-резусы демонстрировали сходную с заболевшими людьми клиническую картину [27, 28], а вырабатываемые ими вируснейтрализующие антитела обеспечивали протективный иммунитет, предотвращая развитие инфекции при повторном заражении [29]. Что касается COVID-19, то можно выделить модели НЧП, особенно макак-резусов и бабуинов [47], продемонстрировавших высокий уровень аналогии клинических проявлений и патогистологической картины с таковыми у заболевших людей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Cherry J.D. The chronology of the 2002–2003 SARS mini pandemic. *Paediatr. Respir. Rev.* 2004; 5(4): 262–9. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2004.07.009>
- Li K., Wohlford-Lenane C.L., Channappanavar R., Park J.E., Earnest J.T., Bair T.B., et al. Mouse-adapted MERS coronavirus causes lethal lung disease in human DPP4 knockin mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017; 114(15): E3119–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619109114>
- Ye Z.W., Yuan S., Yuen K.S., Fung S.Y., Chan C.P., Jin D.Y. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int. J. Biol. Sci.* 2020; 16(10): 1686–97. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45472>
- Decaro N., Martella V., Saif L.J., Buonavoglia C. COVID-19 from veterinary medicine and one health perspectives: What animal coronaviruses have taught us. *Res. Vet. Sci.* 2020; 131: 21–3. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.009>
- Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virology.* 2020; 94(7): e00127-20. <https://doi.org/10.1128/jvi.00127-20>
- Baseler L., de Wit E., Feldmann H. A comparative review of animal models of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Vet. Pathol.* 2016; 53(3): 521–31. <https://doi.org/10.1177/0300985815620845>
- Li W., Zhang C., Sui J., Kuhn J.H., Moore M.J., Luo S., et al. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 2005; 24(8): 1634–43. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600640>
- Wentworth D.E., Gillim-Ross L., Espina N., Bernard K.A. Mice susceptible to SARS coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(7): 1293–6. <https://doi.org/10.3201/eid1007.031119>
- Roberts A., Paddock C., Vogel L., Butler E., Zaki S., Subbarao K. Aged BALB/c mice as a model for increased severity of severe acute respiratory syndrome in elderly humans. *J. Virol.* 2005; 79(9): 5833–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5833-5838.2005>
- McCray P., Pewe L., Wohlford-Lenane C., Hickey M., Manzel L., Shi L., et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 2006; 81(2): 813–21. <https://doi.org/10.1128/JVI.02012-06>
- Tseng C., Huang C., Newman P., Wang N., Narayanan K., Watts D., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor. *J. Virol.* 2006; 81(3): 1162–73. <https://doi.org/10.1128/JVI.01702-06>
- Schaefer S.R., Stabenow J., Oberle C., Schriewer J., Bulter R.M., Sagartz J.E., et al. An immunosuppressed Syrian golden hamster model for SARS-CoV infection. *Virology.* 2008; 380(2): 312–21. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.026>
- Martina B.E., Haagmans B.L., Kuiken T., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F., van Amerongen G., et al. SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature.* 2003; 425(6961): 915. <https://doi.org/10.1038/425915a>
- ter Meulen J., Bakker A.B., van den Brink E.N., Weverling G.J., Martina B.E., Haagmans B.L., et al. Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets. *Lancet.* 2004; 363(9427): 2139–41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16506-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16506-9)
- McAuliffe J., Vogel L., Roberts A., Fahle G., Fischer S., Shieh W.J., et al. Replication of SARS coronavirus administered into the respiratory tract of African Green, rhesus and cynomolgus monkeys. *Virology.* 2004; 330(1): 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.030>

16. Lawler JV, Endy T.P., Hensley L.E., Garrison A., Fritz E.A., Lesar M., et al. Cynomolgus macaque as an animal model for severe acute respiratory syndrome. *PLoS Med.* 2006; 3(5): e149. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030149>
17. van Doremalen N., Miazgowiec K., Milne-Price S., Bushmaker T., Robertson S., Scott D., et al. Host species restriction of middle east respiratory syndrome coronavirus through its receptor, dipeptidyl peptidase 4. *J. Virol.* 2014; 88(16): 9220–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.00676-14>
18. Raj V.S., Smits S.L., Provacia L.B., van den Brand J.M., Wiersma L., Ouwendijk W.J., et al. Adenosine deaminase acts as a natural antagonist for dipeptidyl peptidase 4-mediated entry of the middle east respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 2013; 88(3): 1834–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.02935-13>
19. Coleman C.M., Matthews K.L., Goicochea L., Frieman M.B. Wild-type and innate immune-deficient mice are not susceptible to the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(Pt. 2): 408–12. <https://doi.org/10.1099/vir.0.060640-0>
20. Zhao J., Li K., Wohlford-Lenane C., Agnihothram S.S., Fett C., Zhao J., et al. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(13): 4970–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323279111>
21. Cockrell A.S., Peck K.M., Yount B.L., Agnihothram S.S., Scobey T., Curnes N.R., et al. Mouse dipeptidyl peptidase 4 is not a functional receptor for Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Virol.* 2014; 88(9): 5195–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.03764-13>
22. Cockrell A.S., Yount B., Scobey T., Jensen K., Douglas M., Beall A., et al. A mouse model for MERS coronavirus-induced acute respiratory distress syndrome. *Nat. Microbiol.* 2016; 2(2): 16226. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.226>
23. Agrawal A.S., Garron T., Tao X., Peng B.H., Wakamiya M., Chan T.S., et al. Generation of a transgenic mouse model of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection and disease. *J. Virol.* 2015; 89(7): 3659–70. <https://doi.org/10.1128/JVI.03427-14>
24. Tao X., Garron T., Agrawal A.S., Algaissi A., Peng B.H., Wakamiya M., et al. Characterization and demonstration of the value of a lethal mouse model of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection and disease. *J. Virol.* 2015; 90(1): 57–67. <https://doi.org/10.1128/JVI.02009-15>
25. Enkirch T., von Messling V. Ferret models of viral pathogenesis. *Virology.* 2015; 479-480: 259–70. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2015.03.017>
26. Wong J., Layton D., Wheatley A.K., Kent S.J. Improving immunological insights into the ferret model of human viral infectious disease. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2019; 13(6): 535–46. <https://doi.org/10.1111/irv.12687>
27. Munster V.J., de Wit E., Feldmann H. Pneumonia from human coronavirus in a macaque model. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368(16): 1560–2. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1215691>
28. de Wit E., Rasmussen A.L., Falzarano D., Bushmaker T., Feldmann F., Brining D.L., et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) causes transient lower respiratory tract infection in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(41): 16598–603. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310744110>
29. Yao Y., Bao L., Deng W., Xu L., Li F., Lv Q., et al. An animal model of MERS produced by infection of rhesus macaques with MERS coronavirus. *J. Infect. Dis.* 2013; 209(2): 236–42. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit590>
30. Falzarano D., de Wit E., Feldmann F., Rasmussen A.L., Okumura A., Peng X., et al. Infection with MERS-CoV causes lethal pneumonia in the common marmoset. *PLoS Pathogens.* 2014; 10(8): e1004250. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004250>
31. Sun SH, Chen Q., Gu H.J., Yang G., Wang Y.X., Huang X.Y., et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 2020; 28(1): 124–133.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.020>
32. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020; 395(10224): 565–74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
33. Bao L., Deng W., Huang B., Gao H., Liu J., Ren L., et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature.* 2020; 583(7818): 830–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>
34. Hassan AO, Case J.B., Winkler E.S., Thackray L.B., Kafai N.M., Bailey A.L., et al. A SARS-CoV-2 infection model in mice demonstrates protection by neutralizing antibodies. *Cell.* 2020; 182(3): 744–53.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.011>
35. Israelow B., Song E., Mao T., Lu P., Meir A., Liu F., et al. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *J. Exp. Med.* 2020; 217(12): e20201241. <https://doi.org/10.1101/2020.05.27.118893>
36. Ng S.C., Tilg H. COVID-19 and the gastrointestinal tract: more than meets the eye. *Gut.* 2020; 69(6): 973–4. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321195>
37. Xu Y., Li X., Zhu B., Liang H., Fang C., Gong Y., et al. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat. Med.* 2020; 26(4): 502–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0817-4>
38. Sia S.F., Yan L.M., Chin A.W.H., Fung K., Choy K.T., Wong A.Y.L., et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature.* 2020; 583(7818): 834–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>
39. Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; ciaa325. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
40. Lau S.Y., Wang P., Mok B.W., Zhang A.J., Chu H., Lee A.C., et al. Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 837–42. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1756700>
41. Imai M., Iwatsuki-Horimoto K., Hatta M., Loeber S., Halfmann P.J., Nakajima N., et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020; 117(28): 16587–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009799117>
42. Rogers T.F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W.T., et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science.* 2020; 369(6506): 956–63. <https://doi.org/10.1126/science.abc7520>
43. Shi J., Wen Z., Zhong G., Yang H., Wang C., Huang B., et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science.* 2020; 368(6494): 1016–20. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
44. Kim Y.I., Kim S.G., Kim S.M., Kim E.H., Park S.J., Yu K.M., et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe.* 2020; 27(5): 704–9.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>
45. Park S.J., Yu K.M., Kim Y.I., Kim S.M., Kim E.H., Kim S.G., et al. Antiviral efficacies of FDA-approved drugs against SARS-CoV-2 infection in ferrets. *mBio.* 2020; 11(3): e01114-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01114-20>
46. Melin A.D., Janiak M.C., Marrone F., Arora P.S., Higham J.P. Comparative ACE2 variation and primate COVID-19 risk. *bioRxiv.* 2020; 2020.04.09.034967. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.09.034967>
47. Singh D.K., Ganatra S.R., Singh B., Cole J., Alfson K.J., Clemmons E., et al. SARS-CoV-2 infection leads to acute infection

- with dynamic cellular and inflammatory flux in the lung that varies across nonhuman primate species. *bioRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.06.05.136481>
48. Rockx B., Kuiken T., Herfst S., Bestebroer T., Lamers M.M., Oude Munnink B., et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science*. 2020; 368(6494): 1012–5. <https://doi.org/10.1126/science.abb7314>
49. Lu S., Zhao Y., Yu W., Yang Y., Gao J., Wang J., et al. Comparison of SARS-CoV-2 infections among 3 species of non-human primates. *bioRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.04.08.031807>
50. Bao L., Deng W., Gao H., Xiao C., Liu J., Xue J., et al. Lack of reinfection in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. *bioRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.13.990226>
51. Maisonnasse P., Guedj J., Contreras V., Behillil S., Solas C., Marlin R., et al. Hydroxychloroquine in the treatment and prophylaxis of SARS-CoV-2 infection in non-human primates. *Nature*. 2020; 585(7826): 584–7. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-27223/v1>

Информация об авторах

Нагорных Алексей Михайлович[✉] — к.вет.н., н.с. научной группы разработки экспериментальных моделей лаб. экспериментальной фармакологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8320-2999>.
E-mail: nagornih@cmd.su

Тюменцев Александр Игоревич — к.б.н., зав. лаб. экспериментальной фармакологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>.
E-mail: tymencev@cmd.su

Тюментсева Марина Алексеевна — к.б.н., зав. лаб. геномного редактирования отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>.
E-mail: tyumentseva@cmd.su

Акимкин Василий Геннадиевич — д.м.н., проф., acad. РАН, директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors

Aleksey M. Nagornykh[✉] — Cand. Sci. (Vet.), researcher, Scientific group of experimental models' development, Laboratory of experimental pharmacology, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8320-2999>.
E-mail: nagornih@cmd.su

Aleksander I. Tyumentsev — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental pharmacology, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>.
E-mail: tymencev@cmd.su

Marina A. Tyumentseva — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of genome editing, Department of molecular diagnostics and epidemiology, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>.
E-mail: tyumentseva@cmd.su

Vasily G. Akimkin — D. Sci. (Med.), Professor, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Состояние популяционного иммунитета к кори в России: систематический обзор и метаанализ эпидемиологических исследований

Ноздрачева А.В.[✉], Семенов Т.А.

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия

Введение. Комплексная оценка состояния популяционного иммунитета населения России к кори затруднена, т.к. отечественные работы по указанной тематике, как правило, ограничены изучением серопревалентности в отдельных группах разной численности. Систематический обзор и последующий метаанализ результатов работ разных авторов позволяют увеличить общий объем наблюдений и статистическую значимость исследований, что повышает достоверность выводов.

Цель работы — оценка состояния популяционного иммунитета населения России к кори на основании анализа результатов опубликованных научных работ отечественных авторов.

Материалы и методы. Проведен систематический обзор и метаанализ результатов 13 отечественных научных работ (обследовано 15 353 лица в возрасте от рождения до 79 лет), опубликованных в период с 2011 по 2020 г. и посвященных оценке состояния популяционного иммунитета к кори у населения разных регионов России.

Результаты. Установлено, что при проведении исследований основным подходом к оценке популяционного иммунитета является обследование взрослых лиц, в том числе медицинских работников, без учета прививочного анамнеза. Доля серонегативных среди лиц молодого возраста (18–30 лет) — 27,3% (95% ДИ 25,7–27,3%) и детей до 17 лет — 38,3% (95% ДИ 35,8–40,8%), родившихся после введения двукратного режима вакцинации в Национальный календарь профилактических прививок, была больше, чем в старших возрастных группах — 19,8% (95% ДИ 17,8–21,8%). Уровень коллективного иммунитета у медицинских работников как декретированного контингента — 84,5% (95% ДИ 83,7–85,3%) — оказался выше, чем среди условно здорового населения — 75,4% (95% ДИ 74,1–76,6%), что связано с более жесткими требованиями к проведению вакцинации.

Заключение. Наличие значительной доли серонегативных лиц среди детей и молодых взрослых до 30 лет в пределах, показанных в работе, является фактором риска распространения вируса кори среди населения и может быть следствием недостаточного охвата вакцинацией.

Ключевые слова: популяционный иммунитет; корь; систематический обзор; метаанализ.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Ноздрачева А.В., Семенов Т.А. Состояние популяционного иммунитета к кори в России: систематический обзор и метаанализ эпидемиологических исследований. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(5): 445–457.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-7>

Поступила 13.06.2020
Принята в печать 25.06.2020

The status of herd immunity to measles in Russia: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies

Anna V. Nozdracheva[✉], Tatiana A. Semenenko

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia

Introduction. The comprehensive assessment of the herd immunity to measles in Russia can be challenging, as Russian subject-related studies tend to focus on seroprevalence in various cohorts of different sizes. The systematic review and subsequent meta-analysis of different research findings increase the total number of observations and statistical significance of the studies, thus enhancing the reliability of conclusions. The **purpose** of the study is to assess the status of herd immunity to measles in Russia by analyzing the findings of studies published by Russian researchers.

Materials and methods. The conducted systematic review and meta-analysis covered 13 Russian studies (the total number of the examined was 15,353, from birth to 79 years of age) published in 2011–2020 and addressing the assessment of herd immunity to measles in population of different regions in Russia.

Results. It was found that the principal approach in all the studies was assessment of herd immunity through examination of adult people, including healthcare workers, with no regard for their vaccination history. The proportion of seronegative cases among young people (18–30 years) — 27.3% (95% CI 25.7–27.3%) and among children under 17 — 38.3% (95% CI 35.8–40.8%), who were born after the two-time vaccination had been included in the National Immunization Calendar, was larger than in older age groups — 19.8% (95% CI 17.8–21.8%). The level of herd immunity among healthcare workers representing a decreed group — 84.5% (95% CI 83.7–85.3%) was higher than that of relatively healthy population — 75.4% (95% CI 74.1–76.6%), which can be explained by stricter vaccination requirements.

Conclusion. The high proportion of seronegative cases among children and young adults of under 30 years of age is a risk factor associated with measles spread among the population and can be seen as the result of insufficient vaccination coverage.

Keywords: herd immunity; measles; systematic review; meta-analysis.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Nozdracheva A.V., Semenenko T.A. The status of herd immunity to measles in Russia: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 445–457. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-7>

Received 13 June 2020

Accepted 25 June 2020

Введение

Проблемы профилактики инфекционных заболеваний, в том числе управляемых с помощью вакцинации, не теряют актуальности. До начала иммунизации корь была одной из наиболее распространенных инфекций детей, которые в возрасте до 6 лет переболели корью в 80% случаев. По данным ВОЗ, крупные эпидемии кори происходили каждые 2–3 года, ежегодно насчитывалось 2,6 млн случаев летальных исходов [1, 2].

После введения в Национальный календарь профилактических прививок России вакцинации против этой инфекции (1968 г.) заболеваемость населения, а также смертность от нее стали планомерно снижаться [3–5]. Успех реализации программы массовой иммунизации против кори был связан с формированием высокого уровня популяционного (коллективного) иммунитета (ПИ) за счет увеличения доли иммунных к инфекции лиц в результате проведенной вакцинации [6, 7]. ПИ — это состояние приобретенной специфической защищенности населения, слагающееся из иммунитета индивидуумов, входящих в данную популяцию, сформированного за счет перенесенной инфекции или вакцинопрофилактики [8, 9]. Возможность элиминации кори под действием вакцинации населения была подтверждена теоретическими данными, а также кардинальными изменениями проявлений ее эпидемического процесса, что позволило ВОЗ провозгласить Программу элиминации кори в пяти регионах мира к 2010 г. [10, 11]. При этом одним из основных факторов риска распространения инфекции в будущем является изменение (снижение) коллективной иммунологической защищенности населения в отношении вируса кори [12–14].

Актуальность оценки состояния ПИ в отношении кори как основного фактора, препятствующего распространению инфекции, диктуется необходимостью разрешения противоречий, сложившихся в современной эпидемиологической ситуации по этой инфекции. Так, на фоне высоких показателей охвата вакцинацией (более 90%) с 2010 г. стали регистрировать подъемы заболеваемости корью во многих странах мира (в Северной и Южной Америке, Африке, Европе), в том числе в России и на постсоветском пространстве. Несмотря на реализацию широкого комплекса дополнительных профилактических мероприятий, в том числе по вакцинации ранее не охваченного населения, в 2019 г. по-прежнему отмечался рост показателя заболеваемости корью [15].

Для оценки ПИ используют лабораторные методы серологического контроля, позволяющие рассчитать долю серонегативных (не иммунных) и серопозитивных (иммунных) к ее возбудителю лиц [16]. Деление группы обследованных на серонегативных и серопозитивных к вирусу кори осуществляется на основании соответствия/несоответствия результатов индивидуального серологического обследования пороговым уровням, указанным производителями используемых для лабораторной диагностики тест-систем¹.

Таким образом, сероэпидемиологические исследования являются инструментом оценки риска

¹ МУ 3.1.2943-11 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)» (утв. 15.07.2011). URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200088401>

распространения инфекционных заболеваний и контроля эффективности программ специфической профилактики. Научная ценность и практическая значимость таких исследований общепризнана. Широкое распространение получили научные работы по оценке уровня ПИ населения к управляемым инфекциям на основе скрининговых исследований по материалам национальных банков сыворотки крови [17–19]. Использование такого подхода позволяет сформировать репрезентативную выборку достаточной численности, что является необходимым критерием для достижения приемлемой статистической достоверности результатов исследований. В настоящее время комплексная оценка состояния ПИ населения России затруднена, т.к. отечественные работы по указанной тематике, как правило, ограничены отдельными группами с определенной эпидемиологической значимостью. Например, медицинские работники (МР) являются группой риска по заболеваемости многими инфекциями, в том числе корью, в связи с чем для них предусмотрены более жесткие требования к вакцинации (согласно Национальному календарю профилактических прививок все лица данной профессиональной группы в возрасте до 55 лет должны быть вакцинированы против кори²).

Еще одной группой риска инфицирования являются пациенты стационаров, которые могут быть источником заражения для МР, а также рискуют быть вовлеченными в эпидемический процесс кори после контакта с заболевшим МР. Кроме того, наличие хронических заболеваний в некоторых случаях является противопоказанием для вакцинации против кори, а также влечет за собой риск более тяжелого течения заболевания при заражении. Таким образом, исследование состояния коллективного иммунитета МР и пациентов стационаров позволяет оценить риск внутрибольничного распространения кори.

Группами, подверженными высокому риску развития осложнений в случае заболевания корью, являются беременные женщины и дети до года, не достигшие прививочного возраста. Изучение состояния коллективного иммунитета этих групп позволяет оценить риск роста заболеваемости среди детей раннего возраста.

Однако оценка ПИ не исчерпывается исследованием групп риска и должна включать исследование иммунологической защищенности разных возрастных групп условно здорового населения (УЗН). При этом достоверность серологических ис-

следований повышается при включении как можно большего числа групп населения и увеличении численности обследованных лиц в каждой из них, что является трудной задачей для отдельных научных коллективов. В этой связи систематический обзор и последующий метаанализ результатов научных работ разных авторов позволяют увеличить общий объем наблюдений и статистическую мощность исследований, а значит, повысить достоверность оценки [20, 21].

Цель исследования — оценка состояния ПИ населения России к вирусу кори на основании анализа результатов опубликованных научных работ отечественных авторов.

Материалы и методы

Систематический обзор включал только отечественные научные работы, посвященные оценке состояния ПИ к вирусу кори у населения России, и был проведен в соответствии с письменным протоколом, включавшим определенную последовательность операций при сборе данных (**рисунок**).

Первичный поиск научных работ проводился по ключевым словам («коллективный иммунитет», «популяционный иммунитет») в период с 26.04.2020 г. по 30.04.2020 г. в соответствии со следующими стратегиями:

- в научной электронной библиотеке eLibrary;
- при помощи ручного поиска в архивах выпусков российских журналов, имеющих рубрику «Эпидемиология» («Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии», «Эпидемиология и вакцинопрофилактика», «Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы», «Инфекция и иммунитет», «Вестник Российской академии наук»);
- в обзорах библиографий опубликованных статей, соответствующих критериям репрезентативности.

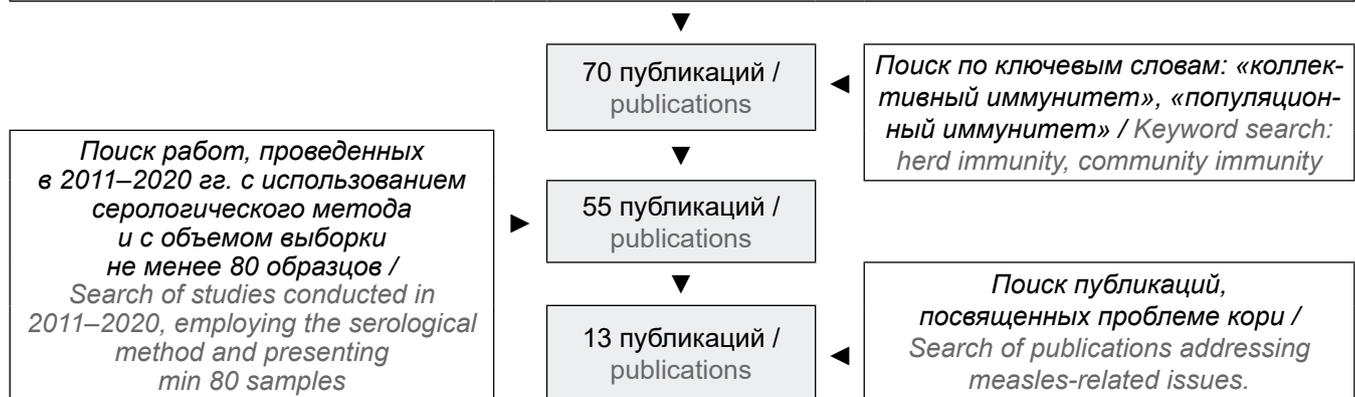
Исходный список научных статей после удаления дубликатов включал 70 публикаций соответствующей тематики. На следующем этапе из него были удалены публикации, не отвечающие критериям включения в исследование, перечисленным на рисунке. Таким образом был сформирован перечень из 13 научных работ [26–38], посвященных оценке состояния ПИ к вирусу кори с использованием серологического метода, опубликованных в период с 2011 по 2020 г.

Исследования были проведены среди населения следующих территорий: г. Москва, г. Санкт-Петербург, Республика Татарстан, Республика Бурятия, г. Петрозаводск, г. Самара, г. Пермь, Тверская область.

На следующем этапе исследования вся релевантная информация о дизайне исследований и

² Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21.03.2014 № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям».
URL: <http://docs.cntd.ru/document/499086215>

1. Научная электронная библиотека eLibrary / Electronic research library.
2. Архивы выпусков российских журналов, имеющих рубрику «Эпидемиология» (ручной поиск) / Archives of Russian journal issues on epidemiology (manual retrieval).
3. Библиографии опубликованных статей, соответствующих критериям преемственности / Bibliographies from published articles meeting the continuity criteria.



Протокол сбора научных работ, посвященных оценке состояния ПИ населения к вирусу кори
 (курсивом выделены критерии включения в исследование).

The protocol of collection of research studies addressing assessment of the population's herd immunity to the measles virus
 (the criteria for study entry are italicized).

контингентах обследованных лиц была сведена в **табл. 1**. Всего при проведении 13 научных исследований было обследовано 15 353 лица в возрасте от рождения до 79 лет. Наименьшее количество участников в исследовании — 80 человек, наибольшее — 4444 человека.

Из представленных научных работ были извлечены данные об особенностях подходов и критериях отбора лиц при проведении серологических исследований, а также о доле распределения серонегативных лиц в разных возрастных группах населения. Для обобщения и анализа этих данных был использован метаанализ.

Методы устранения смещения данных при проведении метаанализа

Для предотвращения публикационного смещения (некоторые результаты, не имеющие, по мнению исследователей, научной ценности или статистической значимости, не указываются в разделе «Результаты исследования») из научных работ была извлечена только та информация, которая присутствовала в каждой работе. Для исключения случаев смещения (bias) и пропуска данных (например, в случае различия критериев деления всех обследованных лиц на возрастные группы) недостающая информация была восполнена при помощи математических расчетов на основе исходных значений, указанных в разделе «Материалы и методы».

Таким образом, для метаанализа использованы следующие переменные:

- возраст обследованных лиц;
- наличие у них данных о предшествующей вакцинации против кори;

- распределение серонегативных и серопозитивных лиц в группах.

Критерии объединения данных

Результаты, представленные в научных работах, были однородны методологически (оценивалось доленое распределение серонегативных и серопозитивных лиц среди обследованных) и статистически (представлены в виде среднего значения и его стандартного отклонения или 95% доверительного интервала), что дало основание для их объединения и проведения метаанализа, согласно методике, подробно изложенной в руководстве по медицинской статистике [20].

Статистические методы обработки результатов метаанализа

При проведении метаанализа использован пакет прикладных программ «Statistica 12.0» («StatSoft») с учетом соответствующих методических рекомендаций по статистической обработке результатов исследования [21]. Рассчитаны средняя доля серонегативных лиц среди обследованных и ее 95% доверительный интервал (ДИ). Значимость различий в группах определяли при использовании *t*-критерия Стьюдента с достоверностью 95% и выше ($p \leq 0,05$).

Результаты исследования

Анализ подходов к организации серологических исследований

Обследованные контингенты. По результатам исследования установлено, что приоритетным направлением изучения ПИ к вирусу кори является оценка долевого распределения серонегативных и

Таблица 1. Общие сведения об обследованных лицах по данным 13 отечественных научных работ, опубликованных в 2011–2020 гг. и посвященных оценке состояния ПИ к вирусу кори у населения разных регионов России

Table 1. General information about the examined individuals according to the data of 13 Russian research articles published in 2011–2020 and addressing assessment of measles-related HI of residents of different regions in Russia

Параметр Parameter	Число работ в соответствии с критериями отбора лиц при проведении серологических исследований Number of studies in compliance with the selection criteria applicable to individuals participating in serological studies	Число обследованных Number of the examined	
		абс. / abs.	%
Возраст / Age			
Новорожденные Infants	2	898	5,8
Дети дошкольного возраста Preschool children	3	829	5,4
Дети/подростки (7–17 лет) Children/adolescents (7–17 years)	2	714	4,7
Взрослые 18–60 лет Adults 18–60 years	12	11 571	75,4
Старше 60 лет Over 60 years	6	1341	8,7
Контингенты / Cohort			
МР Healthcare workers	8	7450	48,5
Пациенты стационаров Inpatients	1	80	0,5
Пары новорожденный–мать Mother–newborn pairs	2	898	5,9
УЗН Relatively healthy population	6	6925	45,1
Прививочный анамнез обследованных лиц / Vaccination history of the examined			
Наличие прививочного анамнеза Availability of vaccination history	5	4000	26,1
Отсутствие прививочного анамнеза Absence of vaccination history	8	11 353	73,9
Серологические методы исследования / Serological methods of study			
Иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using test systems manufactured by <i>Vector-Best, CJSC</i>	13	11 570	75,4
из них «cut off» для положительных образцов out of them, the cut-offs for positive samples			
≥0,18 МЕ/мл ≥0.18 IU/ml	11	10 162	87,8
≥0,2 МЕ/мл ≥0.2 IU/ml	2	1408	12,2
Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) Passive hemagglutination assay	1	3783	24,6
Всего Total	13	15 353	100

иммунных лиц в группе МР (48,5% в структуре обследованных лиц), среди УЗН (45,1%), а также новорожденных и их матерей (5,9%) (табл. 1). Выбор указанных групп определялся особенностями современного эпидемического процесса кори: вовлечени-

ем МР и пациентов стационаров с формированием вспышечной заболеваемости на территории лечебно-профилактических организаций и интенсивным ростом заболеваемости среди детей раннего возраста (до 2 лет). При этом исследования коллективного

иммунитета детского населения (не включая новорожденных) немногочисленны (такие данные встретились в 3 из 13 исследований). Состояние иммунологической защищенности в отношении вируса кори у новорожденных детей (доля которых составила 5,8% в возрастной структуре обследованных лиц) оценивалось при помощи серологического исследования образцов сыворотки пуповинной крови. Наиболее часто в исследование были вовлечены взрослые лица в возрасте 18–60 лет (75,4% обследованных).

Методы серологических исследований. В России основным методом лабораторного исследования сывороточного материала является ИФА с использованием тест-систем отечественного производства (ЗАО «Вектор-Бест»), при этом в большинстве работ минимальным положительным уровнем антител считался 0,18 МЕ/мл (в двух работах — 0,2 МЕ/мл). Только в работе М.А. Белополюской и соавт. [32] были использованы два метода серологического исследования: ИФА (661 образец) и реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) (3783 образца). При постановке РПГА (с применением наборов реагентов отечественного производства) минимальным положительным титром антител считался 1 : 10. При этом средние доли серопозитивных среди обследованных лиц, рассчитанные по результатам использования двух указанных методов исследования, составили 75,3% (ИФА) и 85,0% (РПГА).

Статистический анализ данных. Исследования, посвященные оценке коллективного иммунитета УЗН, беременных женщин и новорожденных детей, были рандомизированными. Отбор образцов сыворотки крови производился при амбулаторном посещении поликлиник обследованными лицами, а также в рамках их диспансерного наблюдения. Группы МР были сформированы по признаку работы в лечебно-профилактических организациях, где проводилось исследование. Вопросы соответствия проведенных исследований российскому законодательству в области защиты персональных данных, в том числе подписания участниками исследования информированного добровольного согласия на участие в нем, а также критерии включения (исключения) в исследование освещены только в двух работах [36, 38].

Статистическая обработка полученных результатов в основном проводилась с помощью программы Microsoft Office Excel, в 6 случаях были использованы специализированные пакеты прикладных программ («Биостат» IBM, SPSS 96 Statistics 11.0, Statistica). Долевое распределение серонегативных и серопозитивных к вирусу кори лиц представлено в виде процентного значения, а также его стандартного отклонения или 95% ДИ. При этом определение законов распределения переменных, являющееся критерием выбора параметрических и непараметрических критериев оценки, было проведено только в

одной работе (результаты исследования представлены в виде среднего значения и его 95% ДИ) [38].

Прививочный и инфекционный статус обследованных лиц

В анализируемых научных работах представлены два подхода к проведению исследования состояния ПИ: при помощи обследования лиц с известным прививочным анамнезом и без его учета. При проведении исследований с использованием образцов сывороток крови от взрослых лиц с известным прививочным анамнезом принципиальное значение имеет надежность источников получения медицинских данных по этому вопросу. Достоверной информацией является только запись в индивидуальной учетной форме амбулаторного пациента о дате вакцинации, серии и дозе использованной вакцины. Наиболее информативным в этом отношении является обследование МР как декретированного контингента, которые согласно действующему законодательству в обязательном порядке должны быть привиты против кори в возрасте до 55 лет. Получение достоверных данных о прививочном статусе обследованных лиц в ряде случаев является затруднительным, в связи с чем исследователи прибегают к использованию альтернативных методов получения информации (анкетирование и опрос). По результатам исследований, рассчитанный таким образом охват вакцинацией МР варьировал от 20,9% [29] до 92,5% [31] (табл. 2).

В отношении прочих групп населения (для которых предусмотрена вакцинация против кори в возрасте до 35 лет) данные о прививочном анамнезе обследованных лиц формировались из трех источников: запись в карте амбулаторного пациента, анамнестические сведения, данные официальной статистики об охвате детского населения профилактическими прививками на момент достижения обследованными лицами 12 мес и 6 лет (возраста первого и второго введения вакцины). В связи с трудностями получения достоверной информации в 8 из 13 научных работ (73,9% от числа всех обследованных) серологическое исследование состояния ПИ к вирусу кори проводилось без учета прививочного анамнеза обследованных лиц. Четыре из 5 работ, в которых фигурировали данные о прививочном и инфекционном анамнезе обследованных лиц, были посвящены оценке уровня коллективного иммунитета МР. В исследовании [36] охват вакцинацией (58,8%) оценивался только у выявленных по его результатам серонегативных лиц (68%) среди УЗН.

Анализ состояния популяционного иммунитета

Условно здоровое население. По результатам научных работ, доля серонегативных лиц среди УЗН до 60 лет варьировала в пределах от 23,4% [35] до 29,0% (95% ДИ 26,3–31,8%) [38] (табл. 3). В бо-

Таблица 2. Результаты серологического обследования МР по данным научных работ
Table 2. Results of the serological examination of HCWs, based on data from research articles

Год и место проведения исследования Year and place of the study	Источник Source	Контингент Cohort	Число обследованных лиц Number of the examined	Возраст, лет Age, years	Охват вакцинацией ¹ , % Vaccination coverage ¹ , %	Средняя доля серонегативных лиц ² , % Average proportion of seronegative cases ² , %	Возрастная группа с максимальной долей серонегативных лиц Age group with the highest proportion of seronegative cases	
							возраст, лет age, years	%
2011, Пермь / Perm	[31]	МР Healthcare workers	896	18–56	18–35 лет / years 92,5	13,7 ± 1,1	18–35	19,3
2011, Республика Бурятия Republic of Buryatia	[37]	МР Healthcare workers	200	18–65	Не известен Unavailable	5,0	18–29	8,9
2011, Тверская область / Tver Region			393			18,6	18–29	22,9
2015–2017, Республика Татарстан Republic of Tatarstan	[26]	МР Healthcare workers	480	18–60	84,38 ± 1,66	36,03 ± 2,4	20–29	47,0
2018, Москва / Moscow	[34]	Студенты медицинских вузов и колледжей Medical students	619	18–22		45,07 ± 3,0		
2018, Санкт-Петербург St. Petersburg	[32]	МР Healthcare workers	2077	18–65	Не известен Unavailable	9,1	До 14	26,1
Год не указан, Самара The year is not specified, Samara	[30]	МР Healthcare workers	1503	18–79	77,58	27,5	18–25	52,3
Не указано / Not specified	[28]	Пациенты листа ожидания трансплантации легких Patients from the lung transplant waiting list	80	17–65	Не известен Unavailable	16,3	17–30	22,2–28,6
2014, 2016, 2018, 2019, Петрозаводск / Petrozavodsk	[29]	МР и пациенты поликлиник ³ Healthcare workers and outpatients ³	402	36–71	20,9 ⁴	12,7	36–50	22,6

Примечание. ¹Охват вакцинацией был оценен исследователями при суммировании данных медицинской документации, анкетирования и опроса.

²Средняя доля серонегативных представлена в формате, использованном в литературном источнике (только среднее значение и стандартное отклонение или 95% ДИ).

³Пациенты поликлиник рассматривались в работе как УЗН.

⁴Охват вакцинацией рассчитан только с использованием сведений медицинской документации.

Note. ¹The vaccination coverage was estimated by summarizing data from medical documentation, questionnaires and surveys.

²The average proportion of seronegative cases is presented in the format used in the source articles (only the average value and standard deviation or 95% CI).

³Outpatients were seen as RHP.

⁴The vaccination coverage is estimated only by using data from medical documentation.

Таблица 3. Результаты серологического обследования УЗН по данным научных работ
Table 3. Results of the serological examination of RHP, based on data from research articles

Год и место проведения исследования Year and place of the study	Источник Source	Контингент Cohort	Число обследованных лиц Number of the examined	Возраст, лет Age, years	Охват вакцинацией, % Vaccination coverage, %	Средняя доля серонегативных лиц ² , % Average proportion of seronegative cases ² , %	Возрастная группа с максимальной долей серонегативных лиц Age group with the highest proportion of seronegative cases	
							возраст, лет age, years	%
2011–2012, Москва Moscow	[34]	Роженицы (пуповинная кровь) Maternity patients (umbilical cord blood)	672	16–43	Не известен Unavailable	20,1	16–35	25,0
Год не указан, Москва и Московская область The year is not specified, Moscow and Moscow Region	[33]	Роженицы Maternity patients Новорожденные дети Infants	226 226	15–44	Не известен Unavailable	26,1 ± 2,9 21,7 ± 2,7	15–23	36,8
2018, Москва и Московская область Moscow and Moscow Region	[35]	Условно здоровые женщины Relatively healthy females	149	15–44	Не известен Unavailable	22,1 ± 3,4		
2019, разные регионы России different regions of Russia	[36]	УЗН Relatively healthy population	100	19–30	58,8% ¹	68,0	1–2 18–30	41,8 45,3
2016–2017, Москва Moscow	[38]	УЗН Relatively healthy population	2410	0–17 18–60	Не известен Unavailable	38,8 (35,5–41,1) 29,0 (26,3–31,8)	1–2 18–19	51,0 40,4
2018, Санкт-Петербург St. Petersburg	[32]	Пациенты поликлиник Outpatients	2367	0–65	Не известен Unavailable	28,1	<14 18–25	26,1 52,3

Примечание. ¹Охват вакцинацией рассчитан только среди выявленных серонегативных лиц.

²Средняя доля серонегативных (без учета детей до года) представлена в формате, использованном в литературном источнике (только среднее значение, среднее значение и стандартное отклонение или 95% ДИ).

Note. ¹The vaccination coverage is estimated only among the identified seronegative cases.

²The average proportion of seronegative cases (not including infants under one year of age) is presented in the format used in the source articles (only the average value, the average value and standard deviation or 95% CI).

лее узком возрастном диапазоне (до 43–44 лет) этот показатель варьировал в пределах от 20,1% [34] до 26,1 ± 2,9% [33].

Все авторы анализируемых нами исследований получили результаты, свидетельствующие об увеличении доли серонегативных среди лиц молодого возраста (до 30 лет), которые родились после введения двукратного режима вакцинации в Национальный календарь профилактических прививок. Максимальные доли серонегативных выявлены среди наиболее молодых лиц, участвовавших в каждом из исследований (табл. 3).

В среднем при метаанализе результатов научных работ выявлено 27,3% (95% ДИ 25,7–27,3%) серонегативных лиц среди обследованных в возрасте 18–30 лет и 19,8% (95% ДИ 17,8–21,8%) — в группе 31–70 лет (табл. 4). В 5 работах с помощью непараметрического коэффициента Спирмена и критерия Смирнова показано наличие отрицательной корреляционной связи между возрастом обследованных лиц и долей серонегативных среди них. Таким образом, средний уровень популяционного иммунитета (доля иммунных лиц) среди взрослого населения России составил 75,4% (95% ДИ 74,1–76,6%).

Для оценки эффективности вакцинопрофилактики важное значение имеет распределение серонегативных лиц среди детского населения, коллективный иммунитет которого в основном сформировался под воздействием вакцинации. По результатам метаанализа, доля таких лиц среди детей до 17 лет была статистически достоверно ($p \leq 0,05$) больше, чем среди взрослого населения страны (24,6%; 95% ДИ 23,4–25,9%) и составила в среднем 38,3% (95% ДИ 35,8–40,8%). При этом группой риска по заболеваемости корью являются дети наиболее раннего возраста, среди которых частота встречаемости серонегативных лиц была максимальной. Так, в группе детей от года до 2 лет, по данным А.П. Топтыгиной и соавт. [35], в 2018 г. было выявлено 41,8% серонегативных лиц, а по данным Т.А. Семененко и соавт. [38] в 2019 г. — 51%. По результатам метаанализа установлено, что среди новорожденных детей доля серонегативных лиц составила 20,5% (95% ДИ 17,9–23,3%), что было меньше, чем среди их

матерей [33, 34] и УЗН разных возрастных групп. Подобные данные встречаются и в других работах [22, 23]. Объяснением таких результатов являются особенности трансплацентарного транспорта IgG [24, 25].

Медицинские работники. Восемь из 13 научных работ посвящены оценке уровня коллективного иммунитета у МР. Возраст лиц, включенных в исследования, варьировал от 20 до 76 лет. По результатам разных авторов, доля серонегативных лиц среди МР варьировала в широких пределах — от 5% [37] до 36,03 ± 2,4% [26] (табл. 2).

Различия в охвате вакцинацией МР ожидаемо отразились на результатах серологических исследований. Так, при малом охвате вакцинацией МР (20,9%) [29] средняя доля серонегативных лиц была больше (22,6% в группе 36–50 лет), чем в исследовании [31], где уровень охвата вакцинацией был достаточно высоким (92,5%), и средняя доля серонегативных лиц составила 13,7 ± 1,1%. Среди достоверно привитых МР было выявлено 34,16% серонегативных лиц (в возрасте 18–55 лет) [30] и 19,3 ± 4,3% лиц с отсутствием антител (в возрасте 18–35 лет) [31]. При этом, как и среди УЗН, все исследователи отмечают преобладание неиммунных лиц в наиболее молодых возрастных группах МР. По данным метаанализа выявлено 12,7% (95% ДИ 11,9–13,6%) серонегативных лиц среди МР в возрасте 31–70 лет и 22,7% (95% ДИ 21,0–24,5%) — в возрасте 18–30 лет (табл. 4).

В среднем уровень коллективного иммунитета МР как декретированной группы был статистически достоверно ($p \leq 0,05$) выше (доля иммунных составила 84,5%; 95% ДИ 83,7–85,3%), чем среди УЗН (75,4%; 95% ДИ 74,1–76,6%).

Данные о состоянии специфического гуморального иммунитета к кори у больных с патологией соматического профиля в нашем исследовании обнаружены только в работе [28], где приведены результаты обследования пациентов листа ожидания трансплантации легких. Полученные результаты соответствовали значениям, установленным другими исследователями в группе МР (средняя доля серонегативных составила 16,3% и варьировала в

Таблица 4. Долевое распределение серонегативных лиц в разных возрастных группах УЗН и МР
Table 4. Percentage distribution of seronegative cases in different age groups of RHP and HCWs

Группа Group	Доля лиц, серонегативных к вирусу кори, % (95% ДИ) The proportion of people seronegative to the measles virus, % (95% CI)		
	18–30 лет / years	31–70 лет / years	всего total
УЗН Relatively healthy population	27,3 (25,7–27,3)	19,8 (17,8–21,8)	24,6 (23,4–25,9)
МР Healthcare workers	22,7 (21,0–24,5)	12,7 (11,9–13,6)	15,5 (14,7–16,3)

группе 17–30 лет от 22,2 до 28,6%). Однако численность лиц, участвовавших в исследовании (80 человек), не позволила провести статистически достоверное сравнение состояния иммунологической восприимчивости к вирусу кори у пациентов листа ожидания трансплантации и других контингентов.

Обсуждение

Проведенный систематический обзор работ, посвященных оценке состояния ПИ населения России в отношении кори, показал необходимость унификации и стандартизации подходов. В первую очередь это касается раздела «Материалы и методы исследования», в котором должного освещения не получили вопросы этического и нормативного характера, а также процедура и критерии включения (исключения) обследованных лиц в исследование. Кроме того, значительную вариабельность имели критерии деления обследованных лиц на возрастные группы, что в значительной мере затруднило сравнение результатов, полученных разными авторами. На наш взгляд, приемлемым вариантом решения этой проблемы могло быть деление обследованных лиц на возрастные группы в соответствии с историей вакцинопрофилактики (выделение групп лиц, родившихся до начала вакцинации против кори, во время однократного и двукратного режимов введения вакцины) и Национальным календарем профилактических прививок (до 35 лет должны быть вакцинированы все взрослые, до 55 лет — все МР).

Подходы, связанные с оценкой прививочного статуса обследованных, коллективного иммунитета привитых и не привитых лиц, также нуждаются в систематизации. Выявление значительной доли серонегативных лиц среди достоверно привитых настораживает и требует выяснения причин подобного неблагоприятия. Кроме того, имеет принципиальное значение качество исходной информации о прививочном анамнезе обследованных лиц. По нашему мнению, приемлемой достоверностью обладают только те данные, которые были получены исследователями при анализе записей о введении вакцины в медицинских индивидуальных формах учета. Иные источники информации (анамнестические сведения, данные официальной статистики об охвате вакцинацией декретированных возрастных групп) могут носить лишь справочный характер. Однако даже с учетом анамнестических сведений о прививочном и инфекционном статусе охват МР вакцинацией был больше 90% только в одном исследовании [31]. В работе [29] указано, что достоверные сведения о вакцинации получены только у 20,9% МР. Такие данные свидетельствуют о проблемах в организации вакцинопрофилактики, а именно учете привитых и подлежащих вакцинации лиц, что снижает достоверность официальной статистической информации об охвате населения

профилактическими прививками. В целом коллективный иммунитет МР (доля иммунных лиц составила 84,5%; 95% ДИ 83,7–85,3%) оказался выше, чем УЗН (75,4%; 95% ДИ 74,1–76,6%), что связано с более жесткими требованиями к вакцинации.

О существовании проблем в организации и проведении вакцинопрофилактики кори свидетельствуют и результаты оценки ПИ среди УЗН разных возрастных групп. Так, по результатам исследования, наибольшая доля серонегативных к вирусу кори лиц была выявлена среди детей, для которых предусмотрено первое введение вакцины (в возрасте от года до 2 лет). В среднем уровень коллективного иммунитета детского населения (доля «серонегативных» лиц составила 38,3%; 95% ДИ 35,8–40,8%), сформированного в основном под воздействием вакцинации, оказался ниже, чем взрослого населения (доля «серонегативных» лиц составила 24,6%; 95% ДИ 23,4–25,9%). При этом среди взрослых (18–30 лет), родившихся после введения в Национальный календарь профилактических прививок двукратного режима вакцинации, доля иммунных лиц (72,7%; 95% ДИ 72,7–74,3%) была достоверно ($p \leq 0,05$) меньше, чем в более старших (31–70 лет) возрастных группах (80,2%; 95% ДИ 78,2–82,2%).

Таким образом, метаанализ результатов научных работ показал, что доля иммунных к вирусу кори лиц среди населения России в среднем составила 75,4%; 95% ДИ 74,1–76,6%. Наличие значительной доли серонегативных лиц среди детей и молодых взрослых до 30 лет в пределах, показанных в работе, является фактором риска распространения кори среди населения и может быть следствием недостаточного охвата вакцинацией. В таких условиях целесообразным является подход к оценке ПИ населения без учета прививочного анамнеза обследованных лиц, который применялся большинством авторов научных работ.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Fact sheets. Measles. Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/measles> (Accessed 12.06.2020)
2. Богомолов Б.П. *Инфекционные болезни: Учебник*. М.: МГУ; 2006.
3. Болотовский В.М., Михеева И.В., Лыткина И.Н., Шаханина И.Л. *Корь, краснуха, эпидемический паротит: единая система управления эпидемическими процессами*. М.: Боргес; 2004.
4. Русакова Е.В., Семенов Т.А., Шапошников А.А., Тедеева Л.У., Щербаков А.Г. Научные аспекты ликвидации кори в общей проблеме биологической безопасности. *Медицина катастроф*. 2013; (1): 40-3.
5. Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Тихонова Н.Т., Тураева Н.В., Пименова А.С. Структура заболевших корью в период элиминации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012; (2): 21-6.
6. Таточенко В.К., Озерецковский В.К. *Иммунопрофилактика-2018: Справочник*. М.: Боргес; 2018.

7. Фельдблюм И.В. Эпидемиологический надзор за вакцинопрофилактикой. *МедиАль*. 2014; (3): 37-55.
8. Thompson K.M. Evolution and use of dynamic transmission models for measles and rubella risk and policy analysis. *Risk Anal*. 2016; 36(7): 1383-403. DOI: <http://doi.org/10.1111/risa.12637>
9. Fine P., Eames K., Heymann D.L. «Herd immunity»: a rough guide. *Clin. Infect. Dis*. 2011; 52(7): 911-6. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/cir007>
10. Алешкин В.А., Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г., Цвиркун О.В., Шульга С.В., Ежлова Е.Б. и др. Проблемы на пути достижения элиминации кори в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 93(5): 29-34. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-5-29-34>
11. Цвиркун О.В., Дедков В.В. Математическое обоснование возможности элиминации кори в России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2009; (1): 30-5.
12. Брико Н.И., Зуева Л.П., Покровский В.И., Сергиев В.П., Шкарин В.В. *Эпидемиология: Учебник*. М.: МИА; 2013.
13. Черкасский Б.Л. *Риск в эпидемиологии*. М.: Практическая медицина; 2007.
14. Симонова Е.Г., Сергеев В.И. Предэпидемическая диагностика в системе риск-ориентированного эпидемиологического надзора над инфекционными болезнями. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(5): 31-7. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-31-37>
15. WHO. Measles and Rubella Surveillance Data. Available at: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/active/measles_monthlydata/en/ (Accessed 24.04.2020)
16. Семенов Т.А., Акимкин В.Г. Серозидемиологические исследования в системе надзора за вакциноуправляемыми инфекциями. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 95(2): 87-94. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-2-87-94>
17. Семенов Т.А., Ананьина Ю.В., Боев Б.В., Гинцбург А.Л. Банки биологических ресурсов в системе фундаментальных эпидемиологических и клинических исследований. *Вестник Российской академии наук*. 2011; (10): 5-9.
18. Plans P. New preventive strategy to eliminate measles, mumps and rubella from Europe based on the serological assessment of herd immunity levels in the population. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2013; 32(7): 961-6. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10096-013-1836-6>
19. Kafatos G., Andrews N., McConway K.J., Anastassopoulou C., Barbara C., De Ory F., et al. Estimating seroprevalence of vaccine-preventable infections: is it worth standardizing the serological outcomes to adjust for different assays and laboratories? *Epidemiol. Infect*. 2015; 143(11): 2269-78. DOI: <http://doi.org/10.1017/S095026881400301X>
20. Ланг Т.А., Сесик М. *Как описывать статистику в медицине: руководство для авторов, редакторов и рецензентов*. Пер. с англ. М.: Практическая медицина; 2016.
21. Халафян А.А. *STATISTICA 6.0 Математическая статистика с элементами теории вероятностей*. М.: Бино; 2011.
22. Герасимова А.Г., Игнатъева Г.В., Садыкова Д.К., Москалева Т.Н., Дубовицкая Е.Л., Цвиркун О.В. и др. Состояние противокорревого иммунитета у беременных женщин и новорожденных детей. В кн.: *Сборник научных трудов «Актуальные проблемы инфекционной патологии»*. СПб.; 1993.
23. Фазлеева Л.К., Романова Н.А. Влияние условий антенатального периода развития на становление поствакцинального иммунитета у детей. В кн.: Мальцев С.В., Келина Т.И., Молотилова Б.А. *Иммунология и иммунопатологические состояния у детей*. М.; 1983: 64-5.
24. Соколов Д.И., Сельков С.А. *Иммунологический контроль формирования сосудистой сети плаценты*. СПб.; 2012.
25. van den Berg J.P., Westerbeek E.A., van der Klis F.R., Berbers G.A., van Elburg R.M. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum. Dev*. 2011; 87(2): 67-72. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.11.003>
26. Авдоница Л.Г., Пяташина М.А., Исаева Г.Ш., Решетникова И.Д., Тюрин Ю.А., Куликов С.Н. и др. Коллективный иммунитет к вирусу кори у медицинских работников и студентов медицинских колледжей в Республике Татарстан. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 18(1): 43-9. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-1-43-49>
27. Костинов М.П., Филатов Н.Н., Журавлев П.И., Гладкова Л.С., Полищук В.Б., Шмитько А.Д. и др. Уровень коллективного иммунитета к вирусу кори у сотрудников отдельной больницы в рамках государственной программы элиминации кори. *Инфекция и иммунитет*. 2020; 10(1): 129-36. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-LOM-690>
28. Полищук В.Б., Рыжов А.А., Костинов М.П., Магаршак О.О., Шмитько А.Д., Лукачев И.В. и др. Состояние противокорревого иммунитета у пациентов листа ожидания трансплантации легких. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 93(4): 55-60.
29. Рубис Л.В. Результаты изучения коллективного иммунитета к кори у лиц в возрасте старше 35 лет. *Инфекция и иммунитет*. 2020; 10(2): 381-6. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-ASO-1302>
30. Сонис А.Г., Гусякова О.А., Гильмиярова Ф.Н., Ерещенко А.А., Игнатова Н.К., Кузьмичева В.И. и др. Характеристика напряженности противокорревого иммунитета в зависимости от возраста. *Инфекция и иммунитет*. 2020; 10(2): 375-80. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-POR-1173>
31. Сармометов Е.В., Мокова Н.М., Вольдшмидт Н.Б., Сергеев В.И., Цвиркун О.В., Метелкина Н.А. Оценка напряженности противокорревого иммунитета у медицинских работников г. Перми. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2011; (4): 45-8.
32. Белопольская М.А., Григорьева Т.Д., Аврутин В.Ю., Потанина Д.В., Дмитриев А.В., Яковлев А.А. Напряженность иммунитета к кори в различных группах населения. *Журнал инфектологии*. 2020; 12(1): 80-4. DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2020-12-1-80-84>
33. Тихонова Н.Т., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Басов А.А., Фролов Р.А., Ежлова Е.Б. и др. Состояние специфического иммунитета к вирусам кори и краснухи у новорожденных и их матерей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(6): 14-20. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-6-14-20>
34. Костинов М.П., Шмитько А.Д., Бочарова И.И., Черданцев А.П., Сависько А.А., Полищук В.Б. Уровень IgG-антител к вирусу кори в пуповинной крови новорожденных с учетом возраста матерей. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; (3): 30-4.
35. Топтыгина А.П., Смердова М.А., Наумова М.А., Владимировна Н.П., Мамаева Т.А. Влияние особенностей популяционного иммунитета на структуру заболеваемости корью и краснухой. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(3): 341-8. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-3-341-348>
36. Смердова М.А., Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Сенникова С.В., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г. и др. Гуморальный и клеточный иммунитет к антигенам вирусов кори и краснухи у здоровых людей. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(3-4): 607-11. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611>
37. Готвянская Т.П., Ноздрачева А.В., Русакова Е.В., Евсеева Л.Ф., Николаева О.Г., Полонский В.О. и др. Состояние популяционного иммунитета в отношении инфекций, управляемых средствами специфической профилактики, у медицинских работников Бурятии и Тверской области (по материалам Банка сывороток). *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016; (3): 8-16.

38. Семенов Т.А., Ноздрачева А.В., Асатрян М.Н., Акимкин В.Г., Тутельян А.В., Шмыр И.С. и др. Комплексный анализ влияния вакцинации на формирование популяционного иммунитета к кори среди населения мегаполиса. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2019; 74(5): 351-60. DOI: <http://doi.org/10.15690/vramn1170>

REFERENCES

- WHO. Fact sheets. Measles. Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/measles> (Accessed 12.06.2020)
- Bogomolov B.P. *Infectious Diseases: A Textbook [Инфекционные болезни: Учебник]*. Moscow: MGU; 2006. (in Russian)
- Bolotovskiy V.M., Mikheeva I.V., Lytkina I.N., Shkhanina I.L. *Measles, Rubella, Mumps: A Unified System for Managing Epidemic Processes [Корь, краснуха, эпидемический паротит: единая система управления эпидемическими процессами]*. Moscow; 2004. (in Russian)
- Rusakova E.V., Semenenko T.A., Shaposhnikov A.A., Teedeva L.U., Shcherbakov A.G. Scientific aspects of liquidation of measles within general problem of biosecurity. *Meditsina katastrof*. 2013; (1): 40-3. (in Russian)
- Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Tikhonova N.T., Turueva N.V., Pimenova A.S. The structure of the measles cases in the period of elimination. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2012; (2): 21-6. (in Russian)
- Tatochenko V.K., Ozeretskovskiy V.K. *Immunoprophylaxis-2018: Reference Book [Иммунoprofilaktika-2018: Справочник]*. Moscow: Borges; 2018. (in Russian)
- Fel'dbyum I.V. Epidemiologic surveillance over preventive vaccination. *MediAl'*. 2014; (3): 37-55. (in Russian)
- Thompson K.M. Evolution and use of dynamic transmission models for measles and rubella risk and policy analysis. *Risk Anal*. 2016; 36(7): 1383-403. DOI: <http://doi.org/10.1111/risa.12637>
- Fine P., Eames K., Heymann D.L. «Herd immunity»: a rough guide. *Clin. Infect. Dis*. 2011; 52(7): 911-6. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/cir007>
- Aleshkin V.A., Tikhonova N.T., Gerasimova A.G., Tsvirkun O.V., Shul'ga S.V., Ezhlova E.B., et al. Problems towards measles elimination in Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2016; 93(5): 29-34. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-5-29-34> (in Russian)
- Tsvirkun O.V., Dedkov V.V. Mathematical justification of the possibility of measles elimination in Russia. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2009; (1): 30-5. (in Russian)
- Briko N.I., Zueva L.P., Pokrovskiy V.I., Sergiev V.P., Shkarin V.V. *Epidemiology: Textbook [Epidemiologiya: Учебник]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
- Cherkasskiy B.L. *Epidemiological Risk [Риск в эпидемиологии]*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2007. (in Russian)
- Simonova E.G., Sergevni V.I. Diagnosis in the system risk-oriented epidemiological surveillance of infectious diseases. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2018; 17(5): 31-7. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-31-37> (in Russian)
- WHO. Measles and Rubella Surveillance Data. Available at: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/active/measles_monthlydata/en/ (Accessed 24.04.2020)
- Seменов Т.А., Акимкин В.Г. Seroepidemiology in the surveillance of vaccine-preventable diseases. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; 95(2): 87-94. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-2-87-94> (in Russian)
- Seменов Т.А., Анан'ина Ю.В., Боев В.В., Гинсбург А.Л. Banks of biological resources in the system of basic epidemiological and clinical studies. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk*. 2011; (10): 5-9. (in Russian)
- Plans P. New preventive strategy to eliminate measles, mumps and rubella from Europe based on the serological assessment of herd immunity levels in the population. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2013; 32(7): 961-6. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10096-013-1836-6>
- Kafatos G., Andrews N., McConway K.J., Anastassopoulou C., Barbara C., De Ory F., et al. Estimating seroprevalence of vaccine-preventable infections: is it worth standardizing the serological outcomes to adjust for different assays and laboratories? *Epidemiol. Infect*. 2015; 143(11): 2269-78. DOI: <http://doi.org/10.1017/S095026881400301X>
- Lang A.T., Secic M. *How to Report Statistics in Medicine: Annotated Guidelines for Authors, Editors, and Reviewers*. Philadelphia; 2014.
- Khalafyan A.A. *STATISTICA 6.0 Mathematical Statistics with Elements of Probability Theory [STATISTICA 6.0 Математическая статистика с элементами теории вероятностей]*. Moscow: Binom; 2011. (in Russian)
- Gerasimova A.G., Ignat'eva G.V., Sadykova D.K., Moskaleva T.N., Dubovitskaya E.L., Tsvirkun O.V., et al. The state of measles immunity in pregnant women and newborns. In: *Collection of Proceedings «Actual Problems of Infectious Pathology» [Сbornik nauchnykh trudov «Aktual'nye problemy infektsionnoy patologii»]*. St. Petersburg; 1993. (in Russian)
- Fazleeva L.K., Romanova N.A. Influence of conditions of the antenatal period of development on the formation of postvaccinal immunity in children. In: Mal'tsev S.V., Kelina T.I., Molotilov B.A. *Immunology and Immunopathological Conditions in Children [Иммунология и иммунопатологические состояния у детей]*. Moscow; 1983: 64-5. (in Russian)
- Sokolov D.I., Sel'kov S.A. *Immunological Control of the Formation of the Vascular Network of the Placenta [Иммунологический контроль формирования сосудистой сети плаценты]*. St. Petersburg; 2012. (in Russian)
- van den Berg J.P., Westerbeek E.A., van der Klis F.R., Berbers G.A., van Elburg R.M. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum. Dev*. 2011; 87(2): 67-72. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.11.003>
- Avdonina L.G., Patyashina M.A., Isaeva G.Sh., Reshetnikova I.D., Tyurin Yu.A., Kulikov S.N., et al. Collective immunity to virus measles of medical workers and students of medical colleges in the Republic of Tatarstan. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2019; 18(1): 43-9. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-1-43-49> (in Russian)
- Kostinov M.P., Filatov N.N., Zhuravlev P.I., Gladkova L.S., Polishchuk V.B., Shmit'ko A.D., et al. Level of measles herd immunity assessed in hospital medical workers within a framework of the state measles elimination program. *Infektsiya i immunitet*. 2020; 10(1): 129-36. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-LOM-690> (in Russian)
- Polishchuk V.B., Ryzhov A.A., Kostinov M.P., Magarshak O.O., Shmit'ko A.D., Lukachev I.V., et al. Condition of anti-measles immunity in patients on waiting-list for lung transplantation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2016; 93(4): 55-60. (in Russian)
- Rubis L.V. A survey of examining herd measles immunity in adults over 35 years old. *Infektsiya i immunitet*. 2020; 10(2): 381-6. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-ASO-1302> (in Russian)
- Sonis A.G., Gusyakova O.A., Gil'miyarova F.N., Ereshchenko A.A., Ignatova N.K., Kuz'micheva V.I., et al. Pattern of resilient age-related measles immunity. *Infektsiya i immunitet*. 2020; 10(2): 375-80. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-POR-1173> (in Russian)
- Sarmometov E.V., Mokova N.M., Vol'dshmidt N.B., Sergevni V.I., Tsvirkun O.V., Metelkina N.A. Evaluation of measles

- immunity intensity among medical workers in the city of Perm. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2011; (4): 45-8. (in Russian)
32. Belopol'skaya M.A., Grigor'eva T.D., Avrutin V.Yu., Potanina D.V., Dmitriev A.V., Yakovlev A.A. Measles immunity in different population groups. *Zhurnal infektologii*. 2020; 12(1): 80-4. DOI: <http://doi.org/10.22625/2072-6732-2020-12-1-80-84> (in Russian)
33. Tikhonova N.T., Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Basov A.A., Frolov R.A., Ezhlova E.B., et al. The State of Specific Immunity to Measles and Rubella Virus in Newborns and their mothers. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2017; 16(6): 14-20. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-6-14-20> (in Russian)
34. Kostinov M.P., Shmit'ko A.D., Bocharova I.I., Cherdantsev A.P., Savis'ko A.A., Polishchuk V.B. Measles virus-specific igg-antibodies level in umbilical cord blood according to the maternal age. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni*. 2014; (3): 30-4. (in Russian)
35. Toptygina A.P., Smerdova M.A., Naumova M.A., Vladimirova N.P., Mamaeva T.A. Influence of population immunity peculiarities on the structure of measles and rubella prevalence. *Infektsiya i immunitet*. 2018; 8(3): 341-8. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-3-341-348> (in Russian)
36. Smerdova M.A., Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu., Sennikova S.V., Zetkin A.Yu., Klykova T.G., et al. Humoral and cellular immunity to measles and rubella virus antigens in healthy subjects. *Infektsiya i immunitet*. 2019; 9(3-4): 607-11. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611> (in Russian)
37. Gotvyanskaya T.P., Nozdracheva A.V., Rusakova E.V., Evseeva L.F., Nikolaeva O.G., Polonskiy V.O., et al. Herd immunity against vaccine-preventable diseases among healthcare workers (according to serum bank materials). *Epidemiologiya i infektionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2016; (3): 8-16. (in Russian)
38. Semenenko T.A., Nozdracheva A.V., Asatryan M.N., Akimkin V.G., Tutel'yan A.V., Shmyr I.S., et al. Multivariate analysis of the megacity population immunity to measles. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2019; 74(5): 351-60. DOI: <http://doi.org/10.15690/vramn1170> (in Russian)

Информация об авторах:

Ноздрачева Анна Валерьевна[✉] — н.с. отдела эпидемиологии ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-8521-1741>. E-mail: nozdracheva0506@gmail.com

Семеновко Татьяна Анатольевна — д.м.н., проф., академик РАЕН, рук. отдела эпидемиологии ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6686-9011>. E-mail: semenenko@gamaleya.org

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Anna V. Nozdracheva[✉] — researcher, Department of epidemiology, N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-8521-1741>. E-mail: nozdracheva0506@gmail.com

Tatiana A. Semenenko — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Department of epidemiology, N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6686-9011>. E-mail: semenenko@gamaleya.org

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Роль микробиоты в регуляции гомеостаза организма человека при инфекции

Бухарин О.В., Перунова Н.Б.[✉]

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения РАН, 460000, Оренбург, Россия

В обзоре рассмотрены регуляторные возможности микробиоты человека для сохранения его здоровья. Проблема не нова, но она расширилась с включением новых «находок» со времен И.И. Мечникова — убежденного сторонника полезной (защитной) функции нормофлоры.

Изучение интеграции метаболизма человека и населяющих его микробов выявило участие микробных метаболитов — сигнальных молекул — в обеспечении гомеостаза хозяина. Особое внимание уделяется продуктам метаболизма — ароматическим аминокислотам как регуляторам физиологических функций человека и микробов. Сигнальные молекулы регулируют микробный «кворум», иммунную систему (ее клеточные и гуморальные звенья). Не обойдены вниманием опиаты, гормональные пептиды, в частности, натрийуретический гормон, гипоталамические нонапептиды (окситоцин и вазопрессин), оказывающие как прямое антимикробное, так и опосредованное действие в организме хозяина.

Интерес исследователи проявляют и к продуктам жировой ткани — адипокинам, в частности, лептину, который оказался многоцелевым регулятором, проявляя при этом провоспалительный характер.

К разряду сигнальных молекул отнесены и цитокины, взаимодействующие с грампозитивными бактериями, что активно обсуждается в литературе.

При оценке представленного материала на различных моделях инфекций просматривается общая закономерность: в условиях симбиоза формируется единая регуляторная среда, в которой отмечается многообразие связей от непосредственных (прямых) взаимодействий (разрушение сигнальных молекул, индукция физиологических функций за счет наличия сходных рецепторов к лигандам и, наконец, модификация сигнальных молекул — расширение спектра действия) до косвенных воздействий, опосредованных активацией и регуляцией системы иммунитета через цитокиновую сеть и систему адипокинов. Вероятно, сочетание этого многообразия механизмов интеграции в единой регуляторной среде (микроорганизм–хозяин) и приводит к формированию гомеостаза, т.е. динамическому равновесию сигнальных систем микробиоты и человека в условиях ассоциативного симбиоза, где инфекция — его модельная система.

В эту концепцию хорошо вписывается разработанный нами метод межмикробного распознавания «своей–чужой» в паре доминант–ассоциант и описанный треугольник: микробиота–гипоталамо–гипофизарная нейросекреция–окситоцин, органично составляющий «кишечно–мозговую ось».

Ключевые слова: гомеостаз; микробиота; сигнальные молекулы; инфекция; окситоцин.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Роль микробиоты в регуляции гомеостаза организма человека при инфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 97(5): 458–467.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-8>

Поступила 10.08.2020

Принята в печать 29.09.2020

The role of microbiota in the regulation of homeostasis in the human body during infection

Oleg V. Bukharin, Natalia B. Perunova[✉]

Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of the Orenburg Federal Research Center, 460000, Orenburg, Russia

The review considers the regulatory capabilities of the human microbiota to preserve human health. The problem is not new, but it has expanded with the inclusion of new “findings” since the time of I.I. Mechnikov, a staunch supporter of the useful (protective) function of the normal flora.

The study of the integration of human metabolism and microbes inhabiting human body revealed the participation of microbial metabolites — “signaling molecules” — in providing the homeostasis of the host. Particular attention

is paid to the metabolic products – aromatic amino acids as regulators of the physiological functions of humans and microbes. “Signal” molecules regulate the microbial “quorum”, the immune system (its cellular and humoral components). Opiates, hormonal peptides, in particular, natriuretic hormone, hypothalamic nonapeptides (oxytocin and vasopressin), which have both a direct antimicrobial and an indirect effect in the host's body, are not ignored. Researchers are also showing interest in the products of adipose tissue — “adipokines” (in particular, leptin), which turned out to be a multipurpose regulator showing a pro-inflammatory nature.

The category of “signaling” molecules also includes cytokines that interact with gram-positive bacteria, which is actively discussed in the literature.

In the evaluation of the material presented on various models of infections, a general pattern is observed: under the conditions of symbiosis, a “single regulatory environment” is formed, in which a variety of connections from immediate (direct) interactions are noted, i.e. the destruction of “signaling” molecules, induction of physiological functions due to the presence of similar receptors with ligands and, finally, modification of “signaling” molecules, i.e. expansion of the spectrum of action. The combination of this variety of integration mechanisms in this “single regulatory environment” (microorganism–host) probably leads to the formation of homeostasis, i.e. dynamic balance of the “signaling” systems of the microbiota and humans in the conditions of associative symbiosis, where an infection is its model system.

This concept fits well our method of intermicrobial recognition of friend–foe in the dominant–associate pair and the described triangle: microbiota–hypothalamic–pituitary neurosecretion–oxytocin, organically constituting the gut–brain axis.

Keywords: *homeostasis; microbiota; signaling molecules; infections; oxytocin.*

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Bukharin O.V., Perunova N.B. The role of microbiota in the regulation of homeostasis in the human body during infection. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 458–467. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-8>

Received 10 August 2020
Accepted 29 September 2020

Взаимодействия «паразит–хозяин» микробов и человека весьма разнообразны и нередко нарушают гомеостаз хозяина, т.е. стабильное внутреннее равновесие функционирующих систем организма. С другой стороны, имеется немало примеров, когда микробные клетки оказываются полезны для сохранения здоровья человека. Однако в этом «союзе, неотделимом от вражды», который длится уже много веков, есть свой «микробный орган» — микробиом, которым Природа наделила человека, защищая все его биотопы. Как же это осуществляется и что в «копилке» исследователей?

Метаболическая интеграция и сигнальные молекулы

Обилие разнообразных сигнальных молекул и метаболитов в кишечнике позволяет микробиоте осуществлять влияние на состояние организма хозяина, формирование его гомеостаза и управление поведением. Регуляторные метаболиты микроорганизмов включают короткоцепочечные жирные кислоты, гамма-аминомасляную кислоту, биотин, витамин К, путресцин, спермидин, спермин, таурин, кадаверин, триптофан и др. [1–4].

Была обоснована интеграция метаболизма человека и его микробиоты на основе обобщения результатов исследований с участием микробных метаболитов в развитии критических состояний [5], где было показано, что в сложившейся системе человек–микробиом присутствуют все необходимые

объективные условия для формирования метаболической интеграции. Особого внимания заслуживает группа микробных экзометаболитов, имеющих ароматическое строение. Их анализ выявил около 50 ароматических соединений в кишечнике здорового человека, в количественном отношении преобладали такие метаболиты, как фенилуксусная кислота, гидроксифенилуксусная кислота, фенилпировиноградная кислота и др. В сыворотке крови здоровых людей обнаружено присутствие большинства этих ароматических аминокислот с преобладанием гидроксифенилуксусной кислоты. Изменение соотношения ароматических аминокислот в крови авторы связывают с их избирательной утилизацией клетками тканевых барьеров, хотя это не исключает потребности в метаболитах кишечной доминантной микрофлоры.

Имеются данные, подтверждающие роль опиатов в инфекционном процессе [6, 7]. Экспериментальные материалы показывают, что при стрессе у лабораторных животных появляются опиаты в просвете кишечника, что сопровождается активацией вирулентности кишечной палочки и нарушением барьерной функции кишечного эпителия [8]. Оказалось, что динорфин — представитель группы опиатов, не увеличивает ростовые свойства, но усиливает продукцию пиоцианина у псевдомонад. А это является еще одним доказательством влияния эукариотических «сигнальных молекул» на физиологию прокариот без изменения их роста/размножения [9].

В ряде работ также описано снижение вирулентности микроорганизмов под действием сигнальных молекул иммунной системы, посредством нарушения микробного кворума, как это было показано на примере динорфина и интерферона (INF)- γ [8–10]. В работе M.W. Bader и соавт. [11] представлены данные о влиянии пептидных гормонов, имеющих структурную гомологию к антибактериальным пептидам, на микроорганизмы. Предполагается, что эти молекулы обладают вторичной антимикробной активностью, помимо их мишень-специфического взаимодействия с клетками эукариот.

Натрийуретические пептиды в настоящее время также рассматриваются как пептиды с антимикробным действием, которые могут оказывать влияние на микробиоту при инфекционном процессе [10]. В пользу этого свидетельствуют данные о формировании пор в мембране бактерий под действием С-типа натрийуретического пептида и увеличение концентрации мозгового натрийуретического пептида при септическом шоке. В ряде работ установлено, что натрийуретические гормоны типа В и С стимулируют вирулентные свойства псевдомонад, не влияя на их ростовые характеристики, но изменяя внутриклеточную концентрацию цАМФ. Считается, что механизм данного действия натрийуретических гормонов опосредован белком Vfr, связывающим цАМФ и контролирующим выработку различных факторов вирулентности у *Pseudomonas aeruginosa*. Исследования штаммов псевдомонад показали наличие рецепторов к разным подтипам натрийуретических гормонов, действующих как через цАМФ, так и через цГМФ [12–14].

Гипоталамические нонапептиды

Всеобщий исследовательский интерес к окситоцину и вазопрессину не случаен. Являясь продуктом гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы (ГГНС) головного мозга, его супраоптического и паравентрикулярного ядер, окситоцин, как и вазопрессин, обладает широтой физиологических действий и принимает непосредственное участие в регуляции адаптационных реакций организма человека [15]. Особенно наглядно это выявляется при инфекции, когда окситоцин защищает хозяина от возбудителя. Ранее считали, что препарат не оказывает защитный эффект непосредственно, хотя и была обнаружена его способность усиливать антимикробное действие антибиотиков, применяемых в комбинации с окситоцином [16].

Так в чем же секрет защитного эффекта при инфекционной патологии? Что он делает с возбудителем инфекции? Для этого вернемся к ранним работам по регуляции персистентного потенциала бактерий О.Л. Черновой (1989) [17], которая, изучая влияние различных антисептических фармакологических средств на антилизоцимную активность зо-

лотистого и эпидермального стафилококков, показала, что лидером в десятке изученных антисептиков — препаратов, подавляющих антилизоцимную активность бактерий, — оказался окситоцин, что позволило обратить внимание на ингибирование этого персистентного признака микроорганизмов. В последующем Д.А. Кириллов (2004) [18] методом клонального анализа популяций различных возбудителей инфекции показал, что окситоцин перестраивает персистентный потенциал клонов популяции возбудителя вплоть до его элиминации из организма хозяина.

Эти работы «проторили дорожку» в XXI в. — век инфектологии (от микробиологии и иммунологии), изучающей взаимоотношения паразит–хозяин при инфекции на основе симбиотической платформы и клонального анализа персистентного потенциала популяции возбудителя. Таким образом, клональная перестройка популяции возбудителя болезни, снижающая его адаптационные возможности, — это существенный механизм защиты хозяина, реализуемый при помощи окситоцина.

Не исключено, что данный механизм защиты хозяина от инфекций — еще одна иллюстрация из разряда «природоподобных технологий», которые нам еще предстоит освоить. Но это дело времени и смелости ума. А основания для этого есть.

Посильную лепту в изучение защитного эффекта окситоцина внесли и иммунологи, описавшие другие механизмы опосредованного защитного действия окситоцина при инфекции: фагоцитарную функцию макрофагов, усиление бластной трансформации лимфоцитов, ингибирование биопленкообразования патогенов [19].

Обсуждая эту проблему, нельзя не упомянуть инсулиноподобный эффект окситоцина, базирующийся на усилении синтеза гликогена из глюкозы. Хирурги хорошо пользуются этим приемом, применяя окситоцин на фоне сахарного диабета пациентов при гнойно-некротических поражениях стоп и гнойно-воспалительных заболеваниях мягких тканей [19–21].

Универсальные регуляторные эффекты нонапептидов нашли свое применение и при панкреонекрозе, деструктивном панкреатите и системных поражениях поджелудочной железы [22, 23].

Исследователи не теряют интереса к фундаментальным проблемам медицины. Это в полной мере относится к проблеме гомеостаза организма. Как и чем мы можем помочь пациенту?

Лучшее свидетельство тому — исследование, выполненное в «школе» академика Ю.В. Наточина, где был выявлен новый механизм работы многоцелевого регулятора гомеостаза — окситоцина, определивший новую функциональную роль нонапептида — его участие в осморегуляции организма. При изучении регуляции водовыделительной функции

почек отмечено, что после водной нагрузки при гипергидратации у крыс возрастала секреция окситоцина ГНС, что способствовало усилению водного диуреза и приводило к более быстрому выделению воды почкой и восстановлению осмотического гомеостаза [24].

Адипокины и цитокины

Многочисленные исследования механизмов взаимосвязи метаболических нарушений и воспалительных процессов привели к признанию факта, что жировая ткань функционирует как эндокринный орган, выделяя различные биологически активные вещества (адипокины). Изучение адипокинов показало, что дисбаланс данных про- и противовоспалительных медиаторов приводит к различным метаболическим дисфункциям, что свидетельствует о роли адипокинов в формировании гомеостаза хозяина [25]. Принимая во внимание участие адипокинов в воспалении, эти пептиды были разделены на провоспалительные (лептин, резистин, интерлейкин (IL)-6, фактор некроза опухоли (TNF)- α) и противовоспалительные (адипонектин, антагонист рецептора IL-1, IL-10) [26].

Лептин обладает множественным действием и влияет на гипоталамус, осуществляя гормональную регуляцию, связанную с поступлением питательных веществ и энергетическим метаболизмом, а также влияет на метаболизм глюкозы, липидов и другие функции человека [27]. Одной из важных функций лептина является регуляция иммунного ответа, что предполагает роль данных пептидов в интегративных механизмах ассоциативного симбиоза человека и микроорганизмов.

В настоящее время этот вопрос активно изучается. Еще не выяснена защитная роль адипокинов при инфекции толстого кишечника с участием лептина, индуцирующего продукцию муцина за счет стимуляции эпителиальных клеток ободочной кишки и таким образом обеспечивающего статический внешний барьер против патогенов. Однако при этом бактериальная инвазия *Salmonella typhimurium*, наличие эндотоксина сальмонеллы или кишечной палочки не влияли на уровень лептина в крови. Напротив, введение токсина *Clostridioides difficile* лабораторным животным вызывало значительное повышение уровня лептина в плазме крови и усиливало экспрессию рецепторов к лептину на клетках слизистого эпителия, что предполагает прямую провоспалительный эффект лептина в кишечнике [28, 29].

Известно, что диарея, возникающая при бактериальной кишечной инфекции, связана с воздействием микробных липополисахаридов на иммунную систему и нарушением моторики желудочно-кишечного тракта. В экспериментах *in vivo* выявлено, что у мышей, получавших грелин, нарушение

моторики, вызванное присутствием эндотоксина в крови, корректировалось за счет ингибирования уровня оксида азота в желудочно-кишечном тракте и уменьшения продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α , а также за счет индукции противовоспалительного цитокина IL-10 [30, 31].

Интеграция микробиоты с организмом хозяина может осуществляться при помощи сигнальных молекул иммунной системы человека — цитокинов, баланс которых является одним из условий формирования гомеостаза человека, поскольку цитокины принимают непосредственное участие в регуляции иммунного ответа при инфекции [32]. При этом изменение цитокинового баланса происходит не только за счет взаимодействия микробиоты с клетками иммунитета, но и при непосредственном влиянии бактерий на цитокины (антипептидная активность). Также известно влияние самих цитокинов на биологические свойства микроорганизмов. В экспериментах *in vitro* показана стимуляция ростовых свойств бактерий под действием IL-1, IL-2, IL-6, INF- γ , TNF- α . У культуры *Yersinia pestis* обнаружены мембранные рецепторы (антиген сборки капсулы F1), связывающие IL-1 β , а у *P. aeruginosa* — белок, специфически связывающийся с INF- γ , что приводило к активации механизмов «quorum sensing» [33–37].

Получены данные о ферментах бактерий, расщепляющих многие виды органических макромолекул, включая цитокины IL-2, INF- γ [38], которые могут свидетельствовать о том, что инактивация цитокинов, являющихся продуктом иммунных клеток (лимфоцитов, макрофагов и др.), может привести к нарушениям механизмов как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Подтверждением модификации цитокинов и их рецепторов служат материалы, свидетельствующие, что ауреолизин золотистого стафилококка, являющийся металлопротеазой, может вызвать деградацию рецепторов к IL-6 на клетках, цистеиновая протеаза *Streptococcus pyogenes* разрушает IL-1 β , а сериновая протеаза — IL-8. Кроме того, цистеиновая протеаза *Porphyromonas gingivalis* может вызвать деградацию целой группы цитокинов, включая IL-8, -1 β , -6, -12, INF- γ , TNF- α , а металлопротеаза *P. aeruginosa* способна разрушать IL-2, IL-6 [39, 40].

Таким образом, полученные «находки» иллюстрируют способность микробиоты не только влиять на продукцию цитокинов иммунными клетками, но и использовать определенные цитокины в качестве ростовых факторов и медиаторов «чувства кворума», а также проявлять антипептидную активность, внося свой вклад в формирование цитокинового баланса в организме человека.

Несомненно, что взаимодействие микробных сигнальных метаболитов и иммунной системы человека представляет интерес с позиции интеграции молекулярных систем про- и эукариот при ассоциа-

тивном симбиозе человека. В ряде работ показано, что различные гомологи ацилгломосерин-лактонов (АГЛ) ускоряют апоптоз макрофагов и нейтрофилов, ингибируют пролиферацию лимфоцитов и выработку TNF- α и IL-12, тормозят T-клеточный ответ, индуцируют апоптоз в дендритных клетках и CD4⁺ T-лимфоцитах. Роль АГЛ подтверждается наличием механизмов, ограничивающих количество сигнальных молекул в среде, что названо «тушением кворума». Снижение концентрации АГЛ контролируется со стороны как микробиоты, так и хозяина. К примеру, бациллы в ответ на увеличение количества АГЛ продуцируют фермент, инактивирующий широкий спектр АГЛ путем расщепления лактонового кольца. Клетки дыхательного эпителия млекопитающих также производят АГЛ-инактивирующие ферменты (параоксоназы), деградирующие АГЛ синегнойной палочки. В другой работе показано существование трех семейств параоксоназ, которые у млекопитающих расположены преимущественно в печени и могут инактивировать разнообразные АГЛ [41–46].

При изучении механизмов интеграции микробиоты и хозяина интерес также представляют сигнальные молекулы микроорганизмов. Их влияние на иммунитет человека было показано на примере гомологов алкилоксибензолов, когда под влиянием метилрезорцина изменялись функциональная активность и субстратная специфичность лизоцима [47].

Очевидно, что в механизмах интеграции микробиоты и человека задействованы сигнальные молекулы: со стороны микробиоты — низкомолекулярные метаболиты, молекулы «quorum sensing» и пр., а со стороны хозяина — гормоны и медиаторы иммунитета. По-видимому, в условиях симбиотических взаимоотношений микробиота–хозяин формируется единая регуляторная среда, в которой наблюдается многообразие создающихся связей: от непосредственных (прямых) взаимодействий — разрушения сигнальных молекул (инактивации молекул кворума, разрушения антимикробных факторов иммунитета), индукции физиологических функций за счет наличия схожих рецепторов к лигандам и, наконец, модификации сигнальных молекул (расширения спектра имеющихся антимикробных ферментов, появления антимикробной активности у пептидов, ранее не имевших данного свойства) — до косвенных воздействий, опосредованных активацией и регуляцией системы иммунитета через цитокиновую сеть и систему адипокинов. По-видимому, сочетание этого многообразия механизмов интеграции в единой регуляторной среде приводит к формированию гомеостаза, определяющего динамическое равновесие сигнальных систем микробиоты и человека в условиях ассоциативного симбиоза [46].

Бифидофлора кишечного биотопа — «форпост» здоровья человека

Роль микробного «органа» (микробиома) трудно переоценить, и уж если он создан Природой и сосуществует с хозяином много веков, то остается лишь понять его физиологическое назначение. Наличие в организме млекопитающих универсального и древнего «центра управления» — гипоталамо-гипофизарной системы, продуцирующей нонапептидные нейросекреторные гормоны (вазопрессин и окситоцин), предполагает, что они не могут остаться без работы [48, 49].

Оказалось, что кишечная микрофлора, стимулируя иммунную защиту хозяина, защищает организм от раневой инфекции. С одной стороны, эта защита может осуществляться за счет транслокации полезной микрофлоры хозяина, как это было показано на примере бацилл [50]. С другой стороны, микробные компоненты (клетки и метаболиты), формируя кишечно-мозговую ось, могут влиять на выработку гипоталамического гормона — окситоцина. Работы по изучению влияния бактерий на секрецию окситоцина малочисленны и проведены на модели лактобактерий. Установлено, что лактобациллы стимулируют продукцию окситоцина, что благотворно отражается на заживлении инфицированных ран в эксперименте [51]. Также отмечено, что *Lactobacillus* spp. стимулируют окситоцин, который регулирует экспрессию INF- γ и CD25 для иммунной толерантности. Все эти усилия предупреждают избыточную реактивность как своих, так и внешних факторов среды, которые способствуют преждевременному старению организма. На моделях мышей показана эффективность индуцированных лактобациллами и их клеточными лигандами T-reg при участии нейропептидного гормона окситоцина [51–53].

Приведенные материалы вкупе с описанными нашими данными свидетельствуют, что микробиом усиливает регуляцию окситоцина, тем самым улучшая течение раневой инфекции, способствуя быстрейшему заживлению ран [19].

В свете обсуждаемой проблемы определенный интерес представляют данные оренбургских исследователей ИКВС УрО РАН, проводящих изучение биологических характеристик бифидофлоры в качестве ключевого регулятора здоровья человека.

Систематическое изучение микросимбиоза кишечного биотопа у человека позволило выявить феномен микробного распознавания своей чужой в условиях взаимодействия доминантных (бифидофлора) и ассоциативных микросимбионтов [46].

Известно, что, независимо от уровня сложности, любые живые организмы (от прокариот до высших эукариот) имеют различные механизмы защиты от чужеродной информации, поскольку концепция

«своего» тесно связана с самоидентификацией и саморегуляцией любой биологической системы [54].

Микробное распознавание и механизмы самоидентификации бактерий активно изучаются. L.M. Wenren с соавт. [55] в результате исследования роста культур *Proteus mirabilis* на поверхности агаровых сред отметили, что взаимоотношения микроорганизмов в бульонной культуре могут отличаться от таковых в модели «агаровой среды», поскольку в этом процессе имеют значение микробные метаболиты. А.Е. Shank и соавт. [56] связывали регуляторные взаимодействия микроорганизмов с наличием в супернатанте сигнальных молекул. Очевидно, что изменение фенотипа микробных популяций при межмикробном взаимодействии осуществляется с помощью различных молекул, далее используемых микробиотой в качестве индукторов новых метаболитов-посредников, что в конечном итоге оказывает влияние на формирование антагонистических либо синергидных связей между микроорганизмами [46].

С использованием приема индукции микробных метаболитов в условиях пары доминант–ассоциант был выявлен феномен оппозиционного (усиление/подавление) влияния микросимбионтов на их биологические свойства (антагонистический, персистентный потенциал и способность к формированию биопленок), позволяющий реализовать принцип «свой–чужой» в условиях микросимбиоза. Дальнейшее развитие исследований по определению «чужеродности» штаммов микроорганизмов позволило определить биосовместимость бактерий в микробной композиции и оценить эффективность пробиотических препаратов [46].

Используя симбиотический подход на платформе нового направления «инфекционная симбиология», было определено, что не только организм хозяина, посредством различных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, выявляет и уничтожает «чужеродные» штаммы бактерий и грибов, но и сами микроорганизмы (представители доминантной микробиоты) способны определять «свои» и «чужие» виды микросимбионтов в составе микросимбиоза. Таким образом, своеобразная перестройка «микробного органа» человека позволяет микробиоте сформировать симбиотические связи для поддержания стабильного функционирования микросимбиоза на оптимальном уровне с целью выживания нормофлоры в той экологической нише человека, которую она занимает.

Заключение

Оценивая ретроспективу рассмотренного вопроса, можно сделать вывод о целесообразности продолжения накопления материала по выяснению механизмов защиты организма хозяина при помощи микробных клеток и их продуктов. Активно изучается возможность использования в качестве регуля-

торов гомеостаза организма человека сигнальных молекул, гормонов и цитокинов. Это очень интересная многообещающая тематика по выявлению новых «природоподобных» технологий, которые нам предстоит еще открыть, но учиться у Природы не зазорно.

Появление в третьем тысячелетии науки инфектологии значительно расширило рамки изучения отношений «паразит–хозяин» с включением симбиотического подхода на организменном и клональном уровнях персистентного потенциала патогенов.

Это позволило выявить роль кишечной микробиоты в регуляции гомеостаза хозяина через треугольник «кишечная микробиота–ГГНС–окситоцин» [19]. К этому можно присовокупить материалы, уточняющие биоэффекты данного универсального ключевого регулятора гомеостаза:

- 1) более быстрое заживление ран;
- 2) поддержание костно-мышечной массы тела человека;
- 3) улучшение ментального здоровья;
- 4) психотропное действие, регуляция социальной памяти и когнитивных функций;
- 5) пониженный риск ожирения;
- 6) усиление репродуктивной активности и др.

Описанный треугольник «микробиота–ГГНС–окситоцин» подтвержден экспериментально-клиническими материалами и органично вписывается в концепцию «кишечно-мозговой оси», характеризующую ряд важнейших физиологических функций хозяина, существенно дополняя их.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zheng X., Xie G., Zhao A., Zhao L., Yao C., Chiu N.H., et al. The footprints of gut microbial-mammalian co-metabolism. *J. Proteome Res.* 2011; 10(12): 5512–22. <https://doi.org/10.1021/pr2007945>
2. Le Gall G., Noor S.O., Ridgway K. Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *J. Proteome Res.* 2011; 10(9): 4208–18. <https://doi.org/10.1021/pr2003598>
3. Beloborodova N.V., Olenin A.Y., Fedotcheva N.I., Shubina V., Teplova V.V. Effect of phenolic acids originating from microbes on mitochondria and neutrophils. *Crit. Care.* 2012; 16(Suppl. 3): 26.
4. Matsumoto M., Kibe R., Ooga T., Aiba Y., Kurihara S., Sawaki E., et al. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci. Re.* 2012; 2: 233. <https://doi.org/10.1038/srep00233>
5. Белобородова Н.В. Интеграция метаболизма человека и его микробиома при критических состояниях. *Общая реаниматология.* 2012; 8(4): 42–54.
6. Hooi D.S., Bycroft B.W., Chhabra S.R., Williams P., Pritchard D.I. Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Infect. Immun.* 2004; 72(11): 6463–70. <https://doi.org/10.1128/iai.72.11.6463-6470.2004>
7. Pritchard D.I. Immune modulation by *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296(2-3): 111–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.037>

8. Wu L., Holbrook C., Zaborina O., Ploplys E., Rocha F., Pelham D., et al. *Pseudomonas aeruginosa* expresses a lethal virulence determinant, the PA-I lectin/adhesin, in the intestinal tract of a stressed host: the role of epithelia cell contact and molecules of the quorum sensing signaling system. *Ann. Surg.* 2003; 238(5): 754–64. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000094551.88143.f8>
9. Zaborina O., Lepine F., Xiao G., Valuckaite V., Chen Y., Li T., et al. Dynorphin activates quorum sensing quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 2007; 3(3): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030035>
10. Lesouhaitier O., Veron W., Chaplain A., Madi A., Blier A.S., Dagorn A., et al. Gram-negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules. *Sensors (Basel)*. 2009; 9(9): 6967–90. <https://doi.org/10.3390/s90906967>
11. Bader M.W., Sanowar S., Daley M.E., Schneider A.R., Cho U., Xu W., et al. Recognition of antimicrobial peptides by a bacteri-
al sensor kinase. *Cell*. 2005; 122(3): 461–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.030>
12. Vila G., Resl M., Stelzeneder D., Struck J., Maier C., Riedl M., et al. Plasma NT-proBNP increases in response to LPS administration in healthy men. *J. Appl. Physiol.* (1985). 2008; (105): 1741–5. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90442.2008>
13. Veron W., Lesouhaitier O., Pennanez X., Rehel K., Leroux P., Orange N., et al. Natriuretic peptides affect *Pseudomonas aeruginosa* and specifically modify lipopolysaccharide biosynthesis. *FEBS J.* 2007; 274(22): 5852–64. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06109.x>
14. Veron W., Orange N., Feuilloley M.G., Lesouhaitier O. Natriuretic peptides modify *Pseudomonas fluorescens* cytotoxicity by regulating cyclic nucleotides and modifying LPS structure. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 114. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-114>
15. Стадников А.А., Бухарин О.В. *Гипоталамическая нейросекреция и структурно-функциональный гомеостаз про- и эукариот*. Оренбург; 2012.
16. Стадников А.А. *Роль гипоталамических нейропептидов во взаимодействии про- и эукариот (структурно-функциональные аспекты)*. Екатеринбург; 2001.
17. Чернова О.Л. *Антилизоцимная активность стафилококков, выделенных при бактерионосительстве: автореф. дисс. ... канд. биол. наук*. Челябинск; 1989. 17 с.
18. Кириллов Д.А. *Лекарственная регуляция персистентных свойств микроорганизмов: автореф. дисс. ... канд. мед. наук*. Оренбург; 2004. 22 с.
19. Бухарин О.В., Стадников А.А., Перунова Н.Б. *Роль окситоцина и микробиоты в регуляции взаимодействий про- и эукариот при инфекции*. Екатеринбург; 2018.
20. Widmaier U., Shah P.R., Lee G. Interactions between oxytocin, glucagon and streptozotocin induced diabetic rats. *Regul. Pept.* 1991; 34(3): 235–49. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(91\)90182-g](https://doi.org/10.1016/0167-0115(91)90182-g)
21. Бухарин О.В., Курлаев П.П., Перунова Н.Б., Скоробогатых Ю.И. Экспериментальное изучение комбинации ципрофлоксацина с окситоцином на образование биоплёнок условно-патогенными бактериями. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010; (6): 3–7.
22. Костюченко А.Л., Филин В.И. *Неотложная панкреатология*. СПб.: Деан; 2000.
23. Демидов В.М., Демидов С.М. Перспективы интрабурсального применения даларгина и сандостатина при лапароскопических вмешательствах у больных с панкреонекрозами. *Анналы хирургической гепатологии*. 2002; 7(1): 200.
24. Наточин Ю.В., Голосова Д.Р., Шахматова Е.И. Новая функциональная роль окситоцина – участие в осморегуляции. *Доклады Академии наук*. 2018; 479(6): 712–5. <https://doi.org/10.7868/S0869565218120228>
25. Greenberg A.S., Obin M.S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 83(2): 461–5. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.461s>
26. Toussiroot E., Streit G., Wendling D. The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14(10): 1095–100. <https://doi.org/10.2174/092986707780362826>
27. El Homsy M., Ducroc R., Claustre J. et al. Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways. *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007; 293(1): G365–73. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00091.2007>
28. Jenkins N.L., Turner J.L., Dritz S.S., Durham S.K., Minton J.E. Changes in circulating insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding proteins, and leptin in weaned pigs infected with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2004; 26(1): 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2003.09.001>
29. Mykoniatis A., Anton M., Wilk M., Wang C.C., Ungsuan L., Blüher S., et al. Leptin mediates *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. *Gastroenterology*. 2003; 124(3): 683–91. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50101>
30. Chen Y.T., Tsai S.H., Sheu S.Y. et al. Ghrelin improves LPS-induced gastrointestinal motility disturbances: roles of NO and prostaglandin E2. *Shock*. 2010; (33): 205–212.
31. Waseem T., Duxbury M., Ito H., Tsai L.H. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Surgery*. 2008; 33(2): 205–12. <https://doi.org/10.1097/shk.0b013e3181ae841b>
32. Lambert G. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J. Anim. Sci.* 2009; 87(14 Suppl.): E101–8. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1339>
33. Zav'yalov V., Chernovskaya T.V., Navolotskaya E.V., Karlyshev A.V., MacIntyre S., Vasiliev A.M., et al. Specific high affinity binding of human interleukin 1 beta by Caf1A usher protein of *Yersinia pestis*. *FEBS Lett.* 1995; 371(1): 65–8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00878-d](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00878-d)
34. Wu L., Holbrook C., Zaborina O., Ploplys E., Rocha F., Pelham D., et al. *Pseudomonas aeruginosa* expresses a lethal virulence determinant, the PA-I lectin/adhesin, in the intestinal tract of a stressed host: the role of epithelia cell contact and molecules of the quorum sensing signaling system. *Ann. Surg.* 2003; 238(5): 754–64. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000094551.88143.f8>
35. Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Степанова Т.В., Разумихин М.В., Томова А.С., Шилов И.А. и др. Влияние фактора некроза опухоли на размножение вегетативных и некультивируемых форм сальмонелл. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2002; (4): 20–5.
36. Kanangat S., Meduri Gu., Tolley E.F., Patterson D.R., Meduri C.U., Pak C., et al. Effects of cytokines and endotoxin on the intracellular growth of bacteria. *Infect. Immun.* 1999; 67(6): 2834–40. <https://doi.org/10.1128/iai.67.6.2834-2840.1999>
37. Wilson M., Seymour R., Henderson B. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect. Immun.* 1998; 66(6): 2401–9. <https://doi.org/10.1128/iai.66.6.2401-2409.1998>
38. Potempa J., Pike R.N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate. Immun.* 2009; 1(2): 70–87. <https://doi.org/10.1159/000181144>
39. Sheets S.M., Robles-Price A.G., McKenzie R.M., Casiano C.A., Fletcher H.M., et al. Gingipain-dependent interactions with the host are important for survival of *Porphyromonas gingivalis*. *Front. Biosci.* 2008; 13: 3215–38. <https://doi.org/10.2741/2922>
40. Leidal K.G., Munson K.L., Johnson M.C., Denning G.M. Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 2003; 23(6): 307–18. <https://doi.org/10.1089/107999003766628151>

41. Tateda K., Ishii Y., Horikawa M., Matsumoto T., Miyairi S., Pechere J.C., et al. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.* 2003; 71(10): 5785–93. <https://doi.org/10.1128/iai.71.10.5785-5793.2003>
42. Telford G., Wheeler D., Williams P., Tomkins P.T., Appleby P., Sewell H., et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect. Immun.* 1998; 66(1): 36–42. <https://doi.org/10.1128/iai.66.1.36-42.1998>
43. Boontham P., Robins A., Chandran P., Pritchard D., Cámara M., Williams P., et al. Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clin. Sci. (Lond.)* 2008; 115(11): 343–51. <https://doi.org/10.1042/cs20080018>
44. Stoltz D.A., Ozer E.A., Ng C.J., Yu J.M., Reddy S.T., Lulis A.J., et al. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2007; 292(4): L852–60. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00370.2006>
45. Bar-Rogovsky H., Hugenmatter A., Tawfik D.S. The evolutionary origins of detoxifying enzymes: the mammalian serum paraoxonases (PONs) relate to bacterial homoserine lactonases. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(33): 23914–27. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.427922>
46. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. *Микросимбиоз. Екатеринбург; 2014.*
47. Евдокименко А.Ю., Досадина Э.Э., Эль Регистан Г.И., Белов А.А. Влияние алкилоксибензолов на ферментативную активность некоторых гидролаз при различных условиях. *Успехи в химии и химической технологии.* 2016; 30(9): 10–2.
48. Gordon J.I. Honor thy gut symbionts redux. *Science.* 2012; 336(6086): 1251–3. <https://doi.org/10.1126/science.1224686>
49. Бухарин О.В. Адаптивные стратегии взаимодействия возбудителя и хозяина при инфекции. *Вестник Российской академии наук.* 2018; 88(7): 637–43. <https://doi.org/10.31857/S086958730000087-3>
50. Тарасенко В.С., Фадеев С.Б., Бухарин О.В. *Хирургическая инфекция мягких тканей (клинико-микробиологический аспект).* Екатеринбург; 2015.
51. Poutahidis T., Kearney S.M., Levkovich T., Qi P., Varian B.J., Lakritz J.R., et al. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS One.* 2013; 8(10): e78898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078898>
52. Poutahidis T., Springer A., Levkovich T., Qi P., Varian B.J., Lakritz J.R., et al. Probiotic microbes sustain youthful serum testosterone levels and testicular size in aging mice. *PLoS One.* 2014; 9(1): e84877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084877>
53. Poutahidis T., Kleinewietfeld M., Smillie C., Levkovich T., Perrotta A., Bhela S., et al. Microbial reprogramming inhibits Western diet-associated obesity. *PLoS One.* 2013; 8(7): e68596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068596>
54. Lopez-Larrea C., eds. *Self and Nonself.* New York: Springer; 2012.
55. Wenren L.M., Sullivan N.L., Cardarelli L., Septer A.N., Gibbs K.A. Two independent pathways for self-recognition in proteus mirabilis are linked by type VI-dependent export. *mBio.* 2013; 4(4): e00374-13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00374-13>
56. Shank A.E., Kolter R. New developments in microbial interspecies signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009; 12(2): 205–14. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.003>
2. Le Gall G., Noor S.O., Ridgway K. Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *J. Proteome Res.* 2011; 10(9): 4208–18. <https://doi.org/10.1021/pr2003598>
3. Beloborodova N.V., Olenin A.Y., Fedotcheva N.I., Shubina V., Teplova V.V. Effect of phenolic acids originating from microbes on mitochondria and neutrophils. *Crit. Care.* 2012; 16(Suppl. 3): 26.
4. Matsumoto M., Kibe R., Ooga T., Aiba Y., Kurihara S., Sawaki E., et al. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci. Re.* 2012; 2: 233. <https://doi.org/10.1038/srep00233>
5. Beloborodova N.V. Integration of metabolism in man and his microbiome in critical conditions. *Obshchaya reanimatologiya.* 2012; 8(4): 42–54. (in Russian)
6. Wu L., Holbrook C., Zaborina O., Ploplys E., Rocha F., Pelham D., et al. *Pseudomonas aeruginosa* expresses a lethal virulence determinant, the PA-I lectin/adhesin, in the intestinal tract of a stressed host: the role of epithelia cell contact and molecules of the quorum sensing signaling system. *Ann. Surg.* 2003; 238(5): 754–64. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000094551.88143.f8>
7. Zaborina O., Lepine F., Xiao G., Valuckaite V., Chen Y., Li T., et al. Dynorphin activates quorum sensing quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 2007; 3(3): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030035>
8. Hooi D.S., Bycroft B.W., Chhabra S.R., Williams P., Pritchard D.I. Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Infect. Immun.* 2004; 72(11): 6463–70. <https://doi.org/10.1128/iai.72.11.6463-6470.2004>
9. Pritchard D.I. Immune modulation by *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296(2-3): 111–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.037>
10. Lesouhaitier O., Veron W., Chapalain A., Madi A., Blier A.S., Dagorn A., et al. Gram-negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules. *Sensors (Basel).* 2009; 9(9): 6967–90. <https://doi.org/10.3390/s90906967>
11. Bader M.W., Sanowar S., Daley M.E., Schneider A.R., Cho U., Xu W., et al. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell.* 2005; 122(3): 461–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.030>
12. Vila G., Resl M., Stelzeneder D., Struck J., Maier C., Riedl M., et al. Plasma NT-proBNP increases in response to LPS administration in healthy men. *J. Appl. Physiol.* (1985). 2008; (105): 1741–5. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90442.2008>
13. Veron W., Lesouhaitier O., Pennanec X., Rehel K., Leroux P., Orange N., et al. Natriuretic peptides affect *Pseudomonas aeruginosa* and specifically modify lipopolysaccharide biosynthesis. *FEBS J.* 2007; 274(22): 5852–64. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06109.x>
14. Veron W., Orange N., Feuilloy M.G., Lesouhaitier O. Natriuretic peptides modify *Pseudomonas fluorescens* cytotoxicity by regulating cyclic nucleotides and modifying LPS structure. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 114. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-114>
15. Stadnikov A.A., Bukharin O.V. *Hypothalamic Neurosecretion and Structural-Functional Homeostasis of Pro- and Eukaryotes [Gipotalamicheskaya neyrosekretsiya i strukturno-funktsional'nyy gomeostaz pro- i eukariot].* Orenburg; 2012. (in Russian)
16. Stadnikov A.A. *The Role of Hypothalamic Neuropeptides During Interactions of Pro- and Eukaryotes (Structural-Functional Aspects) [Rol' gipotalamicheskikh neyropeptidov vo vzaimodeystvii pro- i eukariot (strukturno-funktsional'nye aspekty)].* Ekaterinburg; 2001. (in Russian)
17. Chernova O.L. *Antilysozyme activity of staphylococci isolated during bacterial carriage: thesis Cand. Biol. Sci.* Chelyabinsk; 1989. 17 p. (in Russian)

REFERENCES

1. Zheng X., Xie G., Zhao A., Zhao L., Yao C., Chiu N.H., et al. The footprints of gut microbial-mammalian co-metabolism. *J. Proteome Res.* 2011; 10(12): 5512–22. <https://doi.org/10.1021/pr2007945>

18. Kirillov D.A. Medicinal regulation of persistent properties of microorganisms: thesis Cand. Biol. Sci. Orenburg; 2004. 22 p. (in Russian)
19. Bukharin O.V., Stadnikov A.A., Perunova N.B. *The Role of Oxytocin and Microbiota in Regulation of Pro- and Eukaryote Interactions in Infection [Rol' oksitotsina i mikrobioty v regulyatsii vzaimodeystviy pro- i eukariot pri infektsii]*. Ekaterinburg; 2018. (in Russian)
20. Widmaier U., Shah P.R., Lee G. Interactions between oxytocin, glucagon and streptozotocin-induced diabetic rats. *Regul. Pept.* 1991; 34(3): 235–49. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(91\)90182-g](https://doi.org/10.1016/0167-0115(91)90182-g)
21. Bukharin O.V., Kurlaev P.P., Perunova N.B., Skorobogatykh Yu.I. Experimental study of ciprofloxacin and oxytocin combination on formation of biofilms by opportunistic bacteria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2010; (6): 3–7. (in Russian)
22. Kostyuchenko A.L., Filin V.I. *Emergency Pancreatology [Neotlozhnaya pankreatologiya]*. St. Petersburg: Dean; 2000. (in Russian)
23. Demidov V.M., Demidov S.M. Prospects for intrabursal use of dalargin and sandostatin in laparoscopic interventions in patients with pancreatic necrosis. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii.* 2002; 7(1): 200. (in Russian)
24. Natochin Yu.V., Golosova D.R., Shakhmatova E.I. New functional role of oxytocin – participation in osmoregulation. *Doklady Akademii nauk.* 2018; 479(6): 712–5. <https://doi.org/10.7868/S0869565218120228> (in Russian)
25. Greenberg A.S., Obin M.S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 83(2): 461–5. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.461s>
26. Toussierot E., Streit G., Wendling D. The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14(10): 1095–100. <https://doi.org/10.2174/092986707780362826>
27. El Homsy M., Ducroc R., Claustre J. et al. Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways. *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007; 293(1): G365–73. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00091.2007>
28. Jenkins N.L., Turner J.L., Dritz S.S., Durham S.K., Minton J.E. Changes in circulating insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein, and leptin in weaned pigs infected with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2004; 26(1): 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2003.09.001>
29. Mykoniatis A., Anton M., Wilk M., Wang C.C., Ungsuan L., Blüher S., et al. Leptin mediates *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. *Gastroenterology.* 2003; 124(3): 683–91. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50101>
30. Chen Y.T., Tsai S.H., Sheu S.Y. et al. Ghrelin improves LPS-induced gastrointestinal motility disturbances: roles of NO and prostaglandin E2. *Shock.* 2010; (33): 205–212.
31. Waseem T., Duxbury M., Ito H., Tsai L.H. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Surgery/* 2008; 33(2): 205–12. <https://doi.org/10.1097/shk.0b013e3181ae841b>
32. Lambert G. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J. Anim. Sci.* 2009; 87(14 Suppl.): E101–8. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1339>
33. Zav'yalov V., Chernovskaya T.V., Navolotskaya E.V., Karlyshev A.V., MacIntyre S., Vasiliev A.M., et al. Specific high affinity binding of human interleukin 1 beta by CafIA usher protein of *Yersinia pestis*. *FEBS Lett.* 1995; 371(1): 65–8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00878-d](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00878-d)
34. Wu L., Holbrook C., Zaborina O., Ploplys E., Rocha F., Pelham D., et al. *Pseudomonas aeruginosa* expresses a lethal virulence determinant, the PA-I lectin/adhesin, in the intestinal tract of a stressed host: the role of epithelia cell contact and molecules of the quorum sensing signaling system. *Ann. Surg.* 2003; 238(5): 754–64. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000094551.88143.f8>
35. Romanova Yu.M., Alekseeva N.V., Stepanova T.V., Razumikhin M.V., Tomova A.S., Shilov I.A., et al. Influence of tumor necrosis factor on the growth of vegetative and nonculturable forms of *Salmonella*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2002; (4): 20–5. (in Russian)
36. Kanangat S., Meduri Gu., Tolley E.F., Patterson D.R., Meduri C.U., Pak C., et al. Effects of cytokines and endotoxin on the intracellular growth of bacteria. *Infect. Immun.* 1999; 67(6): 2834–40. <https://doi.org/10.1128/iai.67.6.2834-2840.1999>
37. Wilson M., Seymour R., Henderson B. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect. Immun.* 1998; 66(6): 2401–9. <https://doi.org/10.1128/iai.66.6.2401-2409.1998>
38. Potempa J., Pike R.N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate. Immun.* 2009; 1(2): 70–87. <https://doi.org/10.1159/000181144>
39. Sheets S.M., Robles-Price A.G., McKenzie R.M., Casiano C.A., Fletcher H.M., et al. Gingipain-dependent interactions with the host are important for survival of *Porphyromonas gingivalis*. *Front. Biosci.* 2008; 13: 3215–38. <https://doi.org/10.2741/2922>
40. Leidal K.G., Munson K.L., Johnson M.C., Denning G.M. Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade hyman RANTES, MCP-1, and ENA-78. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 2003; 23(6): 307–18. <https://doi.org/10.1089/107999003766628151>
41. Tateda K., Ishii Y., Horikawa M., Matsumoto T., Miyairi S., Pechere J.C., et al. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.* 2003; 71(10): 5785–93. <https://doi.org/10.1128/iai.71.10.5785-5793.2003>
42. Telford G., Wheeler D., Williams P., Tomkins P.T., Appleby P., Sewell H., et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect. Immun.* 1998; 66(1): 36–42. <https://doi.org/10.1128/iai.66.1.36-42.1998>
43. Boontham P., Robins A., Chandran P., Pritchard D., Cámara M., Williams P., et al. Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clin. Sci. (Lond.)* 2008; 115(11): 343–51. <https://doi.org/10.1042/cs20080018>
44. Stoltz D.A., Ozer E.A., Ng C.J., Yu J.M., Reddy S.T., Lusis A.J., et al. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2007; 292(4): L852–60. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00370.2006>
45. Bar-Rogovsky H., Hugenmatter A., Tawfik D.S. The evolutionary origins of detoxifying enzymes: the mammalian serum paraoxonases (PONs) relate to bacterial homoserine lactonases. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(33): 23914–27. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.427922>
46. Bukharin O.V., Perunova N.B. *Microsymbiocenosis [Mikrosimbiotsenoz]*. Ekaterinburg; 2014. (in Russian)
47. Evdokimenko A.Yu., Dosadina E.E., El' Registan G.I., Belov A.A. Effect of alkyloxybenzene on the enzymatic activity of some hydrolases under different conditions. *Uspekhi v khimii i khimicheskoy tekhnologii.* 2016; 30(9): 10–2. (in Russian)
48. Gordon J.I. Honor thy gut symbionts redux. *Science.* 2012; 336(6086): 1251–3. <https://doi.org/10.1126/science.1224686>
49. Bukharin O.V. Adaptive strategies for the interaction of the pathogen and host with infection. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk.* 2018; 88(7): 637–43. <https://doi.org/10.31857/S086958730000087-3> (in Russian)

50. Tarasenko V.S., Fadeev S.B., Bukharin O.V. *Surgical Infection of Soft Tissues (Clinical and Microbiological Aspect) [Khirurgicheskaya infektsiya myagkikh tkaney (kliniko-mikrobiologicheskii aspekt)]*. Ekaterinburg; 2015. (in Russian)
51. Poutahidis T., Kearney S.M., Levkovich T., Qi P., Varian B.J., Lakritz J.R., et al. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS One*. 2013; 8(10): e78898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078898>
52. Poutahidis T., Springer A., Levkovich T., Qi P., Varian B.J., Lakritz J.R., et al. Probiotic microbes sustain youthful serum testosterone levels and testicular size in aging mice. *PLoS One*. 2014; 9(1): e84877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084877>
53. Poutahidis T., Kleinewietfeld M., Smillie C., Levkovich T., Perrotta A., Bhela S., et al. Microbial reprogramming inhibits Western diet-associated obesity. *PLoS One*. 2013; 8(7): e68596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068596>
54. Lopez-Larrea C., ed. *Self and Nonself*. New York: Springer; 2012.
55. Wenren L.M., Sullivan N.L., Cardarelli L., Septer A.N., Gibbs K.A. Two independent pathways for self-recognition in proteus mirabilis are linked by type VI-dependent export. *mBio*. 2013; 4(4): e00374-13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00374-13>
56. Shank A.E., Kolter R. New developments in microbial interspecies signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009; 12(2): 205–14. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.003>

Информация об авторах

Бухарин Олег Валерьевич — д.м.н., академик РАН, г.н.с. Института клеточного и внутриклеточного симбиоза ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, 460000, Оренбург, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6039-5265>.
E-mail: ofrc@list.ru

Перунова Наталья Борисовна — д.м.н., профессор РАН, в.н.с. (с исполнением обязанностей зав. лабораторией) лаб. биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, 460000, Оренбург, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6352-8879>.
E-mail: perunovanb@gmail.com

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors

Oleg V. Bukharin — Dr. Sci. (Med.), Full Member of RAS, main researcher, Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, 460000, Orenburg, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6039-5265>.
E-mail: ofrc@list.ru

Natalia B. Perunova — Dr. Sci. (Med.), Professor of RAS, leading researcher (with the duties of the head of the laboratory), Laboratory of biomonitoring and molecular genetic research, Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, 460000, Orenburg, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6352-8879>.
E-mail: perunovanb@gmail.com

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Нейтрофильные внеклеточные ловушки в борьбе с биопленкообразующими микроорганизмами: охотники или добыча?

Долгушин И.И., Мезенцева Е.А.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», 454092, Челябинск, Россия

В обзоре представлены современные данные о взаимоотношениях нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) и биопленкообразующих микроорганизмов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida* spp., полученные в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. До 80% микробных инфекций человека связаны с биопленкообразующими микроорганизмами. Формирование высокоспециализированных сообществ в виде биопленок является одной из основных стратегий выживания бактерий и грибов, значимо повышая их толерантность к действию агрессивных и стрессовых внешних условий, химиотерапевтических препаратов, факторов иммунной системы, способствуя их персистенции и хронизации инфекционного процесса. Образование НВЛ в процессе нетоза является одним из биологических механизмов, используемых нейтрофилами в защите от патогенов. Хемоаттрактанты биопленочного происхождения, а также выделяемые эпителиальными и иммунокомпетентными клетками, привлекают и активируют мигрирующие нейтрофилы. Однако учитывая, что в биопленках бактерии образуют достаточно крупные клеточные кластеры и агрегаты, процесс фагоцитоза порой оказывается затруднен или невозможен. В этих условиях логично предположить, что значимость НВЛ в антибиопленочном иммунитете увеличивается. Однако за счет компонентов внеклеточного биопленочного матрикса (например, экзополисахарид Psl *P. aeruginosa*), молекул системы quorum sensing (например, quorum sensing-система LasR *P. aeruginosa*), ферментов (например, LasA-протеаза и LasB-эластаза *P. aeruginosa*), токсинов (например, лейкоцидин Пантона–Валентайна и γ -гемолизин АВ *S. aureus*) и, вероятно, других, пока не изученных, факторов микроорганизмы в биопленках способны влиять на сигнальные системы, задействованные в нетозе, на интенсивность формирования НВЛ, механизмы севестрации и киллинга в них, порой подчиняя и используя компоненты НВЛ для собственных целей.

Ключевые слова: нейтрофилы; нейтрофильные внеклеточные ловушки; нетоз; биопленки; биопленочные инфекции; биопленкообразующие микроорганизмы; обзор.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Долгушин И.И., Мезенцева Е.А. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в борьбе с биопленкообразующими микроорганизмами: охотники или добыча? *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5): 468–481.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-9>

Поступила 18.06.2020

Принята в печать 28.08.2020

Neutrophil extracellular traps in the fight against biofilm-forming microorganisms: hunters or prey?

Ilya I. Dolgushin, Elena A. Mezentseva

South-Ural State Medical University, 454092, Chelyabinsk, Russia

The review presents up-to-date data on the relationships between neutrophil extracellular traps (NETs) and biofilm-forming microorganisms *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida* spp. obtained *in vitro* and *in vivo* studies. Up to 80% of human microbial infections are associated with biofilm-forming microorganisms. The formation of highly specialized biofilm communities is one of the main strategies for the survival of bacteria and fungi, significantly increasing their tolerance to aggressive and stressful environmental conditions, chemotherapeutic drugs, and immune system factors, contributing to their persistence and chronicity of the infectious process. The formation of NETs in the process of NETosis is one of the biological mechanisms used by neutrophils in protection against pathogens. Chemoattractants of biofilm origin, as well as those secreted by epithelial and immunocompetent cells, attract and activate migrating neutrophils. However, given that bacteria form fairly large

cell clusters and aggregates in biofilms, the process of phagocytosis is sometimes difficult or impossible. Under these conditions, it is logical to assume that the importance of NETs in anti-biofilm immunity increases. However, due to the components of the extracellular biofilm matrix (e.g., Psl exopolysaccharide *P. aeruginosa*), quorum sensing (QS) molecules (e.g., LasR QS system *P. aeruginosa*), enzymes (e.g., LasA protease and LasB elastase *P. aeruginosa*), toxins (e.g., Panton-Valentine leukocidin and AB γ -hemolysin *S. aureus*) and probably other factors yet to be studied, the microorganisms in biofilms are able to influence the signaling systems involved in NETosis, the intensity of the formation of NETs, the sequestration and killing mechanisms in them, sometimes subordinating and using NETs components for their own purposes.

Keywords: *neutrophils; neutrophilic extracellular traps; NETosis; biofilms; biofilm infections; biofilm-forming microorganisms; review.*

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Dolgushin I.I., Mezentseva E.A. Neutrophil extracellular traps in the fight against biofilm-forming microorganisms: hunters or prey? *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 468–481. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-9>

Received 18 June 2020
Accepted 28 August 2020

Введение

Открытие V. Brinkmann и коллегами в 2004 г. нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) как формы врожденного ответа, который связывает микроорганизмы, предотвращает их распространение и обеспечивает высокую локальную концентрацию антимикробных агентов [1, 2], послужило толчком к изучению роли НВЛ, наряду с фагоцитозом и деградацией, в защите от патогенов и продемонстрировало их эффективность при ряде бактериальных, грибковых и вирусных инфекций [3–9]. Однако, несмотря на широкий арсенал средств противостояния, борьба с микроорганизмами резко осложняется, когда они формируют ассоциации, называемые биопленками, участвующие в развитии персистирующих инфекций и деструктивных воспалительных процессов [10, 11].

Основная часть

Для бактерий и грибов характерны два разных «образа жизни»: планктонный и биопленочный [12, 13].

При планктонном существовании одиночные клетки или клеточки в небольших цепочках (например, стрептококки) либо скоплениях (например, стафилококки) «плавают» без защиты от токсических веществ, бактериофагов и фагоцитов. Следовательно, такой стиль жизни опасен для микробов [12].

При биопленочном образе жизни микроорганизмов образование совокупностей клеток, окруженных самопродуцируемым внеклеточным матриксом, является одной из стратегий выживания [14]. Такие микробные агрегаты могут прилипать к естественным или искусственным поверхностям (сидячий рост, адгезированные биопленки), например к зубам, клеткам эпидермиса, венозным катетерам, искусственным суставам, или могут располагаться в тканях (неадгезированные или суспензион-

ные биопленки), например на слизистых оболочках, в мокроте или в труднозаживающих ранах [12]. Таким образом, биопленка — это постоянно обновляющееся сообщество микробов на биогенном или абиогенном субстрате, окруженных внеклеточным полимерным матриксом из экзополисахаридов, внеклеточной ДНК, белков, РНК и липидов, который предохраняет их от вредных воздействий, химиотерапевтических препаратов и влияний организма-хозяина, представляет собой один из факторов межмикробного взаимодействия и коммуникации, способствует горизонтальному переносу генов, является источником питательных веществ для бактерий во время голодания [13–22].

Использование современных технологий позволило установить, что развитие биопленки включает несколько последовательных этапов:

- 1) первоначальное прикрепление планктонных бактерий к поверхности (субстрату);
- 2) созревание биопленки;
- 3) отделение планктонных форм (дисперсия, отслойка, рассредоточение биопленки) с последующей их миграцией в новые локусы [13, 23].

Внутри биопленок микроорганизмы используют межклеточную коммуникационную систему из небольших сигнальных молекул, аутоиндукторов, называемую quorum sensing (QS) [14, 18, 20]. Система QS не только определяет плотность популяции, но и регулирует различные признаки, такие как бактериальный фенотип, экспрессия генов факторов вирулентности, пространственная дифференциация и формирование биопленок [18, 21]. Высвобождение QS-молекул обеспечивает быструю локальную связь между клетками в зараженной области, синхронизацию их роста, а также реакции на изменения температуры и pH окружающей среды, присутствие биоцидных соединений и т.д. [13, 24]. До 80% микробных инфекций человека, включая

эндокардит, периодонтит, риносинусит, остеомиелит, хронические незаживающие раны, менингит, инфекции почек, постимплантационные инфекции, микробно-воспалительные процессы в бронхолегочной системе при муковисцидозе связаны с биопленкообразующими микроорганизмами [13, 20]. Как ни парадоксально, большие дозы антибиотиков, используемых для лечения биопленочных инфекций, способствуют формированию антибиотико-резистентных штаммов бактерий [13].

НВЛ представляют собой волокна ДНК, «декорированные» набором белков ядерного, цитозольного и гранулярного происхождения, из которых часть составляют «протеомное ядро», относительно постоянное, независимо от индуцирующего стимула, включая гистоны H2A, H2B, H4, лактоферрин, миелопероксидазу (МПО), нейтрофильную эластазу (НЭ), резистин, нейтрофильный дефензин-2, α -актинин, β -актин, миозин-9, мезин, профилин-1, пластин-2, филамин-А, липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, α -энолазу, глюкозо-6-фосфат-изомеразу, транскетолазу [25–28]. Существование протеомных вариаций может быть связано с тем, что различные стимулы запускают отличающиеся внутриклеточные сигнальные каскады, которые в итоге приводят к некоторым изменениям в белковом составе НВЛ. Хотя возможен и другой сценарий, по которому адгезия дополнительных белков может происходить уже после высвобождения НВЛ в зависимости от окружающей их среды [28].

На сегодняшний день известны NADPH-оксидаза (NOX)-зависимые и NOX-независимые механизмы формирования НВЛ [29, 30]. Наиболее изученным является NOX-зависимый механизм, при котором активационный стимул, например форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) или бактериальный липополисахарид, вызывает выход запасов Ca^{2+} в цитозоль, повышение активности протеинкиназы C и фосфорилирование gp91phox/Nox2 [29, 31]. Данный процесс облегчает сборку комплекса NADPH-оксидазы, тем самым стимулируя генерацию активных форм кислорода (АФК), способствующих последующей дезинтеграции мембран ядра и гранул [9, 29, 32–35]. Выходящие при этом из азурофильных гранул НЭ и МПО контактируют с содержимым ядра, участвуя в расщеплении гистонов и деконденсации хроматина [9, 29, 34]. Кульминацией процесса является выброс деконденсированной ДНК, «декорированной» белками, в межклеточное пространство через разрывы в клеточной мембране нейтрофила, чему способствует генерация HClO под действием МПО [30], или поры, образованию которых помогает гасдермин D [36], и гибель нейтрофила [9, 29].

В деконденсации хроматина также принимает участие пептидиларгинин-деиминаза 4 (PAD4) —

фермент, который конвертирует положительно заряженный аргинин гистонов в нейтрально заряженный цитруллин, изменяя тем самым общий заряд молекул и способствуя диссоциации гистонов и ДНК [37]. Однако роль PAD4 в NOX-зависимом формировании НВЛ остается предметом спора [29]: данные одних исследователей свидетельствуют, что цитруллинизация гистонов не является необходимым событием NADPH-оксидаза-зависимого образования НВЛ [29, 38, 39], в то время как результаты, полученные другими учеными, доказывают обратное [29, 40, 41]. В одной из последних работ, опубликованных в 2020 г., H.R. Thiam и соавторы установили, что при нетозе происходит цепь последовательных клеточных событий, которая сохраняется у разных видов (у человека, мышей), при этом ядерная локализация и цитруллинирующая активность PAD4 являются необходимыми условиями для деконденсации и высвобождения ДНК [37].

Ионофоры кальция (иономицин, A23187), некоторые цитокины, фосфолипидные медиаторы воспаления, кристаллы мочевой кислоты могут запускать NOX-независимый механизм формирования НВЛ [29, 30, 42–47]. Приток и повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле нейтрофила, с одной стороны, активирует кальцийзависимые калиевые каналы и выработку митохондриальных АФК [29, 30, 39]; а с другой стороны, вызывает активацию PAD4 и ее транслокацию в ядро с последующей цитруллинизацией гистонов и деконденсацией хроматина [29].

Нейтрофильные внеклеточные ловушки и биопленки *Pseudomonas aeruginosa*

Хроническая биопленочная инфекция дыхательных путей, вызванная *Pseudomonas aeruginosa*, у пациентов с муковисцидозом (МВ) является наиболее хорошо изученной и описанной биопленочной инфекцией в медицине [12]. При МВ происходят мутации гена, кодирующего синтез регулятора трансмембранной проводимости муковисцидоза (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator — CFTR), белка, участвующего в транспорте бикарбонатных ионов и ионов хлора через мембрану [47]. CFTR экспрессируется во многих органах, включая эпителиальные клетки дыхательных путей, поджелудочной железы, а также клетки врожденного иммунитета, в частности нейтрофилы [47, 48]. Мутации гена CFTR приводят к нарушению нормального транспорта ионов и жидкости через эпителий дыхательных путей, образованию толстого слоя вязкой слизи, нарушению мукоцилиарного клиренса, развитию воспаления и хронических бактериальных инфекций, приводящих к нарушению функции легких и дыхательной недостаточности [47]. *P. aeruginosa* инфицирует респираторный тракт пациентов с МВ в раннем возрасте и становится персистирующим патогеном в последующие

годы, что обусловлено ее способностью образовывать биопленки [47, 49].

В элиминации *P. aeruginosa*, в том числе из дыхательных путей, ключевую роль играют нейтрофильные гранулоциты. Наиболее эффективными способами борьбы являются классический фагоцитоз и последующий внутриклеточный киллинг, причем *P. aeruginosa* устойчива к кислородзависимым механизмам и чувствительна к действию таких кислороднезависимых факторов, как НЭ, лизоцим, кателицидины, дефензины [49]. Однако при МВ мигрирующие в большом количестве в легкие нейтрофилы не могут эффективно уничтожать бактерии, проявляя дисфункциональный фенотип, вызывая повреждение тканей легких и нарушение их функции [47, 49, 50].

Первоначально считалось, что основной формой гибели нейтрофилов в дыхательных путях при МВ является вторичный некроз, т.е. некроз после апоптоза вследствие несвоевременного удаления апоптозных клеток [49]. В работах 2005 [51] и 2009 гг. [52] группой американских ученых установлено, что комплекс ДНК и белка актина, выделяющихся при некрозе нейтрофилов, значительно усиливает биопленкообразование *P. aeruginosa* штамма PAO1 в условиях *in vitro*, что, вероятно, имеет место в респираторных путях у больных МВ. Похожие результаты были получены в работе и другой группы ученых из США 2011 г. по изучению взаимоотношений биопленкообразующей активности *P. aeruginosa* штамма 6294 и нейтрофилов при развитии кератита вследствие ношения контактных линз [53]. Авторы установили, что каркас из F-актина и ДНК, выделяющихся из некротизированных нейтрофилов, успешно используется бактериями для адгезии и дальнейшего формирования биопленки на поверхности контактной линзы [53].

Однако ряд исследований показал, что нейтрофилы также массово подвергаются нетозу с выделением НВЛ, которые в большом количестве определяются в дыхательных путях и мокроте больных МВ [27, 28, 47, 49].

Одним из мощных индукторов образования НВЛ является мобильность *P. aeruginosa*, обусловленная флагеллиновыми жгутиками, поэтому превалирование подвижных планктонных немуюкоидных форм бактерий на ранних стадиях заболевания вызывает активный нетоз [27, 28, 49, 54]. Еще одним триггером НВЛ-формирования является экзотоксин *P. aeruginosa* пиоцианин [55]. Его индукция посредством передачи QS-сигналов коррелирует со стадией роста биопленки *P. aeruginosa*. Хотя пиоцианин обладает широким спектром токсических эффектов, предполагаемой основой его токсичности является проникновение через мембрану клетки и окисление NADPH (т.е. пиоцианин является неферментной NADPH-оксидазой) с образованием

супероксид-аниона и других АФК внутри клетки, что приводит к развитию в клетках-мишенях окислительного стресса [56–58]. Однако в 2013 г. был установлен новый механизм действия пиоцианина — индукция образования НВЛ через окислительный стресс (посредством АФК, ферментов JNK и PI3K и аутофагии), но вызванный не прямым окислением NADPH, а активацией NADPH-оксидазы нейтрофила [55].

Находясь в дыхательных путях, *P. aeruginosa* индуцирует выработку нейтрофилами фактора ингибирования миграции макрофагов — провоспалительного цитокина, обладающего аутокринной и паракринной активностью, который, в свою очередь, вызывает активацию нейтрофильной митоген-активируемой протеинкиназы и последующее образование АФК внутри нейтрофила, также потенцируя нетоз и ингибируя при этом апоптоз [27].

У *P. aeruginosa* имеется несколько QS-систем, при этом система Las занимает самое высокое место в иерархии, регулируя нижестоящие системы Rhl и Pqs [59, 60]. Индукторами нетоза являются такие важные факторы вирулентности *P. aeruginosa*, контролируемые QS-системой LasR, как ферменты LasA-протеаза и LasB-эластаза, а также экзотоксины, выделяемые с помощью системы секреции III типа (T3SS) [60].

Важно отметить, что разные генетические варианты *P. aeruginosa* индуцируют различные механизмы, участвующие в образовании НВЛ: одни запускают NOX-зависимые пути, другие — АФК-независимые; влияние одних приводит к цитруллинации гистонов при нетозе, другим не требуется PAD4 и цитруллинация для высвобождения НВЛ [60]. Кроме того, было обнаружено, что в составе НВЛ, индуцируемых разными вариантами *P. aeruginosa*, обязательно присутствует белок, усиливающий бактерицидное действие нейтрофилов, специфически нацеленный на грамотрицательные бактерии, такие как *P. aeruginosa*, а НЭ и МПО — не всегда [60].

Таким образом, ряд прямых и опосредованных *P. aeruginosa* факторов способствуют нетозу и выбросу большого количества НВЛ, начиная с ранних стадий заболевания. Однако секвестрация *P. aeruginosa* ловушками при сублитической концентрации антимикробных НВЛ-ассоциированных белков не приводит к полному уничтожению бактерий, а, наоборот, способствует их микроколонизации, образованию агрегатов и в итоге биопленкообразованию [28]. В процессе формирования биопленки *P. aeruginosa* экзополисахариды Psl внеклеточного матрикса взаимодействуют с внеклеточной ДНК не только самих бактерий, но и НВЛ, используя их в качестве «строительных лесов», т.е. каркаса для дальнейшего биопленкообразования и колонизации слизистой [17, 18, 27, 28, 61]. Удержание *P. aeruginosa* в остане ловушек и влияние на них

некоторых компонентов НВЛ, например белка LL-37, способствует мутагенезу бактерий [28, 62]. По мере прогрессирования болезни пребывание *P. aeruginosa* в дыхательных путях сопровождается генетическими изменениями и конверсией ряда признаков, в том числе трансформацией в неподвижные мукоидные формы, образующие биопленки. При этом и утрата жгутиков, и продукция альгинатсодержащей слизи сохраняет, но снижает способность *P. aeruginosa* индуцировать нетоз [54, 61], а слизиобразование также подавляет захват и уничтожение бактерий НВЛ, т.е. снижает эффективность защиты [27, 28, 49].

Интересно, что у 63% пациентов с МВ при хронической синегнойной инфекции формируются мутантные формы *P. aeruginosa* с инактивацией QS-системы LasR [60, 63], однако появление таких штаммов ассоциируется с ухудшением функции легких и у детей, и у взрослых с МВ [60, 64]. Данный парадокс свидетельствует о том, что *P. aeruginosa* компенсирует потерю факторов вирулентности другими патогенными механизмами, в частности путем ускользания от нейтрофил-опосредованных бактерицидных функций с помощью снижения интенсивности формирования НВЛ [60].

Таким образом, приведенные данные демонстрируют сложные динамические взаимоотношения НВЛ и биопленочной инфекции *P. aeruginosa* в дыхательных путях больных МВ, одновременно подчеркивая потенциальные недостатки НВЛ-модели защиты в контексте данной инфекции [28]. НВЛ, формируемые под действием бактериальных триггеров, осуществляют захват *P. aeruginosa*, однако неспособность уничтожить секвестрированные бактерии, с одной стороны, способствует биопленкообразованию последних, а с другой — запускает процесс их патoadаптации [27, 28], приводящей к формированию ещё большей устойчивости к НВЛ-опосредованной бактерицидной активности.

В 2019 г. были опубликованы результаты изучения влияния НВЛ на биопленкообразование *P. aeruginosa* штамма PAO1 на модели бактериального кератита у мышей [65]. Использование мультиточечной микроскопии, 3D-реконструкции в сочетании с электронной микроскопией и окраской глазных биоптатов по Граму выявило, что уже через 24 ч после заражения *P. aeruginosa* формировали толстую экзополисахарид Psl-содержащую биопленку на поверхности роговицы, а мигрирующие через периферическую лимбальную сосудистую сеть нейтрофилы собирались под этим бактериальным слоем, образуя видимый «щит». При этом между слоем нейтрофилов (снизу) и слоем бактерий (сверху) обнаруживалась «мертвая зона», заполненная ДНК в сочетании с белками-гистонами, НЭ и МПО, т.е. НВЛ. Важным является тот факт, что у животных 3 групп, нокаутных по PAD4, нейтрофильной эластазе и катепсину С и характеризую-

щихся нарушением НВЛ-образующей способности, отсутствовала «мертвая зона» в сочетании с утратой структурированной биопленки *P. aeruginosa*, выявляемой у мышей дикого типа, что позволило авторам предположить, что присутствие НВЛ обуславливало формирование биопленки высокорепликативными планктонными бактериями. При этом у всех 3 групп нокаутных животных через 7 дней после инокуляции на роговицу *P. aeruginosa* обнаруживались в головном мозге, вероятно проходя через канал зрительного нерва, исходя из чего авторы сделали вывод, что нейтрофилы формируют НВЛ-барьер для сдерживания бактерий снаружи в виде биопленки и предотвращения их распространения в мозг, «принося в жертву» глаз, т.к. планктонные бактерии гораздо более подвижны, чем биопленочные. Таким образом, формирование НВЛ, вероятно, является эволюционно полезным механизмом для защиты мозга от инфекций, распространяющихся через глазной путь [65]. При этом авторы обратили особое внимание на то, что изучаемые ими нейтрофилы — это клетки, естественным путем мигрировавшие в ткани, а не выделенные из крови, поэтому исследованная ими система *in vivo* отражает истинный комплекс взаимоотношений нейтрофилов и *P. aeruginosa*. При инфицировании роговицы глаза *P. aeruginosa* бактериальная система T3SS высвобождает токсин ExoS в направлении накопления нейтрофилов и, с одной стороны, останавливает их под слоем бактерий, давая возможность биопленке созреть, а с другой стороны, побуждает их к формированию НВЛ, которые, в свою очередь, способствуют переходу *P. aeruginosa* из планктонной формы в биопленочную. Образование непроницаемой биопленки помогает бактериям формировать устойчивость к антибиотикам, но при этом сдерживает их инвазию и распространение в мозг. Внутривенное введение животным биспецифичных антител — против T3SS и экзополисахарида Psl — способствует переходу от НВЛ-опосредованной программы уничтожения бактерий к фагоцитозу и внутриклеточному протеазоопосредованному механизму их киллинга, препятствуя образованию биопленок. Сочетанное введение антител с местным лечением антибиотиками демонстрирует эффективную ликвидацию инфекции и уменьшение воспаления глаз у мышей со сформированной биопленкой [65].

В 2020 г. группой ученых из Дании и США были опубликованы интересные результаты по исследованию взаимоотношений нейтрофилов и биопленок *P. aeruginosa in vivo* [66]. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии авторы выявили плотный контакт между нейтрофилами и биопленкой *P. aeruginosa*, сформированной на силиконовом имплантате, через 24 и 48 ч после его введения в брюшную полость мышей. Используя специальные красители совместно с техноло-

гией Click-iT® для маркировки внеклеточной ДНК (вкДНК) *in vivo* и конфокальной сканирующей лазерной микроскопией, ученые показали, что нити вкДНК нейтрофильного происхождения локализуются вокруг биопленки *P. aeruginosa*, но не внутри нее, т.е. не являются ее частью. Исследование срезов легочной ткани больных МВ методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием специфичных красителей также выявило, что фибриллы вкДНК нейтрофилов располагаются снаружи, окружая биопленки *P. aeruginosa*. Иммуногистохимические методы исследования таких компонентов НВЛ, как гистоны НЗ, цитруллинированные гистоны НЗ (citНЗ) и НЭ, и в материале от мышей, и в срезах легочной ткани человека показали, что citНЗ (основной маркер НВЛ) отсутствуют внутри биопленок *P. aeruginosa*; НЗ локализуются снаружи, т.е. вокруг, по периферии биопленки, но не совместно с ней, а НЭ колокализуются с бактериями в биопленке. Исходя из этого, авторы выдвинули гипотезу, что бактериальные биопленки *P. aeruginosa in vivo* не используют вкДНК хозяина в качестве каркаса, а скорее, экстрацеллюлярная нейтрофильная ДНК выполняет функцию своего рода оболочки вокруг биопленки (вторичный матрикс), ограничивая диссеминацию бактерий (что частично совпадает с результатами работы А. Thanabalasuriar и соавт. [65]), но и защищая ее от фагоцитоза. При этом основным источником вкДНК является некротический лизис нейтрофилов, а нетоз вносит весьма скромный вклад в этот процесс. В заключение авторы отметили, что данное исследование является первым, в котором изучается прямое распределение вкДНК хозяина и бактерий при хронических бактериальных инфекциях *in vivo*. В отличие от индукции *in vitro*, стимуляция нейтрофилов бактериальными биопленками во время хронических инфекций *in vivo*, по-видимому, не вызывает активного формирования НВЛ; однако некротизированные нейтрофилы действительно высвобождают вкДНК, гистоны НЗ и антибактериальные ферменты, такие как НЭ [66].

Нейтрофильные внеклеточные ловушки и биопленки *S. aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) — известный человеческий патоген, который может вызывать широкий спектр заболеваний — от инфекций кожи и подкожной жировой клетчатки до опасных для жизни инвазивных зоокомиальных инфекций. При хронизации стафилококковых инфекций наблюдается образование биопленок как на имплантированных конструкциях (сердечные клапаны, катетеры, суставные протезы), так и на человеческих тканях [67–71].

В 2018 г. группой ученых из США установлено, что в условиях *in vitro* биопленки метицил-

линрезистентного штамма *S. aureus* USA300, по сравнению с бактериями в планктонном состоянии, резко снижают жизнеспособность нейтрофилов и способствуют их гибели путем нетоза за счет своих секреторных белков [72]. Основную роль в индукции нетоза биопленочными бактериями играет продукция таких факторов вирулентности стафилококков, как лейкоцидин Пантона–Валентайна и γ -гемолизин АВ (лейкоцидиновый гемолизин). При этом образующиеся НВЛ не влияют на биомассу биопленки и выживаемость бактерий в ней, т.е. оказываются неэффективными в уничтожении биопленочных бактерий. Полученные *in vitro* результаты были подтверждены авторами в модели хронической ожоговой раневой инфекции у свиней, демонстрируя, что лейкоцидины *S. aureus* индуцируют нетоз и способствуют персистенции бактерий при хронических инфекциях *in vivo*. Одной из возможных причин устойчивости *S. aureus* к бактерицидной активности НВЛ, как отметили авторы, может быть продукция термонуклеазы Nuc, расщепляющей ДНК ловушек [72].

В 2019 г. группой ученых из Нидерландов были опубликованы данные о взаимоотношениях биопленок разных штаммов *S. aureus* и их фермента термонуклеазы 1 (Nuc1) с нейтрофилами *in vitro* [73]. Одним из важнейших компонентов внеклеточного биопленочного матрикса *S. aureus* является вкДНК, формированию которой способствует аутолиз бактериальных клеток, имитирующий апоптоз эукариотических клеток [74], и которая, как полагают, играет решающую роль в стабилизации структуры биопленок [75]. Однако, как установили авторы, уже с ранних стадий биопленкообразования *S. aureus* (через 1, 2, 4 ч) в IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) — среде для культивирования клеток млекопитающих — стафилококки продуцируют Nuc1, фермент, разрушающий ДНК, что, по логике, должно вызывать дестабилизацию и ремоделирование биопленки. Однако в проведенных экспериментах увеличение количества Nuc1 происходило параллельно с устойчивым формированием биопленки. Это совпадает с данными других исследований, показывающих, что на ранних этапах биопленкообразования *S. aureus* не чувствительны к ДНКазе I [76, 77]. Авторы сделали вывод, что формирование биопленки *S. aureus* в среде IMDM, в отличие от триптического соевого бульона — классической среды для культивирования бактерий, не зависит от вкДНК [73].

Также было выявлено, что *S. aureus*-биопленкоиндуцированный нетоз является АФК-независимым [73]. При этом после 90-минутной коинкубации свежесделанных нейтрофилов крови человека и 3-часовых, т.е. раннестадийных, биопленок стафилококков авторы наблюдали минимальные количества НВЛ в ответ на *S. aureus* дикого типа, в то

время как *nuc*-мутантный штамм, не образующий термонуклеазу 1, индуцировал массивное образование НВЛ. Полученные данные, с одной стороны, подтверждают, что раннестадийные биопленки *S. aureus* являются индукторами нетоза; с другой стороны, учитывая выявленную способность биопленочных бактерий уже с первых часов продуцировать термонуклеазу, разрушающую ДНК НВЛ, подобно планктонным формам *S. aureus*, свидетельствуют о способности стафилококков активно уклоняться от антимикробного влияния нейтрофилов. Требуются дальнейшие исследования для выяснения механизмов регуляции баланса между индукцией нетоза и деградацией НВЛ биопленками *S. aureus*, которые могут быть связаны с продукцией не только Nuc, но и других иммуномодулирующих факторов стафилококков [73].

Нейтрофильные внеклеточные ловушки и биопленки *Candida spp.*

Candida albicans (*C. albicans*) является широко распространенным внутрибольничным грибковым патогеном. На сосудистых, мочевых катетерах, зубных протезах и других медицинских устройствах, а также на слизистых оболочках *C. albicans* ведет биопленочный образ жизни, что способствует его устойчивости к противогрибковым средствам и защитным факторам макроорганизма, значительно снижая эффективность лечения кандидоза [7, 78–80]. Учитывая, что, с одной стороны, высвобождение НВЛ является основным способом контроля гифальных, но не дрожжевых, форм *C. albicans*, которые не могут быть фагоцитированы из-за своего размера [81], и что, с другой стороны, в биопленках *C. albicans* находится в агрегированном состоянии, допустимо предположить, что ловушкообразование может быть идеальным методом борьбы с биопленочными *C. albicans* [79].

Однако в 2016 г. группой ученых из США, изучавших взаимоотношения нейтрофилов и биопленок *C. albicans* гифального штамма SC5314 *in vitro* и *in vivo* (на модели биопленочной инфекции сосудистого катетера у крыс), установлено, что биопленочные формы *C. albicans*, в отличие от планктонных, подавляют высвобождение НВЛ [78]. Так, после 4-часовой коинкубации нейтрофилов и биопленок *C. albicans* не наблюдалось образования НВЛ, несмотря на активную миграцию и адгезию нейтрофилов к гифам гриба, в то время как планктонные формы вызывали 20-кратное повышение свободной ДНК в комплексе с цитруллинированными гистонами, оказываясь опутанными сетеподобными фибриллярными структурами. Биопленки *C. albicans* нарушали даже ФМА-индуцированное ловушкообразование. Авторы впервые определили, что ключевой механизм подавления высвобождения НВЛ биопленками *C. albicans* свя-

зан с ингибированием NADPH-оксидазы и генерации АФК у нейтрофилов такими компонентами внеклеточного биопленочного матрикса, как полисахариды α -маннаны, но не растворимыми молекулами. Кроме того, биопленочный матрикс, возможно, маскирует эпитопы клеточной стенки *C. albicans*, распознаваемые рецепторами нейтрофилов и необходимые для запуска формирования НВЛ. Таким образом, биопленочный стиль жизни позволяет *C. albicans* избегать НВЛ-опосредованного киллинга, способствуя выживаемости и резистентности биопленок к атаке нейтрофилов [78]. Помимо этого, ингибирование НВЛ может иметь более широкие последствия *in vivo*, учитывая их роль в предотвращении диссеминации микробов, «разоблачении» эпитопов для распознавания грибов, рекрутировании дополнительных воспалительных клеток [78, 82, 83].

В следующем своем исследовании 2017 г. эта же группа ученых изучала реакцию нейтрофилов на 4 клинических изолята (штамма) *C. albicans*, отобранных по их различиям в биопленкообразующей способности, архитектуре формируемых биопленок и степени филаментации: SC5314 (как и в предыдущем исследовании [78]), 3153, 98-210 и 98-17 [79]. Штамм 3153 демонстрировал биопленочную архитектуру, аналогичную контрольному штамму SC5314, образуя плотную биопленку с внешним слоем, состоящим почти целиком из гифальных клеток. Заметно более низкая степень образования гиф наблюдалась у биопленок, сформированных штаммами 98-210 и особенно 98-17, которые содержали преимущественно дрожжевые формы на поверхности биопленки. Толщина биопленок коррелировала со способностью к гифообразованию: штаммы, демонстрирующие высшую степень филаментации, — SC5314 и 3153 — формировали самые толстые биопленки. При этом было установлено, что биопленки *C. albicans*, вне зависимости от штамма, после 4-часовой инкубации с нейтрофилами не вызывают ловушкообразования, ингибируя нетоз, в то время как планктонные формы всех 4 изучаемых изолятов индуцируют образование НВЛ. Полученные данные позволили авторам предположить, что гифальная архитектура биопленок не имеет решающего значения для ингибирования высвобождения НВЛ и даже биопленки, состоящие преимущественно из дрожжевых морфотипов, сохраняют способность нарушать функции нейтрофилов, что подтверждает большую значимость в угнетении ловушкообразования других специфичных для биопленки компонентов, таких как внеклеточный матрикс [79]. В то время как предыдущее исследование выявило ингибирование биопленкой штамма SC5314 продукции АФК нейтрофилов [78], текущее исследование показало, что данная супрессия является штаммзависимой [79]. Так, биопленка,

образованная штаммом 98-210, в отличие от других изолятов, вызывала образование АФК у нейтрофилов. Сохранение при этом НВЛ-подавляющей активности биопленки данного штамма *C. albicans* указывает на возможное расхождение путей ингибирования формирования АФК и НВЛ, индуцированных биопленками. Для дальнейшего изучения этих сложных ингибирующих путей необходимы дополнительные исследования [79].

В 2018 г. той же группой ученых было установлено, что предварительная обработка биопленок *C. albicans* препаратами из группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) способствует образованию НВЛ [80], что, вероятно, может служить проявлением синергичного действия нейтрофилов и лекарственных средств данного класса в борьбе с кандидозом [80, 84]. Эхинокандины нарушают целостность клеточной стенки грибковых патогенов, вызывая демаскировку β -глюкана, провоспалительного полисахарида, который может служить триггером для ловушкообразования нейтрофилов [80, 85].

В 2019 г. польскими учеными были опубликованы результаты по изучению влияния 3 ауторегуляторных QS-молекул *C. albicans* (фарнезола, фарнезиловой кислоты и тирозола) на ловушкообразование нейтрофилов [24]. Интересно, что, с одной стороны, фарнезол, вырабатываемый у грибов в ответ на повышение плотности клеток, предотвращает образование биопленок и блокирует переход из бластоспор в гифы [86]. С другой стороны, бластоспоры, как частицы более мелких размеров, чем гифы, индуцируют нетоз в меньшей степени [81]. Возможно, таким образом, что грибы используют фарнезол, ингибируя свою филаментацию и прогрессию инфекции, как способ избежать внимания нейтрофилов и выжить в среде, инфильтрированной ими [24]. Однако польскими учеными было впервые установлено, что фарнезол, но не фарнезиловая кислота и тирозол, вызывает активацию АФК-зависимого пути нетоза нейтрофилов и усиливает их хемотаксис через CD11b/CD18- и TLR2-рецепторы. Таким образом, нейтрофилы все-таки «слышат» QS-язык грибов, что способствует защите организма от *C. albicans* [24].

Помимо *C. albicans* были исследованы взаимоотношения биопленочных форм *C. glabrata* (одного из наиболее часто встречающихся возбудителей не-*albicans* кандидоза) и НВЛ [7]. *C. glabrata* образует только относительно небольшие (1–4 мкм) дрожжевые формы, в отличие от *C. albicans*, формирующего более крупные (4–7 мкм) дрожжевые морфотипы, а также нитевидные формы (псевдогифы и гифы). После 4-часового совместного культивирования нейтрофилов с 24-часовыми биопленками *C. glabrata* из овоидных дрожжевых клеток с помощью сканирующей электронной микроскопии были визуализированы

сетчатые структуры, исходящие из гранулоцитов, что указывало на образование НВЛ, однако интенсивность и динамика формирования НВЛ были значительно ниже, чем в ответ на планктонные формы *C. glabrata*. Из этого авторы заключили, что отсроченное и нарушенное высвобождение НВЛ является потенциальным механизмом эвазии биопленок *C. glabrata* от врожденного иммунитета [7].

Использование дифенилен-йодония, фармакологического ингибитора NADPH-оксидазы [32], не влияло на нетоз, индуцированный биопленочными формами *C. glabrata*, предполагая участие альтернативного, АФК-независимого пути высвобождения НВЛ. При этом авторы установили, что как биопленочные, так и планктонные формы *C. glabrata* индуцируют высвобождение НВЛ через фагоцитоз-зависимый путь, отличный от механизма индукции ФМА. Данный процесс включает фагоцитоз дрожжевых клеток с последующей экструзией ДНК с цитруллинированными гистонами и гибелью нейтрофила. В то время как гифальные формы *C. albicans* являются более мощным триггером для высвобождения НВЛ, чем дрожжевые [81, 87], индукция нетоза с помощью дрожжевых морфотипов *C. glabrata* указывает на различия нейтрофильного ответа и подчеркивает важность индивидуального для каждого вида изучения взаимодействий хозяина и патогена [7]. В основе различий НВЛ-формирования в ответ на биопленки *C. albicans* и *C. glabrata* могут лежать отличия в структуре биопленочной архитектуры и/или внеклеточного матрикса. Таким образом, несмотря на то, что биопленки *C. glabrata*, в отличие от *C. albicans*, «дозволяют» НВЛ высвободиться, хотя и в меньшей степени, чем планктонные формы, ингибирующая НВЛ-модифицирующая активность и нарушение функций нейтрофилов — это общая черта биопленок разных видов *Candida*, служащая для избежания нейтрофильной атаки [7].

Заключение

Влияние биопленочных микроорганизмов на функции нейтрофилов, в частности на формирование НВЛ, неоднозначно, порой разнонаправленно и зависит от ряда факторов, включая как особенности самого возбудителя, так и условия проведения экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo*. Однако не вызывает сомнений, что микробные биопленки, являясь целью нейтрофилов, пытаются не только «разоружить» противника, но и использовать его оружие для достижения своих целей. Дальнейшее детальное изучение взаимоотношений микробов в биопленках и НВЛ поможет не только расширить наши представления о механизмах персистенции возбудителей биопленочных инфекций, но и, возможно, разработать новые подходы к их лечению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303(5663): 1532–5. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
2. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J. Innate Immun*. 2018; 10(5-6): 414–21. <https://doi.org/10.1159/000489829>
3. Saitoh T., Komano J., Saitoh Y., Misawa T., Takahama M., Kozaki T., et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012; 12(1): 109–16. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.015>
4. Jenne C.N., Wong C.H.Y., Zemp F.J., McDonald B., Rahman M.M., Forsyth P.A., et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 2013; 13(2): 169–80. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.01.005>
5. Nel J.G., Theron A.J., Pool R., Durandt C., Tintinger G.R., Anderson R. Neutrophil extracellular traps and their role in health and disease. *South Afr. J. Sci.* 2016; 112(1/2). <https://doi.org/10.17159/sajs.2016/20150072>
6. Schönrich G., Raftery M.J. Neutrophil extracellular traps go viral. *Front. Immunol.* 2016; 7: 366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00366>
7. Johnson C.J., Kernien J.F., Hoyer A.R., Nett J.E. Mechanisms involved in the triggering of neutrophil extracellular traps (NETs) by *Candida glabrata* during planktonic and biofilm growth. *Sci. Rep.* 2017; 7: 13065. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13588-6>
8. Seki M. The role of neutrophil extracellular traps in infectious diseases. *J. Infect. Dis. Ther.* 2017; 5(3). <https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000321>
9. Burgener S.S., Schroder K. Neutrophil extracellular traps in host defense. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019; 12(7): a037028. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037028>
10. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318–22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
11. Meyle E., Stroh P., Günther F., Hoppy-Tichy T., Wagner C., Hänsch G.M. Destruction of bacterial biofilms by polymorphonuclear neutrophils: relative contribution of phagocytosis, DNA release, and degranulation. *Int J. Artif. Organs*. 2010; 33(9): 608–20. <https://doi.org/10.1177/039139881003300906>
12. Høiby N., Bjarnsholt T., Moser C., Jensen P.Ø., Kolpen M., Qvist T., et al. Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *APMIS*. 2017; 125(4): 339–43. <https://doi.org/10.1111/apm.12689>
13. Khatoon Z., McTiernan C.D., Suuronen E.J., Mah T.F., Alarcon E.I. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*. 2018 4(12): e01067. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01067>
14. Борисова М.И., Лазакович Д.Н., Сидорова Н.А., Савушкин А.И. Биопленкообразующая активность и феномен персистенции микроорганизмов. *Journal of Biomedical Technologies*. 2015; (2): 28–35.
15. Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012; 67(12): 22–9.
16. Zarnowski R., Westler W.M., Lacmbouh G.A., Marita J.M., Bothe J.R., Bernhardt J., et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio*. 2014; 5(4): e01333-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01333-14>
17. Wang S., Liu X., Liu H., Zhang L., Guo Y., Yu S., et al. The exopolysaccharide psl–eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol. Rep.* 2015; 7(2): 330–40. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12252>
18. Lee K., Yoon S.S. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 27(6): 1053–64. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>
19. Ray V.A., Hill P.J., Stover C.K., Roy S., Sen C.K., Yu L., et al. Anti-psl targeting of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms for neutrophil-mediated disruption. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 16065. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16215-6>
20. Galdiero E., Lombardi L., Falanga A., Libralato G., Guida M., Carotenuto R. Biofilms: novel strategies based on antimicrobial peptides. *Pharmaceutics*. 2019; 11(7): 322. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070322>
21. Geddes-McAlister J., Kugadas A., Gadjeva M. Tasked with a challenging objective: why do neutrophils fail to battle *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pathogens*. 2019; 8(4): 283. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040283>
22. Deng B., Ghatak S., Sarkar S., Singh K., Das Ghatak P., Mathew-Steiner S.S., et al. Novel bacterial diversity and fragmented eDNA identified in hyperbiofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* rugose small colony variant. *iScience*. 2020; 23(2): 100827. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100827>
23. Omar A., Wright J.B., Schultz G., Burrell R., Nadworny P. Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*. 2017; 5(1): 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5010009>
24. Zawrotniak M., Wojtalik K., Rapala-Kozik M. Farnesol, a quorum-sensing molecule of *Candida albicans* triggers the release of neutrophil extracellular traps. *Cells*. 2019; 8(12): 1611. <https://doi.org/10.3390/cells8121611>
25. Urban C.F., Ermer D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>
26. Khandpur R., Carmona-Rivera C., Vivekanandan-Giri A., Gizinski A., Yalavarthi S., Knight J.S., et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(178): 178ra40. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005580>
27. Dwyer M., Shan Q., D'Ortona S., Maurer R., Mitchell R., Olesen H., et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J. Innate Immun.* 2014; 6(6): 765–79. <https://doi.org/10.1159/000363242>
28. Rahman S., Gadjeva M. Does NETosis contribute to the bacterial pathoadaptation in cystic fibrosis? *Front. Immunol.* 2014; 5: 378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00378>
29. Ravindran M., Khan M.A., Palaniyar N. Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology. *Biomolecules*. 2019; 9(8): 365. <https://doi.org/10.3390/biom9080365>
30. Takishita Y., Yasuda H., Shimizu M., Matsuo A., Morita A., Tsutsumi T., et al. Formation of neutrophil extracellular traps in mitochondrial DNA-deficient cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020; 66(1): 15–23. <https://doi.org/10.3164/jcjb.19-77>
31. Kaplan M.J., Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol.* 2012; 189(6): 2689–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>
32. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2007; 176(2): 231–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
33. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. *Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов*. М.; 2009.
34. Papaouannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell. Biol.* 2010; 191(3): 677–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>
35. Долгушин И.И., Савочкина А.Ю., Курносенко И.В., Долгушина В.Ф., Савельева А.А., Самусева И.В. и др. Участие

- внеклеточных ДНК-ловушек в защитных и патологических реакциях организма. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9(2): 164–70.
36. Sollberger G., Choidas A., Burn G.L., Habenberger P., Di Lucrezia R., Kordes S., et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci. Immunol.* 2018; 3(26): eaar6689. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6689>
37. Thiam H.R., Wong S.L., Qiu R., Kittisopikul M., Vahabikashi A., Goldman A.E., et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *PNAS.* 2020; 117(13): 7326–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909546117>
38. Neeli I., Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front. Immunol.* 2013; 4: 38. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00038>
39. Douda D.N., Khan M.A., Grasmann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *PNAS.* 2015; 112(9): 2817–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414055112>
40. Li P., Li M., Lindberg M.R., Kennett M.J., Xiong N., Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 2010; 207(9): 1853–62. <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>
41. Tatsiy O., McDonald P.P. Physiological stimuli induce PAD4-dependent, ROS-independent NETosis, with early and late events controlled by discrete signaling pathways. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2036. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02036>
42. Parker H., Dragunow M., Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* 2012; 92(4): 841–9. <https://doi.org/10.1189/jlb.1211601>
43. Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *ELife.* 2017; 6: e24437. <https://doi.org/10.7554/elife.24437>
44. Naffah de Souza C., Breda L.C.D., Khan M.A., de Almeida S.R., Camara N.O.S., Swezey N., et al. Promotes NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation: a matter of mitochondrial reactive oxygen species generation and citrullination and cleavage of histone. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1849. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01849>
45. Chatfield S.M., Grebe K., Whitehead L.W., Rogers K.L., Nebl T., Murphy J.M., et al. Monosodium urate crystals generate nuclease-resistant neutrophil extracellular traps via a distinct molecular pathway. *J. Immunol.* 2018; 200(5): 1802–16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701382>
46. Khan M.A., Pace-Asciak C., Al-Hassan J.M., Afzal M., Liu Y.F., Oommen S., et al. Furanoid f-acid F6 uniquely induces NETosis compared to C16 and C18 fatty acids in human neutrophils. *Biomolecules.* 2018; 8(4): 144. <https://doi.org/10.3390/biom8040144>
47. Khan M.A., Ali Z.S., Swezey N., Grasmann H., Palaniyar N. Progression of cystic fibrosis lung disease from childhood to adulthood: neutrophils, neutrophil extracellular trap (NET) formation, and NET degradation. *Genes.* 2019; 10(3): 183. <https://doi.org/10.3390/genes10030183>
48. Zhou Y., Song K., Painter R.G., Aiken M., Reiser J., Stanton B.A., et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator recruitment to phagosomes in neutrophils. *J. Innate Immun.* 2013; 5(3): 219–30. <https://doi.org/10.1159/000346568>
49. Rada B. Interactions between neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Pathogens.* 2017; 6(1): 10. <https://doi.org/10.3390/pathogens6010010>
50. Hayes E., Pohl K., McElvaney N.G., Reeves E.P. The cystic fibrosis neutrophil: a specialized yet potentially defective cell. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 2011; 59(2): 97–112. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0113-6>
51. Walker T.S., Tomlin K.L., Worthen G.S., Poch K.R., Lieber J.G., Saavedra M.T., et al. Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect. Immun.* 2005; 73(6): 3693–701. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3693-3701.2005>
52. Parks Q.M., Young R.L., Poch K.R., Malcolm K.C., Vasil M.L., Nick J.A. Neutrophil enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: human f-actin and DNA as targets for therapy. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(4): 492–502. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.005728-0>
53. Robertson D.M., Parks Q.M., Young R.L., Kret J., Poch K.R., Malcolm K.C., et al. Disruption of contact lens-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formed in the presence of neutrophils. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52(5): 2844–50. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6469>
54. Floyd M., Winn M., Cullen C., Sil P., Chassaing B., Yoo D.G., et al. Swimming motility mediates the formation of neutrophil extracellular traps induced by flagellated *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 2016; 12(11): e1005987. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005987>
55. Rada B., Jendrysik M.A., Pang L., Hayes C.P., Yoo D.G., Park J.J., et al. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054205>
56. Rada B., Lekstrom K., Damian S., Dupuy C., Leto T.L. The pseudomonas toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. *J. Immunol.* 2008; 181(7): 4883–93. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4883>
57. Rada B., Leto T.L. Redox warfare between airway epithelial cells and pseudomonas: dual oxidase versus pyocyanin. *Immunol. Res.* 2009; 43(1-3): 198–209. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8071-8>
58. Rada B., Gardina P., Myers T.G., Leto T.L. Reactive oxygen species mediate inflammatory cytokine release and EGFR-dependent mucin secretion in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas pyocyanin*. *Mucosal Immunol.* 2011; 4(2): 158–71. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.62>
59. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2015; 17(3): 170–86.
60. Skorpelja-Gardner S., Theprungsirikul J., Lewis K.A., Hammond J.H., Carlson K.M., Hazlett H.F., et al. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa*-mediated neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01670>
61. Young R.L., Malcolm K.C., Kret J.E., Caceres S.M., Poch K.R., Nichols D.P., et al. Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS One.* 2011; 6(9): e23637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023637>
62. Limoli D.H., Rockel A.B., Host K.M., Jha A., Kopp B.T., Hollis T., et al. Cationic antimicrobial peptides promote microbial mutagenesis and pathoadaptation in chronic infections. *PLoS Pathog.* 2014; 10(4): e1004083. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004083>
63. Feltner J.B., Wolter D.J., Pope C.E., Groleau M.C., Smalley N.E., Greenberg E.P., et al. LasR variant cystic fibrosis isolates reveal an adaptable quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio.* 2016; 7(5): e01513–6. <https://doi.org/10.1128/mBio.01513-16>
64. Hoffman L.R., Kulasekara H.D., Emerson J., Houston L.S., Burns J.L., Ramsey B.W., et al. *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J. Cyst. Fibros.* 2009; 8(1): 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.09.006>

65. Thanabalasuriar A., Scott B.N.V., Peiseler M., Willson M.E., Zeng Z., Warrener P., et al. Neutrophil extracellular traps confine *Pseudomonas aeruginosa* ocular biofilms and restrict brain invasion. *Cell Host Microbe*. 2019; 25(4): 526–36. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.02.007>
66. Alhede M., Qvortrup K., Kragh K.N., Jensen P.Ø., Stewart P.S., Bjarnsholt T. The origin of extracellular DNA in bacterial biofilm infections *in vivo*. *Pathogens Dis*. 2020; 78(2): ftaa018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa018>
67. Lew D.P., Waldvogel F.A. Osteomyelitis. *Lancet*. 2004; 364(9431): 369–79. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16727-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16727-5)
68. Brady R.A., Leid J.G., Calhoun J.H., Costerton J.W., Shirtliff M.E. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2008; 52(1): 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x>
69. Ashong C.N., Raheem S.A., Hunter A.S., Mindru C., Barshes N.R. Methicillin-resistant staphylococcus aureus in foot osteomyelitis. *Surg. Infect*. 2017; 18(2): 143–8. <https://doi.org/10.1089/sur.2016.165>
70. Ferrando A., Part J., Baeza J. Treatment of cavitory bone defects in chronic osteomyelitis: biogactive glass S53P4 vs. calcium sulphate antibiotic beads. *J. Bone Jt. Infect*. 2017; 2(4): 194–201. <https://doi.org/10.7150/jbji.20404>
71. de Vor L., Rooijackers S.H.M., van Strijp J.A.G. Staphylococci evade the innate immune response by disarming neutrophils and forming biofilms. *FEBS Lett*. 2020; 594(16): 2556–69. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13767>
72. Bhattacharya M., Berends E.T.M., Chan R., Schwab E., Roy S., Sen C.K., et al. *Staphylococcus aureus* biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. *PNAS*. 2018; 115(28): 7416–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721949115>
73. Sultan A.R., Hoppenbrouwers T., Lemmens-den Toom N.A., Snijders S.V., van Neck J.W., Verbon A., et al. During the early stages of *Staphylococcus aureus* biofilm formation, induced neutrophil extracellular traps (NETs) are degraded by autologous thermonuclease. *Infect. Immun*. 2019; 87(12): e00605-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00605-19>
74. Montanaro L., Poggi A., Visai L., Ravaioli S., Campoccia D., Speziale P., et al. Extracellular DNA in biofilms. *Int. J. Artif. Organs*. 2011; 34(9): 824–31. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000051>
75. Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002; 295(5559): 1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
76. Grande R., Nistico L., Sambanthamoorthy K., Longwell M., Iannitelli A., Cellini L., et al. Temporal expression of agrB, cidA, and alsS in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates. *Pathog. Dis*. 2014; 70(3): 414–22. <https://doi.org/10.1111/2049-632x.12158>
77. Moormeier D.E., Bose J.L., Horswill A.R., Bayles K.W. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *mBio*. 2014; 5(5): e01341–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01341-14>
78. Johnson C.J., Cabezas-Olcoz J., Kernien J.F., Wang S.X., Beebe D.J., Huttenlocher A., et al. The extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog*. 2016; 12(9): e1005884. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005884>
79. Kernien J.F., Johnson C.J., Nett J.E. Conserved inhibition of neutrophil extracellular trap release by clinical *Candida albicans* biofilms. *J. Fungi*. 2017; 3(3): 49. <https://doi.org/10.3390/jof3030049>
80. Hoyer A.R., Johnson C.J., Hoyer M.R., Kernien J.F., Nett J.E. Echinocandin treatment of candida albicans biofilms enhances neutrophil extracellular trap formation. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2018; 62(9): e00797–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00797-18>
81. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., Wang Q., Gutierrez M.G., Brown G.D., et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol*. 2014; 15(11): 1017–25. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>
82. Uppuluri P., Chaturvedi A.K., Srinivasan A., Banerjee M., Ramasubramanian A.K., Köhler J.R., et al. Dispersion as an important step in the candida albicans biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*. 2010; 6(3): e1000828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>
83. Hopke A., Nicke N., Hidu E.E., Degani G., Popolo L., Wheeler R.T. Neutrophil attack triggers extracellular trap-dependent *Candida* cell wall remodeling and altered immune recognition. *PLoS Pathog*. 2016; 12(5): e1005644. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005644>
84. Katragkou A., Kruhlak M.J., Simitopoulou M., Chatzimochou A., Taparkou A., Cotten C.J., et al. Interactions between human phagocytes and candida albicans biofilms alone and in combination with antifungal agents. *J. Infect. Dis*. 2010; 201(12): 1941–9. <https://doi.org/10.1086/652783>
85. Byrd A.S., O'Brien X.M., Johnson C.M., Lavigne L.M., Reicher J.S. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J. Infect. Dis*. 2010; 201(12): 1941–49. <https://doi.org/10.1086/652783>
86. Шпаков А.О. Внутри- и межвидовая хемокоммуникация у грибов. *Микология и фитопатология*. 2009; 43(6): 490–505.
87. Kenno S., Perito S., Mosci P., Vecchiarelli A., Monari C. Autophagy and reactive oxygen species are involved in neutrophil extracellular traps release induced by *C. albicans* morphotypes. *Front. Microbiol*. 2016; 7: 879. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00879>

REFERENCES

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303(5663): 1532–5. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
2. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J. Innate Immun*. 2018; 10(5-6): 414–21. <https://doi.org/10.1159/000489829>
3. Saitoh T., Komano J., Saitoh Y., Misawa T., Takahama M., Kozaki T., et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012; 12(1): 109–16. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.015>
4. Jenne C.N., Wong C.H.Y., Zemp F.J., McDonald B., Rahman M.M., Forsyth P.A., et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe*. 2013; 13(2): 169–80. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.01.005>
5. Nel J.G., Theron A.J., Pool R., Durandt C., Tintinger G.R., Anderson R. Neutrophil extracellular traps and their role in health and disease. *South Afr. J. Sci*. 2016; 112(1/2). <https://doi.org/10.17159/sajs.2016/20150072>
6. Schönrich G., Raftery M.J. Neutrophil extracellular traps go viral. *Front. Immunol*. 2016; 7: 366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00366>
7. Johnson C.J., Kernien J.F., Hoyer A.R., Nett J.E. Mechanisms involved in the triggering of neutrophil extracellular traps (NETs) by *Candida glabrata* during planktonic and biofilm growth. *Sci. Rep*. 2017; 7: 13065. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13588-6>
8. Seki M. The role of neutrophil extracellular traps in infectious diseases. *J. Infect. Dis. Ther*. 2017; 5(3). <https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000321>

9. Burgener S.S., Schroder K. Neutrophil extracellular traps in host defense. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019; 12(7): a037028. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037028>
10. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418): 1318–22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
11. Meyle E., Stroh P., Günther F., Hoppy-Tichy T., Wagner C., Hänsch G.M. Destruction of bacterial biofilms by polymorphonuclear neutrophils: relative contribution of phagocytosis, DNA release, and degranulation. *Int J. Artif. Organs.* 2010; 33(9): 608–20. <https://doi.org/10.1177/039139881003300906>
12. Høiby N., Bjarnsholt T., Moser C., Jensen P.Ø., Kolpen M., Qvist T., et al. Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *APMIS.* 2017; 125(4): 339–43. <https://doi.org/10.1111/apm.12689>
13. Khatoun Z., McTiernan C.D., Suuronen E.J., Mah T.F., Alarcon E.I. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon.* 2018 4(12): e01067. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01067>
14. Borisova M.I., Lazakovich D.N., Sidorova N.A., Savushkin A.I. Biofilm-forming activity and the phenomenon of persistence in microorganisms. *Journal of Biomedical Technologies.* 2015; (2): 28–35. (in Russian)
15. Chebotar' I.V. Mechanisms of antibiofilm immunity. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2012; 67(12): 22–9. (in Russian)
16. Zarnowski R., Westler W.M., Lacmbouh G.A., Marita J.M., Bothe J.R., Bernhardt J., et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio.* 2014; 5(4): e01333-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01333-14>
17. Wang S., Liu X., Liu H., Zhang L., Guo Y., Yu S., et al. The exopolysaccharide psl–eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol. Rep.* 2015; 7(2): 330–40. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12252>
18. Lee K., Yoon S.S. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017; 27(6): 1053–64. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>
19. Ray V.A., Hill P.J., Stover C.K., Roy S., Sen C.K., Yu L., et al. Anti-psl targeting of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms for neutrophil-mediated disruption. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 16065. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16215-6>
20. Galdiero E., Lombardi L., Falanga A., Libralato G., Guida M., Carotenuto R. Biofilms: novel strategies based on antimicrobial peptides. *Pharmaceutics.* 2019; 11(7): 322. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070322>
21. Geddes-McAlister J., Kugadas A., Gadjeva M. Tasked with a challenging objective: why do neutrophils fail to battle *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pathogens.* 2019; 8(4): 283. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040283>
22. Deng B., Ghatak S., Sarkar S., Singh K., Das Ghatak P., Matthew-Steiner S.S., et al. Novel bacterial diversity and fragmented eDNA identified in hyperbiofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* rugose small colony variant. *iScience.* 2020; 23(2): 100827. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100827>
23. Omar A., Wright J.B., Schultz G., Burrell R., Nadworny P. Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms.* 2017; 5(1): 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5010009>
24. Zawrotniak M., Wojtalik K., Rapala-Kozik M. Farnesol, a quorum-sensing molecule of *Candida albicans* triggers the release of neutrophil extracellular traps. *Cells.* 2019; 8(12): 1611. <https://doi.org/10.3390/cells8121611>
25. Urban C.F., Ermert D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>
26. Khandpur R., Carmona-Rivera C., Vivekanandan-Giri A., Gizinski A., Yalavarthi S., Knight J.S., et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(178): 178ra40. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005580>
27. Dwyer M., Shan Q., D'Ortona S., Maurer R., Mitchell R., Olesen H., et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J. Innate Immun.* 2014; 6(6): 765–79. <https://doi.org/10.1159/000363242>
28. Rahman S., Gadjeva M. Does NETosis contribute to the bacterial pathoadaptation in cystic fibrosis? *Front. Immunol.* 2014; 5: 378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00378>
29. Ravindran M., Khan M.A., Palaniyar N. Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology. *Biomolecules.* 2019; 9(8): 365. <https://doi.org/10.3390/biom9080365>
30. Takishita Y., Yasuda H., Shimizu M., Matsuo A., Morita A., Tsutsumi T., et al. Formation of neutrophil extracellular traps in mitochondrial DNA-deficient cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020; 66(1): 15–23. <https://doi.org/10.3164/jcbn.19-77>
31. Kaplan M.J., Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol.* 2012; 189(6): 2689–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>
32. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2007; 176(2): 231–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
33. Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. *Neutrophil Extracellular Traps and Methods for Evaluating the Functional Status of Neutrophils [Neytrofil'nye vneketochnye lovushki i metody otsenki funktsional'nogo statusa neytrofilov]*. Moscow; 2009. (in Russian)
34. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010; 191(3): 677–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>
35. Dolgushin I.I., Savochkina A.Yu., Kurnosenko I.V., Dolgushina V.F., Savel'eva A.A., Samuseva I.V. i dr. Participation of extracellular dna traps in protective and pathological reactions of the organism. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal.* 2015; 9(2): 164–70. (in Russian)
36. Sollberger G., Choidas A., Burn G.L., Habenberger P., Di Lucrezia R., Kordes S., et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci. Immunol.* 2018; 3(26): eaar6689. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6689>
37. Thiam H.R., Wong S.L., Qiu R., Kittisopikul M., Vahabikashi A., Goldman A.E., et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *PNAS.* 2020; 117(13): 7326–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909546117>
38. Neeli I., Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front. Immunol.* 2013; 4: 38. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00038>
39. Douda D.N., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *PNAS.* 2015; 112(9): 2817–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414055112>
40. Li P., Li M., Lindberg M.R., Kennett M.J., Xiong N., Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 2010; 207(9): 1853–62. <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>
41. Tsiy O., McDonald P.P. Physiological stimuli induce PAD4-dependent, ROS-independent NETosis, with early and late events controlled by discrete signaling pathways. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2036. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02036>

42. Parker H., Dragunow M., Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* 2012; 92(4): 841–9. <https://doi.org/10.1189/jlb.1211601>
43. Kenny E.F., Herzog A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *ELife.* 2017; 6: e24437. <https://doi.org/10.7554/elife.24437>
44. Naffah de Souza C., Breda L.C.D., Khan M.A., de Almeida S.R., Camara N.O.S., Swezey N., et al. Promotes NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation: a matter of mitochondrial reactive oxygen species generation and citrullination and cleavage of histone. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1849. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01849>
45. Chatfield S.M., Grebe K., Whitehead L.W., Rogers K.L., Nebl T., Murphy J.M., et al. Monosodium urate crystals generate nuclease-resistant neutrophil extracellular traps via a distinct molecular pathway. *J. Immunol.* 2018; 200(5): 1802–16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701382>
46. Khan M.A., Pace-Asciak C., Al-Hassan J.M., Afzal M., Liu Y.F., Oommen S., et al. Furanoid f-acid F6 uniquely induces NETosis compared to C16 and C18 fatty acids in human neutrophils. *Biomolecules.* 2018; 8(4): 144. <https://doi.org/10.3390/biom8040144>
47. Khan M.A., Ali Z.S., Swezey N., Grasmann H., Palaniyar N. Progression of cystic fibrosis lung disease from childhood to adulthood: neutrophils, neutrophil extracellular trap (NET) formation, and NET degradation. *Genes.* 2019; 10(3): 183. <https://doi.org/10.3390/genes10030183>
48. Zhou Y., Song K., Painter R.G., Aiken M., Reiser J., Stanton B.A., et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator recruitment to phagosomes in neutrophils. *J. Innate Immun.* 2013; 5(3): 219–30. <https://doi.org/10.1159/000346568>
49. Rada B. Interactions between neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Pathogens.* 2017; 6(1): 10. <https://doi.org/10.3390/pathogens6010010>
50. Hayes E., Pohl K., McElvaney N.G., Reeves E.P. The cystic fibrosis neutrophil: a specialized yet potentially defective cell. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 2011; 59(2): 97–112. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0113-6>
51. Walker T.S., Tomlin K.L., Worthen G.S., Poch K.R., Lieber J.G., Saavedra M.T., et al. Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect. Immun.* 2005; 73(6): 3693–701. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3693-3701.2005>
52. Parks Q.M., Young R.L., Poch K.R., Malcolm K.C., Vasil M.L., Nick J.A. Neutrophil enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: human f-actin and DNA as targets for therapy. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(4): 492–502. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.005728-0>
53. Robertson D.M., Parks Q.M., Young R.L., Kret J., Poch K.R., Malcolm K.C., et al. Disruption of contact lens-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formed in the presence of neutrophils. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52(5): 2844–50. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6469>
54. Floyd M., Winn M., Cullen C., Sil P., Chassaing B., Yoo D.G., et al. Swimming motility mediates the formation of neutrophil extracellular traps induced by flagellated *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 2016; 12(11): e1005987. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005987>
55. Rada B., Jendrysik M.A., Pang L., Hayes C.P., Yoo D.G., Park J.J., et al. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054205>
56. Rada B., Lekstrom K., Damian S., Dupuy C., Leto T.L. The *Pseudomonas* toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. *J. Immunol.* 2008; 181(7): 4883–93. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4883>
57. Rada B., Leto T.L. Redox warfare between airway epithelial cells and pseudomonas: dual oxidase versus pyocyanin. *Immunol. Res.* 2009; 43(1-3): 198–209. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8071-8>
58. Rada B., Gardina P., Myers T.G., Leto T.L. Reactive oxygen species mediate inflammatory cytokine release and EGFR-dependent mucin secretion in airway epithelial cells exposed to pseudomonas pyocyanin. *Mucosal Immunol.* 2011; 4(2): 158–71. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.62>
59. Lazareva A.V., Chebotar' I.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar' V.I., Mayanskiy N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2015; 17(3): 170–86. (in Russian)
60. Skopelja-Gardner S., Theprungsirikul J., Lewis K.A., Hammond J.H., Carlson K.M., Hazlett H.F., et al. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa*-mediated neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01670>
61. Young R.L., Malcolm K.C., Kret J.E., Caceres S.M., Poch K.R., Nichols D.P., et al. Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of pseudomonas aeruginosa: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS One.* 2011; 6(9): e23637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023637>
62. Limoli D.H., Rockel A.B., Host K.M., Jha A., Kopp B.T., Hollis T., et al. Cationic antimicrobial peptides promote microbial mutagenesis and pathoadaptation in chronic infections. *PLoS Pathog.* 2014; 10(4): e1004083. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004083>
63. Feltner J.B., Wolter D.J., Pope C.E., Groleau M.C., Smalley N.E., Greenberg E.P., et al. LasR variant cystic fibrosis isolates reveal an adaptable quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio.* 2016; 7(5): e01513–6. <https://doi.org/10.1128/mBio.01513-16>
64. Hoffman L.R., Kulasekara H.D., Emerson J., Houston L.S., Burns J.L., Ramsey B.W., et al. *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J. Cyst. Fibros.* 2009; 8(1): 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.09.006>
65. Thanabalasuriar A., Scott B.N.V., Peiseler M., Willson M.E., Zeng Z., Warren P., et al. Neutrophil extracellular traps confine pseudomonas aeruginosa ocular biofilms and restrict brain invasion. *Cell Host Microbe.* 2019; 25(4): 526–36. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.02.007>
66. Alhede M., Qvortrup K., Kragh K.N., Jensen P.Ø., Stewart P.S., Bjarnsholt T. The origin of extracellular DNA in bacterial biofilm infections *in vivo*. *Pathogens Dis.* 2020; 78(2): ftaa018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa018>
67. Lew D.P., Waldvogel F.A. Osteomyelitis. *Lancet.* 2004; 364(9431): 369–79. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16727-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16727-5)
68. Brady R.A., Leid J.G., Calhoun J.H., Costerton J.W., Shirtliff M.E. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008; 52(1): 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x>
69. Ashong C.N., Raheem S.A., Hunter A.S., Mindru C., Barshes N.R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in foot osteomyelitis. *Surg. Infect.* 2017; 18(2): 143–8. <https://doi.org/10.1089/sur.2016.165>
70. Ferrando A., Part J., Baeza J. Treatment of cavitory bone defects in chronic osteomyelitis: bioactive glass S53P4 vs. calcium sulphate antibiotic beads. *J. Bone Jt. Infect.* 2017; 2(4): 194–201. <https://doi.org/10.7150/jbji.20404>
71. de Vor L., Rooijackers S.H.M., van Strijp J.A.G. *Staphylococci* evade the innate immune response by disarming neutrophils and

- forming biofilms. *FEBS Lett.* 2020; 594(16): 2556–69. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13767>
72. Bhattacharya M., Berends E.T.M., Chan R., Schwab E., Roy S., Sen C.K., et al. *Staphylococcus aureus* biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. *PNAS.* 2018; 115(28): 7416–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721949115>
73. Sultan A.R., Hoppenbrouwers T., Lemmens-den Toom N.A., Snijders S.V., van Neck J.W., Verbon A., et al. During the early stages of staphylococcus aureus biofilm formation, induced neutrophil extracellular traps (NETs) are degraded by autologous thermonuclease. *Infect. Immun.* 2019; 87(12): e00605-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00605-19>
74. Montanaro L., Poggi A., Visai L., Ravaioli S., Campoccia D., Speziale P., et al. Extracellular DNA in biofilms. *Int. J. Artif. Organs.* 2011; 34(9): 824–31. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000051>
75. Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002; 295(5559): 1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
76. Grande R., Nistico L., Sambanthamoorthy K., Longwell M., Iannitelli A., Cellini L., et al. Temporal expression of agrB, cidA, and alsS in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates. *Pathog. Dis.* 2014; 70(3): 414–22. <https://doi.org/10.1111/2049-632x.12158>
77. Moormeier D.E., Bose J.L., Horswill A.R., Bayles K.W. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *mBio.* 2014; 5(5): e01341–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01341-14>
78. Johnson C.J., Cabezas-Olcoz J., Kernien J.F., Wang S.X., Beebe D.J., Huttenlocher A., et al. The extracellular matrix of candida albicans biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* 2016; 12(9): e1005884. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005884>
79. Kernien J.F., Johnson C.J., Nett J.E. Conserved inhibition of neutrophil extracellular trap release by clinical *Candida albicans* biofilms. *J. Fungi.* 2017; 3(3): 49. <https://doi.org/10.3390/jof3030049>
80. Hoyer A.R., Johnson C.J., Hoyer M.R., Kernien J.F., Nett J.E. Echinocandin treatment of *Candida albicans* biofilms enhances neutrophil extracellular trap formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018; 62(9): e00797–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00797-18>
81. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., Wang Q., Gutierrez M.G., Brown G.D., et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 2014; 15(11): 1017–25. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>
82. Uppuluri P., Chaturvedi A.K., Srinivasan A., Banerjee M., Ramasubramaniam A.K., Köhler J.R., et al. Dispersion as an important step in the candida albicans biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog.* 2010; 6(3): e1000828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>
83. Hopke A., Nicke N., Hidu E.E., Degani G., Popolo L., Wheeler R.T. Neutrophil attack triggers extracellular trap-dependent candida cell wall remodeling and altered immune recognition. *PLoS Pathog.* 2016; 12(5): e1005644. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005644>
84. Katragkou A., Kruhlak M.J., Simitopoulou M., Chatzimochou A., Taparkou A., Cotten C.J., et al. Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents. *J. Infect. Dis.* 2010; 201(12): 1941–9. <https://doi.org/10.1086/652783>
85. Byrd A.S., O'Brien X.M., Johnson C.M., Lavigne L.M., Reichner J.S. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 2010; 201(12): 1941–49. <https://doi.org/10.1086/652783>
86. Shpakov A.O. Intra- and interspecies chemocommunication in fungi. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2009; 43(6): 490–505. (in Russian)
87. Kenno S., Perito S., Mosci P., Vecchiarelli A., Monari C. Autophagy and reactive oxygen species are involved in neutrophil extracellular traps release induced by *C. albicans* morphotypes. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 879. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00879>

Информация об авторах

Долгушин Илья Ильич — д.м.н., проф., президент, зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ЮУГМУ, 454092, Челябинск, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0901-8042>.
E-mail: dol-ii@mail.ru

Мезенцева Елена Анатольевна[✉] — к.м.н., доц. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ЮУГМУ, 454092, Челябинск, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9155-2334>.
E-mail: alena_mez_75@mail.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors

Ilya I. Dolgushin — D. Sci. (Med.), Prof., President, Head, Department of microbiology, virology, immunology and clinical laboratory diagnostics, South-Ural State Medical University, 454092, Chelyabinsk, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0901-8042>.
E-mail: dol-ii@mail.ru

Elena A. Mezentseva[✉] — Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Department of microbiology, virology, immunology and clinical laboratory diagnostics, South-Ural State Medical University, 454092, Chelyabinsk, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9155-2334>.
E-mail: alena_mez_75@mail.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.



Атипичность штаммов *Vibrio cholerae* O1 по признаку агглютинабельности

Левченко Д.А.[✉], Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Подойницына О.А.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

В обзоре проанализированы данные литературы о фенотипической изменчивости холерных вибрионов O1 серогруппы. У возбудителя холеры выделяют три типа полисахаридных структур: липополисахарид, или O-антиген, капсульный полисахарид и экзополисахарид. Ругозная форма штаммов *Vibrio cholerae* способна синтезировать экзополисахарид, образовывать морщинистые колонии, которые могут агглютинироваться холерными сыворотками в различных сочетаниях. Экзополисахарид обладает повышенной устойчивостью к противомикробным препаратам. На специфичности липополисахарида основана серологическая классификация, в том числе холерных вибрионов, при этом только холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп вызывают эпидемии холеры, хотя известны штаммы non-O1/non-O139 серогрупп, обладающие основными факторами вирулентности. При переходе из S-формы в R-форму липополисахарид утрачивает O-полисахарид, а центральная область начинает выполнять функцию соматического антигена, проявляя R-специфичность. В основе серологических различий штаммов холерных вибрионов лежит изменение в регуляции или структурной организации генов, кодирующих биосинтез O-антигена (*rfb*). В 1988–2019 гг. на территории бывшего СССР и субъектов России из объектов окружающей среды выделено 168 штаммов холерных вибрионов, атипичных по признаку агглютинабельности и при выделении отнесенных к R-варианту. Генетическая организация этих штаммов полностью не изучена. Проведено определение эволюционных взаимоотношений атипичных штаммов холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды в Сибири и на Дальнем Востоке, на основании сравнительного анализа генов «домашнего хозяйства». Проведенный анализ результатов фундаментальных и прикладных исследований свидетельствует о том, что проблема изменчивости по признаку агглютинабельности штаммов *V. cholerae*, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, продолжает оставаться актуальной на современном этапе развития седьмой пандемии холеры. Атипичность штаммов холерных вибрионов O1 по данному признаку рассматривается в аспектах экологических условий их существования и молекулярно-биологической детерминации фенотипических проявлений.

Ключевые слова: холерные вибрионы; изменчивость; агглютинабельность; липополисахарид.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Левченко Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Подойницына О.А. Атипичность штаммов *Vibrio cholerae* O1 по признаку агглютинабельности. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5): 482–491.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-10>

Поступила 12.03.2020

Принята в печать 20.06.2020

Atypicality of *Vibrio cholerae* O1 strains based on agglutability

Darya A. Levchenko[✉], Irina V. Arhangelskaya, Vladimir D. Kruglikov, Oksana A. Podoinitsina

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia

The review analyzes literature data on the phenotypic variability of *Vibrio cholerae* of the O1 serogroup. Three types of polysaccharide structures are distinguished in the cholera pathogen: lipopolysaccharide, or O-antigen, capsular polysaccharide and exopolysaccharide. The rugous form of *V. cholerae* strains is able to synthesize exopolysaccharide which is highly resistant to antimicrobials, and to form wrinkled colonies that can be agglutinated with cholera sera in various combinations. Serological classification of *V. cholerae* is based on the specificity of the lipopolysaccharide. *V. cholerae* of serogroups O1 and O139 causes cholera epidemics, although strains from non-O1/non-O139 serogroups with the main virulence factors are known. Upon transition from the S- to the R-form, lipopolysaccharide loses the O-polysaccharide, and the central region begins to fulfill the function of somatic antigen, exhibiting R-specificity. The serological differences in the strains of *V. cholerae* are based

on a change in the regulation or structural organization of genes encoding the biosynthesis of O-antigen (*rfb*). From 1988 to 2019, 168 strains of *V. cholerae* that are atypical for agglutinability and were isolated from the R variant were isolated from environmental objects in the territory of the former USSR and subjects of the Russian Federation; the genetic organization of these strains has not been fully studied. The evolutionary relationships of atypical strains of cholera vibrios isolated from environmental objects in Siberia and the Far East are determined on the basis of a comparative analysis of housekeeping genes. The analysis of the results of basic and applied research indicates that the problem of variability in agglutinability of *V. cholerae* strains isolated from humans and from environmental objects remains relevant at the current stage of development of the seventh cholera pandemic. The atypicality of strains of *V. cholerae* O1 on this basis is considered in aspects of the environmental conditions of their existence and the conditionality of phenotypic manifestations by molecular biological determination.

Keywords: *Vibrio cholerae*; variability; agglutinability; lipopolysaccharide.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Levchenko D.A., Arhangel'skaya I.V., Kruglikov V.D., Podoinitsina O.A. Atypicality of *Vibrio cholerae* O1 strains based on agglutinability. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 482–491. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-10>

Received 12 March 2020

Accepted 20 June 2020

Введение

Холерные вибрионы относятся к одному из наиболее изменчивых видов микроорганизмов. В период седьмой пандемии холеры регистрируются случаи выделения из поверхностных водоемов атипичных штаммов *Vibrio cholerae*, что затрудняет их идентификацию [1]. Известны случаи обнаружения штаммов, атипичных по фенотипическим признакам — от морфологии клеток и колоний до ослабления и утраты агглютинабельности холерными диагностическими серогрупповыми (O1, O139) и вариантоспецифическими (Инаба и Огава) сыворотками — или агглютинирующихся RO-сывороткой в различных сочетаниях с ними [2–7]. Установлено, что такие штаммы выделяются из поверхностных водоемов, морской и сточной воды [8–10]. Не менее распространенной, чем снижение или утрата агглютинабельности холерными сыворотками, является SR-диссоциация [11].

Вопросам фенотипической изменчивости *V. cholerae* посвящены в основном работы середины и конца XX в. [12]. У возбудителя холеры выделяют три типа полисахаридных структур: липополисахарид (ЛПС), компонентом которого является O-полисахарид, или O-антиген, капсульный полисахарид (КПС), или K-антиген, и ругозный полисахарид, также известный как экзополисахарид (ЭПС) или вибриополисахарид [13, 14]. Предполагают, что ЛПС и капсула в основном защищают штаммы *V. cholerae* в организме человека, а ЭПС — во внешней среде. При нахождении во внешней среде *V. cholerae* выработали несколько механизмов выживания. Один из них — способность *V. cholerae* синтезировать ЭПС и образовывать морщинистые колонии (ругозный фенотип), которые могут агглютинироваться сыворотками — как серогрупповыми и вариантоспецифическими,

так и сывороткой холерной RO в различных сочетаниях [15–19].

Ругозные варианты впервые описаны I. Baltepeau в 1926 г., впоследствии они были выделены и другими исследователями в популяции как клинических изолятов *V. cholerae*, так и штаммов, изолированных из внешней среды. Ряд авторов указывают на глубокие морфологические, биохимические и антигенные изменения, а также сниженную подвижность и вирулентность штаммов *V. cholerae* ругозной формы. Другие исследователи считают, что ругозные варианты могут сохранять типичную морфологию и неизменные биохимические признаки [20–24]. С.П. Задновой с соавт. (2010) установлено, что ругозные штаммы *V. cholerae* при смене морфологии колоний сохраняют полную вирулентность, а также обладают сниженной подвижностью, что связано с изменением экспрессии генов, необходимых для хемотаксиса и биосинтеза жгутика. Ругозные формы штаммов *V. cholerae* в сравнении с гладкими вариантами более устойчивы к действию сывороток, комплемента и различных повреждающих факторов внешней среды (хлор, кислая реакция среды, ультрафиолетовое излучение, осмотический и оксидативный стрессы) [21].

Повышенная продукция ЭПС на поверхности отдельных клеток приводит к изменению морфологии клеток и формированию ругозных колоний. Доказано, что сахара, входящие в состав ЭПС, способны инактивировать некоторые агенты, например хлор, что способствует сохранению патогена в хлорированной воде и имеет очень важное эпидемиологическое значение, т.к. вспышки холеры чаще всего развиваются при водном пути заражения [16, 18, 21, 25–31]. За синтез внеклеточного ЭПС отвечает кластер генов *VPS*. Ряд авторов считают, что ругозный фенотип в основном распространен

у эпидемических штаммов, на основании чего можно предположить, что продукция ЭПС играет важную роль в эпидемиологии холеры. А. Ali с соавт. (2005) показали, что в биосинтезе полисахарида, отвечающего за ругозный фенотип, участвует внеклеточная система секреции белка (ген *eps*) [16, 32]. В 2009 г. в Хайдарабаде (Индия) была зарегистрирована вспышка холеры, вызванная токсигенными штаммами *V. cholerae* как в гладкой, так и в ругозной форме [27, 33]. В результате проведенных исследований было установлено, что штаммы с измененной морфологией колоний обладали повышенной устойчивостью к противомикробным препаратам и характеризовались наличием мутаций в гене, кодирующем регуляторный белок гемагглютининовой протеазы (*hapR*).

Представляется важным и своевременным анализ результатов изучения атипичных по признаку агглютинабельности выделяемых штаммов *V. cholerae* (в ругозной или гладкой формах), в том числе в связи с возможным затруднением их идентификации в случае снижения или отсутствия агглютинации с холерной диагностической сывороткой O1 при отрицательном результате детекции гена *rfb* (*wbe*), кодирующего O-антиген.

Основная часть

Основным защитным антигеном для *V. cholerae* является O-антиген, на котором построена схема типирования [3]. К настоящему времени идентифицировано 206 серогрупп, из которых только O1 и O139 вызывают эпидемию/пандемию холеры, хотя известно, что несколько штаммов, не относящихся к O1 и O139 серогруппам, обладают основными факторами вирулентности [34]. На специфичности ЛПС основана серологическая классификация многих грамотрицательных бактерий, в том числе *V. cholerae*. В структуре ЛПС различают три самостоятельных области: O-специфическую полисахаридную цепь, коровую область (кор-гидрофильный гетерополисахарид, состоящий из олигосахаридного остова) и липид А. При переходе из S- в R-форму ЛПС утрачивает O-полисахарид, а центральная область, после этого ставшая концевой структурой, начинает выполнять функцию соматического антигена, проявляя R-специфичность [35–38]. Л.П. Алексеевой с соавт. (1998) выявлены аналогичные различия в структуре S- и R-форм ЛПС *V. cholerae* на основе моноклональных антител [1]. Биосинтез ЛПС *V. cholerae* начинается с построения липида А, чья жирнокислотная часть встраивается во внешний слой наружной мембраны. В процессе перехода штаммов Огава в Инаба и к R-формам ЛПС редуцируется. Установлено, что мутация S- в R-форму сопровождается утратой аминокислот (квиновомозина и перозамина), характерных для ЛПС S-форм *V. cholerae*, и потерей

O-специфичности, что проявляется возникновением перекрестных серологических реакций между серовариантами Инаба и Огава. O-полисахарид синтезируется независимо от комплекса коровая область–липид А при участии фермента гликозилтрансферазы. При отсутствии этого фермента O-антиген не прикрепляется к коровой части и формируется на поверхности клетки самостоятельно. В неблагоприятных условиях окружающей среды повреждаются прежде всего боковые полисахаридные цепи ЛПС, отвечающие за серологическую специфичность *V. cholerae*. Антигенный состав R-формы может быть неоднороден и зависит от глубины изменений структур центральной области и липида А. Так, в основе серологических различий штаммов *V. cholerae* лежит изменение регуляции или структурной организации генов, кодирующих O-антиген. За синтез O-антигена *V. cholerae* ответственны гены *rfb* (*wbe*), определяющие его варибельность [11].

По данным ФКУЗ «Противочумный центр» и ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (референс-центра по мониторингу холеры), штаммы *V. cholerae* с атипичной агглютинабельностью наиболее широко распространены в Республике Каракалпакстан (Узбекистан), Мангышлакской области (Республика Казахстан) и некоторых субъектах России (Приморский и Хабаровский края, Новосибирская область и др.). При этом в большинстве указанных районов измененные по агглютинабельности штаммы выделяются наряду с типичными штаммами. Выраженная неоднородность этой группы заключается в регистрации вариантов с различной степенью агглютинабельности холерными диагностическими сыворотками [11, 39–54]. На протяжении ряда лет в Ростовском-на-Дону противочумном институте проводилось изучение штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы, атипичных по агглютинабельности. Так, в экспериментальной работе И.Я. Черепяхиной (2003) было изучено свыше 200 штаммов *V. cholerae* O1, в том числе атипичных по антигенному составу, которые в последующем были разделены на две группы: 1-я группа — обозначенная как R-фенотип (штаммы, агглютинирующиеся только холерной сывороткой RO в различных титрах, нетоксигенные, выделение только из объектов окружающей среды); 2-я группа — SR-варианты (штаммы *V. cholerae*, агглютинирующиеся всеми холерными сыворотками в различных сочетаниях, часть из них сохранила вирулентность, выделялись как из объектов окружающей среды, так и от людей) [11].

Известен случай выделения от больного токсигенного штамма *V. cholerae* R-варианта классического биовара в 1953 г. в Калькутте (Индия). Изолят оказался типичным по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам. По результатам анализа серологической диагностики

установлена принадлежность штамма к R-варианту, а также подтверждена его принадлежность к O1 серогруппе по наличию измененного гена *rfbN* [33]. Изолят *V. cholerae* R-варианта отнесен к биовару *Classical* на основании ряда тестов: чувствительности к классическому диагностическому фагу в диагностическом титре и устойчивости к фагу El Tor, чувствительности к 50 ед. полимиксина В, а также положительной реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами. При определении эпидемиологической значимости установлено, что данный штамм был негемолитичен (проба Грейга отрицательна), по результатам ПЦР-генотипирования содержал гены профага СТХφ (*ctxAB^{clas}tcpA^{clas}*) и был токсигенным.

В то время как в эндемичных очагах (странах Азии, Африки и Карибского бассейна) идет процесс формирования новых антигенных вариантов, имеющих эпидемический потенциал, в неблагоприятных экологических условиях происходит адаптация штаммов *V. cholerae* [54].

Стоит отметить, что территория России не является эндемичной по холере, тем не менее из водоемов Приморского края на протяжении ряда лет выделяются нетоксигенные штаммы *V. cholerae* R-варианта, типичные по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам, т.е. в гладкой форме [55]. Н.О. Бочалгиным (2017) проведено определение эволюционных взаимоотношений выделенных из водоемов в Сибири и на Дальнем Востоке штаммов *V. cholerae* на основании сравнительного анализа генов «домашнего хозяйства». Так, он выделил подгруппу штаммов *V. cholerae*, включающих культуры, относящиеся как к R-варианту, так и к non-O1/non-O139 серогруппам, обособленную от токсигенных (*ctxA+tcpA+*) и нетоксигенных (*ctxA-tcpA+*) штаммов [56]. В дальнейшем Н.О. Бочалгиным (2019) разработан и апробирован подход к мультилокусному сиквенс-типированию для углубленной идентификации и оценки родства различных групп штаммов. Автор выявил, что штаммы *V. cholerae* R-варианта вошли в различные кластеры на основе сиквенс-типов — как в группу сиквенс-типов, включающих нетоксигенные культуры *V. cholerae* O1 серогруппы, так и в группу нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O139 и non-O1/non-O139 [57]. Возможно, это связано с наличием специфических экологических условий для появления и переживания таких культур в поверхностных водоемах Приморского края [32].

За 1988–2019 гг. на территории бывшего СССР и субъектов Российской Федерации из объектов окружающей среды выделено порядка 168 штаммов холерных вибрионов, атипичных по признаку агглютинабельности (частота их встречаемости составляла 1,1–28,0%), а также частично (34,5%) не содержащих ген *rfb* (*wbe*), ответственный за синтез O-антигена [58, 59]. Наиболее часто такие штаммы

встречались в Приморском и Хабаровском краях, Республике Калмыкия, Иркутской, Московской, Амурской, Ростовской и Новосибирской областях. В ряде работ показано, что экологическая среда существенно влияет на свойства *V. cholerae* [25, 26, 28, 60–62]. Необходимо учитывать, что в приэкваториальной зоне, в которую входят эндемичные очаги по холере (Индия, Бангладеш, Пакистан, Индонезия, Южная Америка и Африка), существуют другие условия для выживания вибрионов, чем в средних и северных широтах нашей страны. Так, территория бывшего СССР и субъекты России — это регионы с умеренным климатом: от умеренно-континентального (на европейской территории России), континентального (Западная Сибирь), резко континентального (Восточная Сибирь, большая часть Дальнего Востока) до муссонного (юго-восток Дальнего Востока), с резкими колебаниями температуры, поэтому при попадании в объекты окружающей среды *V. cholerae* вынуждены приспосабливаться к различным условиям [11].

Заключение

Характеристика атипичных по агглютинабельности штаммов *V. cholerae*, выделяемых на протяжении длительного периода в разных регионах, основывается на изучении комплекса фено- и генотипических свойств, что имеет значение для совершенствования методов дифференциации данной группы штаммов и оценки их патогенетического потенциала.

Таким образом, анализ результатов фундаментальных и прикладных исследований свидетельствует о том, что проблема изменчивости по признаку агглютинабельности штаммов *V. cholerae*, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, продолжает оставаться актуальной на современном этапе развития седьмой пандемии холеры. Атипичность штаммов *V. cholerae* O1 по данному признаку рассматривается в аспектах экологических условий их существования и обусловленности фенотипических проявлений молекулярно-биологической детерминацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева Л.П., Черпахина И.Я., Сальникова О.И., Бурлакова О.С. Изучение антигенных взаимосвязей атипичных R-форм холерного вибриона на основе моноклональных антител. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1998; (4): 9–12.
2. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Крепостнова И.М., Смирнова Н.И. Устойчивость штаммов геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор к действию неблагоприятных факторов внешней среды. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 27. Ростов-на-Дону; 2014: 76–9.
3. Онищенко Г.Г., Кутырева В.В., ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство*. М.: Шико; 2013.

4. Подосинникова Л.С., Черепяхина И.Я. Изменчивость холерных вибрионов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1998.
5. Савельева И.В., Савельева Е.И., Бабенышев Б.В. Анализ фенотипических свойств генетически измененных (гибридных) вариантов биовара Эльтор, выделенных на Кавказе. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 26. Ростов-на-Дону; 2013: 123–9.
6. Седина С.Г., Цитцер А.О. Об антигенных свойствах RO-вариантов холерного вибриона. В кн.: *Современные аспекты эпидемиологического надзора за особо опасными инфекциями: Тезисы XIII конференции противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана*. Алма-Ата; 1990: 189–92.
7. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(2): e0004330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
8. Ломов Ю.М., Мединский Г.М. Сохранение возбудителя холеры в межэпидемический сезон. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 17. Ростов-на-Дону; 1995: 17–24.
9. Подосинникова Л.С., Ломов М.Ю., Кудрякова Т.А. Характеристика холерных вибрионов, выделенных в России и некоторых странах СНГ в 90-е годы. В кн.: *Холера. Материалы VIII Российской научно-практической конференции по проблеме «Холера»*. Ростов-на-Дону; 1995: 76–9.
10. Подосинникова Л.С., Ломов Ю.М., Мазрухо Б.Л. Возбудители холеры: современные представления и характеристика штаммов, выделенных в 90-е годы в России. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 13. Ростов-на-Дону; 2000: 18–22.
11. Черепяхина И.Я., Мишанькин Б.М., Буракова О.С., Баллахнова В.В., Помухина О.И., Фецайлова О.П. Некоторые экологические аспекты антигенной вариабельности холерных вибрионов. В кн.: *Холера. Материалы VIII Российской научно-практической конференции по проблеме «Холера»*. Ростов-на-Дону; 2003: 169–72.
12. Коробкова Е.И. *Микробиология и эпидемиология холеры*. М.: Медгиз; 1959.
13. Sozhamannan S., Yildiz F.H. Diversity and genetic basis of polysaccharide biosynthesis in *Vibrio cholerae*. In: *Epidemiological and Molecular Aspects on Cholera. Infectious Disease Series*. New York: Springer; 129–60.
14. Yamasaki S., Gard S., Nair G.B., Takeda Y. Distribution of *Vibrio cholerae* O1 antigen biosynthesis genes among O139 and other non-O1 serogroups of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; 179(1): 115–21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08716.x>
15. Лобанов В.В., Колпикова Л.Д., Ханумьян Т.А. Штамм холерного вибриона шероховатой формы – продуцент холерного токсина. В кн.: *Сборник научных трудов. Том 1*. Новороссийск: Адыгея; 1994: 166–9.
16. Ali A., Morris J.G., Johnson J.A. Sugars inhibit expression of the rugose phenotype of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(3): 1426–9. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1426-1429.2005>
17. Beyhan S., Yildiz F.H. Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signaling pathway. *Mol. Microbiol.* 2007; 63(4): 995–1007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05568.x>
18. Rice E.W., Johnson C.H., Clark R.M., Fox K.R., Reasoner D.J., Dunnigan M.E., et al. Chlorine and survival of “rugose” *Vibrio cholerae*. *Lancet*. 1992; 340(8821): 740. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92289-r](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92289-r)
19. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(7): 4028–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4028>
20. Безсмертный В.Е., Иванова С.М., Титов Г.В., Шуренкова Е.Н., Подосинникова Л.С., Мазрухо Б.Л. и др. Холерные вибрионы O1, изолированные от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2004 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 18. Ростов-на-Дону; 2005: 42–5.
21. Заднова С.П., Смирнова Н.И. Роль внеклеточного экзополисахарида в адаптации возбудителя холеры во внешней среде. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010; (3): 13–9.
22. Ali A., Rashid M.H., Karaolis D.K.R. High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(11): 5773–8. <https://doi.org/10.1128/aem.68.11.5773-5778.2002>
23. White P.B. The rugose variant of *Vibrios*. *J. Pathol. Bacteriol.* 1938; 46(1): 1–6.
24. Yildiz F.H., Lie X.S., Heydom A., Schoolnik G.K. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Mol. Microbiol.* 2004; 53(2): 497–515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04154.x>
25. Colwell R.R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science*. 1996; 274(5295): 2025–31. <https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2025>
26. Colwell R.R., Epstein P.R., Gubler D., Maynard N., McMichael A.J., Patz J.A., et al. Climate change and human health. *Science*. 1998; 279(5353): 968–9. <https://doi.org/10.1126/science.279.5353.963g>
27. Chowdhury G.R., Bhadra R.K., Bag S., Pazhani G.P., Das B., Basu P., et al. Rugose atypical *Vibrio cholerae* O1 El Tor responsible for 2009 cholera outbreak in India. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(10): 1130–6. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000344>
28. Dalsgaard A., Forslund A., Mortensen H.F., Shimada T. Ribotypes of clinical non-O1 non-O139 strains in relation to O-serotypes. *Epidemiol. Infect.* 1998; 121(3): 535–45. <https://doi.org/10.1017/s0950268898001654>
29. Morris J.G., Szein M.B., Rice E.W., Nataro J.P., Losonsky G.A., Panigrahi P., et al. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(6): 1364–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.6.1364>
30. Rice E.W., Johnson C.J., Clark R.M., Fox K.R., Reasoner D.J., Dunnigan M.E., et al. *Vibrio cholerae* O1 can assume a ‘rugose’ survival form that resists killing by chlorine, yet retains virulence. *Int. J. Environ. Health Res.* 1993; 3(2): 89–98.
31. Wai S.N., Mizunoe Y., Takada A., Kawabata S., Yoshida S. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(10): 3648–55. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3648-3655.1998>
32. Ali A., Johnson J.A., Franco A.A., Metzger D.J., Connell T.D., Morris J.G., et al. Mutations in the extracellular protein secretion pathway genes (*eps*) interfere with rugose polysaccharide production in and motility of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2000; 68(4): 1967–74. <https://doi.org/10.1128/iai.68.4.1967-1974.2000>
33. Islam M.S., Ahsan S., Khan S.I., Ahmed Q.S., Rashid M.H., Islam K.M.N., et al. Virulence properties of rough and smooth strains of *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(4): 229–35. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03518.x>
34. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer; 2004.
35. Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий. I. Общая характеристика липополисахаридов и структура липида А (Обзор). *Биохимия*. 1993; 58(2): 166–81.

36. Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий. II. Структура кора (Обзор). *Биохимия*. 1993; 58(2): 182–201.
37. Лобанов В.В., Сухарь В.В. Особенности липополисахарида *Vibrio cholerae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2002; (2): 102–7.
38. Ткаченко В.В. Липополисахариды холерного вибриона и некоторых бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1982; (9): 20–8.
39. Безмертный В.Е., Иванова С.М., Титов Г.В., Мазрухо Б.Л., Смоликова Л.М., Подосинникова Л.С. Характеристика культур холерных вибрионов O1 и O139, изолированных от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2002 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 16. Ростов-на-Дону; 2003: 13–6.
40. Безмертный В.Е., Иванова С.М., Титов Г.В., Подосинникова Л.С., Мазрухо Б.Л., Кудрякова Т.А. и др. Характеристика культур холерных вибрионов O1 и O139, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2003 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 17. Ростов-на-Дону; 2004: 27–31.
41. Безмертный В.Е., Подосинникова Л.С., Иванова С.М., Титов Г.В., Смоликова Л.М., Мазрухо Б.Л. и др. Характеристика культур холерных вибрионов O1 и O139, изолированных от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2006 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 20. Ростов-на-Дону; 2007: 49–53.
42. Безмертный В.Е., Иванова С.М., Титов Г.В., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Кругликов В.Д. и др. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2007 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 21. Ростов-на-Дону; 2008: 52–5.
43. Безмертный В.Е., Иванова С.М., Титов Г.В., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Кругликов В.Д. и др. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2008 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 22. Ростов-на-Дону; 2009: 55–8.
44. Безмертный В.Е., Иванова С.М., Титов Г.В., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Кругликов В.Д. и др. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2009 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 23. Ростов-на-Дону; 2010: 106–9.
45. Иванова С.М., Титов Г.В., Безмертный В.Е., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Москвитина Э.А. и др. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, изолированных от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2010 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 24. Ростов-на-Дону; 2011: 62–6.
46. Иванова С.М., Титов Г.В., Безмертный В.Е., Мазрухо А.Б., Телесманич Н.Р., Кругликов В.Д. и др. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды и от людей на территории Российской Федерации в 2012 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 26. Ростов-на-Дону; 2013: 21–5.
47. Иванова С.М., Титов Г.В., Безмертный В.Е., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Титова С.В. и др. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2013 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 27. Ростов-на-Дону; 2014: 59–64.
48. Иванова С.М., Титов Г.В., Безмертный В.Е., Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А. и др. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных, из объектов окружающей среды и от людей на территории Российской Федерации в 2014 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 28. Ростов-на-Дону; 2015: 67–70.
49. Иванова С.М., Титов Г.В., Иванников В.В., Безмертный В.Е., Титова С.В., Кругликов В.Д. и др. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2015 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 29. Ростов-на-Дону; 2016: 41–5.
50. Иванова С.М., Иванников В.В., Мискинова Т.А., Титова С.В., Кругликов В.Д., Чемисова О.С. и др. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2016 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 30. Ростов-на-Дону; 2017: 54–7.
51. Иванова С.М., Иванников В.В., Мискинова Т.А., Лопатин А.А., Титова С.В., Кругликов В.Д. и др. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2017 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 31. Ростов-на-Дону; 2018: 48–51.
52. Кюрегян А.А., Иванова С.М., Мазрухо Б.Л., Смоликова Л.М., Кудрякова Т.А., Титов Г.В. и др. Характеристика культур холерных вибрионов O1 и O139, изолированных от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2000 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 14. Ростов-на-Дону; 2001: 26–30.
53. Кюрегян А.А., Иванова С.М., Мазрухо Б.Л., Смоликова Л.М., Кудрякова Т.А., Титов Г.В. и др. Характеристика культур холерных вибрионов O1 и O139, изолированных от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2001 году. В кн.: *Материалы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»*. Выпуск 15. Ростов-на-Дону; 2002: 34–9.
54. Подосинникова Л.С., Воронежская Л.Г., Лобанов Л.Н. О циркуляции холерных вибрионов на территории СССР в 1987–1991 г. В кн.: *Материалы Российской научной конференции «Холера. Вопросы эпидемиологии, микробиологии и лабораторной диагностики»*. Ростов-на-Дону; 1992: 67–71.
55. Бочалгин Н.О., Миронова Л.В., Хунхеева Ж.Ю., Солодская Н.С., Алленов А.В., Балахонов С.В. Аллельный полиморфизм генов «домашнего хозяйства» R-вариантов *Vibrio cholerae*, выделенных в Приморском крае в 2016 г. *Бактериология*. 2017; 2(3): 52.
56. Бочалгин Н.О. Филогенетический анализ штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных из объектов окружающей среды в Сибири и на Дальнем Востоке. В кн.: *Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены»*. Иркутск; 2017: 27–8.

57. Бочалгин Н.О. Полногеномное мультилокусное сиквенс-типирование в изучении генетического разнообразия и филогении *Vibrio cholerae*. В кн.: *Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены»*. Уфа; 2019: 201–6.
58. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Титова С.В., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Гаевская Н.Е. и др. Холерные вибрионы в водоемах Российской Федерации. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(4): 393–9. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-4-393-399>
59. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ежова М.И., Москвитина Э.А., Титова С.В. Анализ результатов мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды на административных территориях России с помощью ГИС «Холера 1989–2014». *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; (4): 99–102. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-99-102>
60. Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В., Куриленко М.П., Пичурин Н.Л. и др. Прогноз по холере на 2019 г. на основании анализа эпидемиологической обстановки в мире, СНГ и России в 2009–2018 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; (1): 64–73. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-1-64-73>
61. Borroto R.G. Ecology of *Vibrio cholerae* serogroup O1 in aquatic environments. *Rev. Panam. Salud Publica*. 1997; 1(1): 3–8. <https://doi.org/10.1590/s1020-49891997000100002> (in Spanish)
62. Mekalanos J.J., Rubin E.J., Walder M.K. Cholera: molecular basis for emergence and pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1997; 18(4): 241–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.1997.tb01052.x>
1. Alekseeva L.P., Cherepakhina I.Ya., Sal'nikova O.I., Burlakova O.S. A monoclonal antibody-based study of the antigenic interrelations of typical and R forms of *Vibrio cholerae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1998; (4): 9–12. (in Russian)
2. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Krepostnova I.M., Smirnova N.I. Resistance of *Vibrio cholerae* El Tor biovar genovariant strains to adverse environmental factors. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrions Pathogenic to Humans»*. Issue 27 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony»]. Vypusk 27]. Rostov-na-Donu; 2014: 76–9. (in Russian)
3. Onishchenko G.G., Kutryeva V.V., eds. *Laboratory Diagnosis of Dangerous Infectious Diseases. A Practical Guide [Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney. Prakticheskoe rukovodstvo]*. Moscow: Shiko; 2013. (in Russian)
4. Podosinnikova L.S., Cherepakhina I.Ya. Variability of cholera vibrios. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 1998. (in Russian)
5. Savel'eva I.V., Savel'eva E.I., Babenyshev B.V. Analysis of phenotypic properties of genetically modified (hybrid) variants of the Eltor biovar isolated in the Caucasus. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrions Pathogenic to Humans»*. Issue 26 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony»]. Vypusk 26]. Rostov-na-Donu; 2013: 123–9. (in Russian)
6. Sedina S.G., Tsittser A.O. On the antigenic properties of the RO variants of the cholera vibrio. In: *Modern Aspects of Epidemiological Surveillance of Particularly Dangerous Infections: Theses of the XIII Conference of Anti-Plague Institutions in Central Asia and Kazakhstan [Sovremennyye aspekty epidemiologicheskogo nadzora za osobo opasnymi infektsiyami: Tezisy XIII konferentsii protivochumnykh uchrezhdeniy Sredney Azii i Kazakhstana]*. Alma-Ata; 1990: 189–92. (in Russian)
7. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(2): e0004330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
8. Lomov Yu.M., Medinskiy G.M. Preservation of the causative agent of cholera in the inter-epidemic season. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrions Pathogenic to Humans»*. Issue 17 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony»]. Vypusk 17]. Rostov-na-Donu; 1995: 17–24. (in Russian)
9. Podosinnikova L.S., Lomov M.Yu., Kudryakova T.A. Characterization of cholera vibrios isolated in Russia and some CIS countries in the 90s. In: *Cholera. Materials of the VIII Russian Scientific-Practical Conference on the Problem of «Cholera» [Kholera. Materialy VIII Rossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii po probleme «Kholera»]*. Rostov-na-Donu; 1995: 76–9. (in Russian)
10. Podosinnikova L.S., Lomov Yu.M., Mazrukho B.L. Pathogens of cholera: modern concepts and characteristics of strains isolated in the 90s in Russia. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrions Pathogenic to Humans»*. Issue 13 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony»]. Vypusk 13]. Rostov-na-Donu; 2000: 18–22. (in Russian)
11. Cherepakhina I.Ya., Mishan'kin B.M., Burlakova O.S., Balakhnova V.V., Pomukhina O.I., Fetsaylova O.P. Some environmental aspects of antigenic variability of cholera vibrios. In: *Cholera. Materials of the VIII Russian Scientific-Practical Conference on the Problem of «Cholera» [Kholera. Materialy VIII Rossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii po probleme «Kholera»]*. Rostov-na-Donu; 2003: 169–72. (in Russian)
12. Korobkova E.I. *Microbiology and Epidemiology of Cholera [Mikrobiologiya i epidemiologiya kholery]*. Moscow: Medgiz; 1959. (in Russian)
13. Sozhamannan S., Yildiz F.H. Diversity and genetic basis of polysaccharide biosynthesis in *Vibrio cholerae*. In: *Epidemiological and Molecular Aspects on Cholera. Infectious Disease Series*. New York: Springer; 129–60.
14. Yamasaki S., Gard S., Nair G.B., Takeda Y. Distribution of *Vibrio cholerae* O1 antigen biosynthesis genes among O139 and other non-O1 serogroups of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; 179(1): 115–21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08716.x>
15. Lobanov V.V., Kolpikova L.D., Khanum'yan T.A. The rough cholera vibrio strain is a producer of cholera toxin. In: *Collection of Proceedings. Volume 1 [Sbornik nauchnykh trudov. Tom 1]*. Novorossiysk: Adygeya; 1994: 166–9. (in Russian)
16. Ali A., Morris J.G., Johnson J.A. Sugars inhibit expression of the rugose phenotype of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(3): 1426–9. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1426-1429.2005>
17. Beyhan S., Yildiz F.H. Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signaling pathway. *Mol. Microbiol.* 2007; 63(4): 995–1007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05568.x>
18. Rice E.W., Johnson C.H., Clark R.M., Fox K.R., Reasoner D.J., Dunnigan M.E., et al. Chlorine and survival of “rugose” *Vibrio cholerae*. *Lancet*. 1992; 340(8821): 740. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92289-r](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92289-r)
19. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96(7): 4028–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4028>
20. Bezsmertnyy V.E., Ivanova S.M., Titov G.V., Shurenkova E.N., Podosinnikova L.S., Mazrukho B.L., et al. O1 cholera vibrios isolated from people and from environmental objects in the Russian Federation in 2004. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrions Pathogenic to Humans»*. Issue

- 18 [[Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 18]. Rostov-na-Donu; 2005: 42–5. (in Russian)
21. Zadnova S.P., Smirnova N.I. The role of extracellular exopolysaccharide in cholera agent adaptation in the environment. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2010; (3): 13–9. (in Russian)
22. Ali A., Rashid M.H., Karaolis D.K.R. High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(11): 5773–8. <https://doi.org/10.1128/aem.68.11.5773-5778.2002>
23. White P.B. The rugose variant of *Vibrios*. *J. Pathol. Bacteriol.* 1938; 46(1): 1–6.
24. Yildiz F.H., Lie X.S., Heydorn A., Schoolnik G.K. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Mol. Microbiol.* 2004; 53(2): 497–515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04154.x>
25. Colwell R.R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science*. 1996; 274(5295): 2025–31. <https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2025>
26. Colwell R.R., Epstein P.R., Gubler D., Maynard N., Michael A.J., Patz J.A., et al. Climate change and human health. *Science*. 1998; 279(5353): 968–9. <https://doi.org/10.1126/science.279.5353.963g>
27. Chowdhury G.R., Bhadra R.K., Bag S., Pazhani G.P., Das B., Basu P., et al. Rugose atypical *Vibrio cholerae* O1 El Tor responsible for 2009 cholera outbreak in India. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(10): 1130–6. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000344>
28. Dalsgaard A., Forslund A., Mortensen H.F., Shimada T. Ribotypes of clinical non-O1 non-O139 strains in relation to O-serotypes. *Epidemiol. Infect.* 1998; 121(3): 535–45. <https://doi.org/10.1017/s0950268898001654>
29. Morris J.G., Szein M.B., Rice E.W., Nataro J.P., Losonsky G.A., Panigrahi P., et al. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(6): 1364–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.6.1364>
30. Rice E.W., Johnson C.J., Clark R.M., Fox K.R., Reasoner D.J., Dunnigan M.E., et al. *Vibrio cholerae* O1 can assume a 'rugose' survival form that resists killing by chlorine, yet retains virulence. *Int. J. Environ. Health Res.* 1993; 3(2): 89–98.
31. Wai S.N., Mizunoe Y., Takade A., Kawabata S., Yoshida S. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64(10): 3648–55. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3648-3655.1998>
32. Ali A., Johnson J.A., Franco A.A., Metzger D.J., Connell T.D., Morris J.G., et al. Mutations in the extracellular protein secretion pathway genes (*eps*) interfere with rugose polysaccharide production in and motility of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2000; 68(4): 1967–74. <https://doi.org/10.1128/iai.68.4.1967-1974.2000>
33. Islam M.S., Ahsan S., Khan S.I., Ahmed Q.S., Rashid M.H., Islam K.M.N., et al. Virulence properties of rough and smooth strains of *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(4): 229–35. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03518.x>
34. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer; 2004.
35. Knirel' Yu.A., Kochetkov N.K. The structure of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. I. General characteristics of lipopolysaccharides and the structure of lipid A (Review). *Biokhimiya*. 1993; 58(2): 166–81. (in Russian)
36. Knirel' Yu.A., Kochetkov N.K. The structure of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. II. The structure of the crust (Overview). *Biokhimiya*. 1993; 58(2): 182–201. (in Russian)
37. Lobanov V.V., Sukhar' V.V. Features of Lipopolysaccharide *Vibrio cholerae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2002; (2): 102–7. (in Russian)
38. Tkachenko V.V. Lipopolysaccharides of cholera vibrio and some bacteria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1982; (9): 20–8. (in Russian)
39. Bezsmertnyy V.E., Ivanova S.M., Titov G.V., Mazrukho B.L., Smolikova L.M., Podosinnikova L.S. Characterization of cultures of cholera vibrios O1 and O139 isolated from people and from environmental objects in the Russian Federation in 2002. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans»*. Issue 16 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 16]. Rostov-na-Donu; 2003: 13–6. (in Russian)
40. Bezsmertnyy V.E., Ivanova S.M., Titov G.V., Podosinnikova L.S., Mazrukho B.L., Kudryakova T.A., et al. Characterization of cultures of cholera vibrios O1 and O139 isolated from environmental objects on the territory of the Russian Federation in 2003. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans»*. Issue 17 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 17]. Rostov-na-Donu; 2004: 27–31. (in Russian)
41. Bezsmertnyy V.E., Podosinnikova L.S., Ivanova S.M., Titov G.V., Smolikova L.M., Mazrukho B.L., et al. Characterization of cultures of cholera vibrios O1 and O139 isolated from people and from environmental objects in the Russian Federation in 2006. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans»*. Issue 20 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 20]. Rostov-na-Donu; 2007: 49–53. (in Russian)
42. Bezsmertnyy V.E., Ivanova S.M., Titov G.V., Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Kruglikov V.D., et al. Information on the biological properties of O1 cholera vibrios of the serogroup isolated from environmental objects on the territory of the Russian Federation in 2007. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans»*. Issue 21 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 21]. Rostov-na-Donu; 2008: 52–5. (in Russian)
43. Bezsmertnyy V.E., Ivanova S.M., Titov G.V., Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Kruglikov V.D., et al. Information on the biological properties of cholera vibrios O1 and O139 of serogroups isolated from environmental objects in the Russian Federation in 2008. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans»*. Issue 22 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 22]. Rostov-na-Donu; 2009: 55–8. (in Russian)
44. Bezsmertnyy V.E., Ivanova S.M., Titov G.V., Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Kruglikov V.D., et al. Information on the biological properties of O1 cholera vibrios of the serogroup isolated from environmental objects on the territory of the Russian Federation in 2009. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans»*. Issue 23 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 23]. Rostov-na-Donu; 2010: 106–9. (in Russian)
45. Ivanova S.M., Titov G.V., Bezsmertnyy V.E., Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Moskvitina E.A., et al. Information on the biological properties of cholera vibrios O1 and O139 of serogroups isolated from people and from environmental objects in the Russian Federation in 2010. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans»*. Issue 24 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 24]. Rostov-na-Donu; 2011: 62–6. (in Russian)
46. Ivanova S.M., Titov G.V., Bezsmertnyy V.E., Mazrukho A.B., Telesmanich N.R., Kruglikov V.D., et al. Information on the

- biological properties of cholera vibrios O1 serogroup isolated from environmental objects and from people on the territory of the Russian Federation in 2012. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans». Issue 26 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 26]*. Rostov-na-Donu; 2013: 21–5. (in Russian)
47. Ivanova S.M., Titov G.V., Bezsmertnyy V.E., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., Titova S.V., et al. Information on the biological properties of the cholera vibrios of the O1 serogroup isolated from environmental objects in the Russian Federation in 2013. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans». Issue 27 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 27]*. Rostov-na-Donu; 2014: 59–64. (in Russian)
48. Ivanova S.M., Titov G.V., Bezsmertnyy V.E., Titova S.V., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., et al. Information on the biological properties of O1 cholera vibrios of the serogroup isolated from environmental objects and from people on the territory of the Russian Federation in 2014. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans». Issue 28 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 28]*. Rostov-na-Donu; 2015: 67–70. (in Russian)
49. Ivanova S.M., Titov G.V., Ivannikov V.V., Bezsmertnyy V.E., Titova S.V., Kruglikov V.D., et al. Information on the biological properties of cholera vibrios O1 of the serogroup isolated from environmental objects in the Russian Federation in 2015. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans». Issue 29 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 29]*. Rostov-na-Donu; 2016: 41–5. (in Russian)
50. Ivanova S.M., Ivannikov V.V., Miskinova T.A., Titova S.V., Kruglikov V.D., Chemisova O.S., et al. Information on the biological properties of O1 cholera vibrios of the serogroup isolated from environmental objects on the territory of the Russian Federation in 2016. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans». Issue 30 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 30]*. Rostov-na-Donu; 2017: 54–7. (in Russian)
51. Ivanova S.M., Ivannikov V.V., Miskinova T.A., Lopatin A.A., Titova S.V., Kruglikov V.D., et al. Information on the biological properties of O1 cholera vibrios of the serogroup isolated from environmental objects on the territory of the Russian Federation in 2017. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans». Issue 31 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 31]*. Rostov-na-Donu; 2018: 48–51. (in Russian)
52. Kyuregyan A.A., Ivanova S.M., Mazrukho B.L., Smolikova L.M., Kudryakova T.A., Titov G.V., et al. Characterization of cultures of cholera vibrios O1 and O139 isolated from people and from environmental objects in the Russian Federation in 2000. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans». Issue 14 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 14]*. Rostov-na-Donu; 2001: 26–30. (in Russian)
53. Kyuregyan A.A., Ivanova S.M., Mazrukho B.L., Smolikova L.M., Kudryakova T.A., Titov G.V., et al. Characterization of cultures of cholera vibrios O1 and O139 isolated from people and from environmental objects in the Russian Federation in 2001. In: *Materials of the Problem Commission «Cholera and Vibrios Pathogenic to Humans». Issue 15 [Materialy problemnoy komissii «Kholera i patogennye dlya cheloveka vibriony». Vypusk 15]*. Rostov-na-Donu; 2002: 34–9. (in Russian)
54. Podosinnikova L.S., Voronezhskaya L.G., Lobanova L.N. On the circulation of cholera vibrios in the USSR in 1987–1991. In: *Materials of the Russian Scientific Conference «Cholera. Questions of Epidemiology, Microbiology and Laboratory Diagnostics» [Materialy Rossiyskoy nauchnoy konferentsii «Kholera. Voprosy epidemiologii, mikrobiologii i laboratornoy diagnostiki»]*. Rostov-na-Donu; 1992: 67–71. (in Russian)
55. Bochalgin N.O., Mironova L.V., Khunkheeva Zh.Yu., Solodskaya N.S., Allenov A.V., Balakhonov S.V. Allelic polymorphism of the “household” genes of R-variants of *Vibrio cholerae* isolated in the Primorsky Territory in 2016. *Bakteriologiya*. 2017; 2(3): 52. (in Russian)
56. Bochalgin N.O. Phylogenetic analysis of *Vibrio cholerae* strains isolated from environmental objects in Siberia and the Far East. In: *Materials of the IX All-Russian Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Specialists of Rospotrebnadzor "Modern Problems of Epidemiology, Microbiology and Hygiene" [Materialy IX Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchenykh i spetsialistov Rospotrebnadzora «Sovremennye problemy epidemiologii, mikrobiologii i gigieny»]*. Irkutsk; 2017: 27–8. (in Russian)
57. Bochalgin N.O. Full genomic multilocus sequence typing in the study of the genetic diversity and phylogeny of *Vibrio cholerae*. In: *Materials of the XI All-Russian Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Specialists of Rospotrebnadzor "Modern Problems of Epidemiology, Microbiology and Hygiene" [Materialy XI Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchenykh i spetsialistov Rospotrebnadzora «Sovremennye problemy epidemiologii, mikrobiologii i gigieny»]*. Ufa; 2019: 201–6. (in Russian)
58. Kruglikov V.D., Levchenko D.A., Titova S.V., Moskvitina E.A., Arkhangel'skaya I.V., Gaevskaya N.E., et al. *Vibrio cholerae* in the waters of the Russian Federation. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2019; 98(4): 393–9. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-4-393-399> (in Russian)
59. Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Ezhova M.I., Moskvitina E.A., Titova S.V. Analysis of the results of Cholera vibrios monitoring in environmental objects in the administrative territories of the Russian Federation using the GIS «CHOLERA 1989-2014». *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017; (4): 99-102. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-99-102> (in Russian)
60. Moskvitina E.A., Yanovich E.G., Kruglikov V.D., Titova S.V., Kurilenko M.P., Pichurina N.L., et al. Cholera forecast for the year 2019 based on assessment of epidemiological situation around the world, across CIS and Russia in 2009–2018. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2019; (1): 64–73. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-1-64-73> (in Russian)
61. Borroto R.G. Ecology of *Vibrio cholerae* serogroup O1 in aquatic environments. *Rev. Panam. Salud Publica*. 1997; 1(1): 3–8. <https://doi.org/10.1590/s1020-49891997000100002> (in Spanish)
62. Mekalanos J.J., Rubin E.J., Walder M.K. Cholera: molecular basis for emergence and pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1997; 18(4): 241–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.1997.tb01052.x>

Информация об авторах

Левченко Дарья Александровна[✉] — к.м.н., с.н.с. лаб. микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4676-0377>. E-mail: dasha26091987@hotmail.com

Information about the authors

Darya A. Levchenko[✉] — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Cholera microbiology laboratory, Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4676-0377>. E-mail: dasha26091987@hotmail.com

Архангельская Ирина Викторовна — к.м.н., н.с. лаб. микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7569-8584>.

Кругликов Владимир Дмитриевич — д.м.н., г.н.с. лаб. микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4749-3837>.

Подойницына Оксана Андреевна — к.б.н., н.с. группы молекулярной биологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия.

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-9996-4189>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Irina V. Arhangel'skaya — Cand. Sci. (Med.), researcher, Cholera microbiology laboratory, Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7569-8584>.

Vladimir D. Kruglikov — Doct. Sci. (Med.), main researcher, Cholera microbiology laboratory, Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4749-3837>.

Oksana A. Podoinitsina — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Molecular biology group, Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, 344002, Rostov-on-Don, Russia.

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-9996-4189>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.

НАУКА И ПРАКТИКА

© Степенко А.В., 2020



Причины и последствия несвоевременной вакцинации против коклюшной инфекции в Российской Федерации

Ломоносова А.В.✉

ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский Университет), 119435, Москва, Россия

Введение. Одной из причин роста заболевания коклюшем в Российской Федерации при повсеместном охвате профилактическими прививками более 95% населения является большое количество необоснованных медицинских отводов и отказов родителей и, как следствие, несвоевременное проведение профилактических прививок против коклюшной инфекции.

Материалы и методы. Проанализировано 5101 экстренное извещение о подозрении на заболевание коклюшем у детей до 17 лет в Москве в 2012–2017 гг. и 300 историй развития детей в возрасте до 14 лет в двух поликлиниках. Проведено исследование «случай–контроль» для оценки связи между заболеванием коклюшем и нарушениями в схеме иммунизации.

Результаты. Выявлено, что уровень своевременного проведения иммунизации против коклюша не превышал 5%. Среди причин несвоевременной вакцинации преобладают медицинские отводы (20%) и отказы родителей (45%). В структуре медицинских отводов основными причинами являются перинатальная энцефалопатия, врожденные пороки сердца, дисбактериоз кишечника, аллергические заболевания, анемия и некоторые хронические заболевания.

Обсуждение. Основным принципом для формирования полноценного защитного иммунитета от коклюшной инфекции является введение обязательного полного первичного курса вакцинации от коклюша с завершением 3 прививок в возрасте 10–12 мес и обязательный контроль за своевременным получением бустерной дозы не позже достижения ребенком 2 лет. Кроме того, необходимо введение дополнительных бустерных доз вакцины от коклюша в возрасте 6–7 и 12–14 лет, вакцинации взрослых каждые 10 лет. Целесообразно рассмотреть возможность введения вакцинации будущих матерей в каждую беременность на сроке 27–36 нед, вакцинации медицинского персонала и сотрудников, предоставляющих услуги по уходу за детьми.

Ключевые слова: коклюш; своевременность вакцинации; прививочный анамнез; медицинские отводы; отказ от вакцинации; исследование «случай–контроль».

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Ломоносова А.В. Причины и последствия несвоевременной вакцинации против коклюшной инфекции в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2020; 97(5): 492–502.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-11>

Поступила 05.05.2020

Принята в печать 26.06.2020

Causes and consequences of delayed vaccination against pertussis infection in the Russian Federation

Alena V. Lomonosova✉

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119435, Moscow, Russia

Introduction. One of the reasons for the increase of pertussis in the Russian Federation on the background of the widespread coverage of prophylactic vaccinations of more than 95% is a large number of unreasonable medical recusals and parental refusals and, as a result, untimely prophylactic vaccinations against pertussis infection.

Materials and methods. We analyzed 5101 emergency notifications for pertussis in children under 17 years of age in Moscow in 2012–2017 and 300 child development histories for children under 14 years of age in two clinics in Moscow. A case-control study was conducted to assess the relationship between pertussis and the presence of deviations in the immunization schedule.

Results. It was found that the level of timely immunization against pertussis did not exceed 5%. Medical (20%) and parental refusals (45%) prevail among the reasons for delayed vaccination. In the structure of medical exemption, the main causes are perinatal encephalopathy, congenital heart defects, intestinal dysbiosis, allergic diseases, anemia and some chronic diseases.

Discussion. The main principle for the formation of a full protective immunity from pertussis infection is the mandatory administration of a full primary course of vaccination against pertussis, with the completion of three vaccinations at the age of 10–12 months and mandatory control over the timely receipt of a booster dose no later than the child reaches two years of age. In addition, it is necessary to introduce additional booster doses of pertussis vaccine at the age of 6–7 years, 12–14 years, vaccination of adults every 10 years, as well as consider the introduction of vaccination of expectant mothers in each pregnancy at 27–36 weeks, vaccination for medical personnel and employees who provide child care services.

Keywords: *pertussis; timely vaccination; vaccination history; medical exemption; refusal of vaccination; case-control study.*

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The author declares no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Lomonosova A.V. Causes and consequences of delayed vaccination against pertussis infection in the Russian Federation. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(5): 492–502. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-11>

Received 5 May 2020

Accepted 26 June 2020

Введение

Во многих странах мира, несмотря на высокие охваты специфической вакцинацией, регистрируется подъем заболеваемости коклюшной инфекцией. Представленные ВОЗ статистические данные свидетельствуют, что в 2018 г. в мире было зарегистрировано 151 074 случая коклюша, что на 5% больше, чем в 2017 г., при этом значительно увеличилось число случаев заболевания среди полностью вакцинированных детей и подростков¹. Возможные объяснения этому включают ослабление иммунитета как после вакцинации, так и после перенесенного заболевания, повышение осведомленности клиницистов, а также появление более чувствительных методов лабораторной диагностики.

Однако в исследовании, моделирующем заболеваемость коклюшем в мире и смертность от него, было установлено, что реально в мире насчитывается 24,1 млн случаев коклюша и 160 700 смертей среди детей в возрасте до 5 лет ежегодно (предполагаемое число случаев заболевания находится в диапазоне 7–40 млн, а летальных исходов — 38–670 тыс.). По оценкам авторов, 5,1 млн (21%) предполагаемых случаев заболевания и 85 900 (53%) случаев смерти от коклюша произошли у детей в возрасте до 1 года [1].

В настоящее время в России коклюш остается плохо контролируемым вакцинно-предотвратимым

заболеванием, несмотря на эффективную вакцину и высокие показатели охвата первичными сериями иммунизации. С 2005 г. в целом по Российской Федерации, а с 2012 г. повсеместно во всех регионах страны поддерживается необходимый уровень охвата профилактическими прививками от коклюша, стабильно превышающий 95% [2].

На фоне массовой иммунизации болезнь протекает бессимптомно или с минимальными клиническими проявлениями у значительной части лиц, особенно у подростков и взрослых, а также у детей 4–6 лет, не имеющих достаточно высокий уровень поствакцинального иммунитета, что связано с нарушением схемы вакцинации [3]. При этом, по статистике, более чем в 80% случаев коклюш детям первого года жизни передается в семейных очагах, где основным источником инфекции являются родители, старшие братья и сестры, близкие родственники, а также сотрудники медицинских организаций [4–6].

Хотя дети до 1 года имеют существенно более высокие показатели заболеваемости коклюшем по сравнению с другими возрастными группами, данные национальной системы эпидемиологического надзора за подлежащими регистрации заболеваниями отражают недавнее увеличение числа зарегистрированных случаев коклюша среди детей 7–14 лет [7]. В 2019 г. эта возрастная группа имела вторую по уровню заболеваемости коклюшем в Российской Федерации. По сравнению с 2018 г. в 2 раза увеличилась доля заболевших коклюшем взрослых. В связи с изменением эпидемиологической ситуации возникают важные вопросы о возможном ос-

¹ WHO. Immunization, Vaccines and Biologicals. Pertussis. Available at: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en (accessed 02.05.2020).

лаблени защиты, полученной от детской серии коклюшной вакцинации.

Обеспокоенность по поводу роста числа случаев заболевания коклюшем в России в целом и в Москве в частности и растущего бремени коклюша среди детей в возрасте 7–14 лет, подростков и взрослых побудила провести оценку качества вакцинации против коклюша в детском возрасте. Основная цель исследования заключалась в оценке связи между заболеванием коклюшем у привитых детей до 6 лет и наличием нарушений в схеме иммунизации, в частности нарушений сроков начала вакцинации, введения последующих доз и интервалов между введением прививок.

Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ заболеваемости коклюшем по России в целом и в Москве: проанализировано распределение заболеваемости населения по возрастным группам и оценен удельный вес каждой возрастной группы в структуре заболеваемости. Выборка данных проводилась из формы федерального государственного статистического наблюдения «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» (№ 2) за 2012–2019 гг.

Для оценки охвата и своевременности вакцинации от коклюша детского населения в России в 2012–2019 гг. использовались данные из форм федерального государственного статистического наблюдения «Сведения о профилактических прививках» (№ 5) и «Сведения о контингентах детей и взрослых, привитых против инфекционных заболеваний» (№ 6) за 2012–2019 гг.

Проанализированы своевременность и полнота вакцинации от коклюша, выявлены причины отсутствия вакцинации у заболевших коклюшем детей до 17 лет. Для решения этой задачи было рассмотрено 5101 экстренное извещение о подозрении на заболевание коклюшем в Москве в 2012–2017 гг.

По материалам 300 историй развития ребенка (форма № 112/у) и 300 карт профилактических прививок (форма № 063/у) детей в возрасте до 14 лет проведена оценка полноты и своевременности охвата детей прививками в условиях двух амбулаторно-поликлинических учреждений г. Москвы (ЦАО и СЗАО), а также проанализированы причины отсутствия прививок и нарушения сроков начала и продолжения вакцинации, переносимость вакцинации (наличие поствакцинальных реакций).

Изучена связь между заболеванием коклюшем и наличием нарушений в схеме иммунизации, в частности нарушений сроков начала вакцинации, введения последующих доз и интервалов между введением прививок с помощью наблюдательно-аналитического эпидемиологического исследования с применением метода «случай–контроль». Исследование проводилось в г. Москве, который

был выбран с учетом показателей заболеваемости коклюшем среди всех групп населения, превышающих средние по России.

Размер выборки рассчитан на основе статистической мощности: необходимое минимальное количество участников для уровня доверия 95% — 384. Все случаи основной группы ($n = 245$) были подтвержденными случаями коклюша среди детей в возрасте от 3 мес до 6 лет, зарегистрированными в Москве с 2012 по 2017 г.; контрольной группой ($n = 238$) были дети, не болевшие коклюшем, в той же возрастной группе, которые прикреплены для медицинского обслуживания в двух поликлиниках Москвы. Истории прививок были получены из экстренных извещений о подозрении на заболевание (форма № 058/у) и из медицинских карт развития ребенка (форма № 112/у) для контрольной группы.

Общее количество полученных доз вакцин от коклюша определяли для каждого ребенка. С учетом времени, необходимого для получения иммунного ответа после вакцинации, дозы, полученные менее чем за 2 нед до начала болезни, не были включены в окончательный подсчет доз. Для нашего анализа дозы рассматривались как полученные по графику, если 1-я вакцина была введена в интервале 3–4 мес, 2-я — 4,5–5,5 мес, 3-я — 6–7 мес, а ревакцинация — не позднее 18–19 мес. Участники считались не вакцинированными против коклюша, если экстренное извещение или медицинская карта включали отказы родителей, медицинские отводы или другие документированные сведения о невакцинированном статусе. Лица, не имеющие подтверждений или записей о вакцинации, исключались из анализа.

Время, прошедшее с момента введения предыдущей дозы, а также время сдвига вакцинации от даты, рекомендованной Национальным календарем профилактических прививок (НКПП), рассчитывали для каждого ребенка в днях. Связь между заболеванием коклюшем и нарушениями срока начала соответствующих возрасту прививок в днях оценивали путем определения отношения шансов в интервалах: сдвиги до 30 дней (норма), 31–60, 61–90, 91–120, 121–150, 151–180, 181–365, более 365 дней. Нарушения интервалов между вакцинациями были поделены на страты: до 45 дней (норма), 46–60, 61–75, 76–90, 91–180, 181–365, более 365 дней для интервалов между 1-й и 2-й вакцинацией и между 2-й и 3-й дозами. Для оценки нарушений интервалов между 3-й вакцинацией и ревакцинирующей дозой применялись интервалы: до 365 дней (норма), 366–455, 456–545, 546–635, 636–730, более 731 дня.

В целом из анализа был исключен 1741 случай (34,1%) и 62 контрольных случая (20,7%); 1593 участника не получали вакцин против коклюша.

В работе использованы эпидемиологический и статистические методы исследования. Все статистические анализы проводились в программном

обеспечении R версии 3.6.3. Достоверность различий показателей заболеваемости оценивали с помощью доверительных интервалов. Уровень значимости полученных данных определяли с помощью расчета критерия t , достоверность критерия t — по таблице Стьюдента. Статистическое сравнение демографических характеристик между заболевшими коклюшем и контрольной группой, а также вакцинированными и невакцинированными участниками проводили с использованием критерия Пирсона χ^2 и уровня значимости $p < 0,001$; точный критерий Фишера применяли для сравнения клеток с менее чем 5 наблюдениями.

Результаты

Эпидемиологические особенности и многообразие клинических форм коклюшной инфекции дают основания считать, что ведущая роль в борьбе с распространением коклюша принадлежит вакцинации с широким охватом различных групп населения, но прежде всего своевременной вакцинации детей первого года жизни.

Несмотря на высокий охват профилактическими прививками в России заболеваемость коклюшем растет, и в 2019 г. было зарегистрировано 14 407 случаев заболевания, а показатель заболеваемости коклюшем более чем в 2 раза превысил средний показатель заболеваемости за последние 15 лет (рис. 1). При этом наблюдаются высокие уровни заболеваемости коклюшем среди всех возрастных групп населения.

Результаты анализа возрастной структуры заболевших коклюшем в Москве аналогичны с полу-

ченными данными по России, с тем исключением, что показатели заболеваемости в мегаполисе значительно выше. Самые высокие показатели заболеваемости в Москве в 2012–2019 гг. выявлены в группе детей до 1 года, в возрастных группах 1–2, 3–6 и 7–14 лет заболеваемость находится на одном уровне и в разы ниже, чем у детей первого года жизни (рис. 2). На фоне этого при анализе распределения зарегистрированных случаев коклюша по возрасту обнаружено, что более 35% случаев были выявлены у школьников 7–14 лет. Особенно озабоченность вызывает увеличение числа случаев заболевания среди полностью вакцинированных детей и подростков.

При этом при анализе данных формы № 6 выявлено, что в первое полугодие жизни вакцинированы от коклюша только 0,7% детей в 2017–2018 гг. и 0,8% в 2019 г. На первом году жизни своевременно вакцинированы в 2014–2019 гг. менее 50% детей, а необходимый уровень более 95% в некоторых регионах не достигается даже к 2 годам. Так же ситуация обстоит и с охватом ревакцинацией от коклюша детей 2 лет.

Для оценки своевременности вакцинации проанализированы сроки проведения профилактических прививок у всех заболевших коклюшем детей до 17 лет в Москве в 2012–2017 гг. (табл. 1).

Зачастую было невозможно оценить вакцинацию заболевшего коклюшем ребенка в связи с высокой долей случаев с неизвестным статусом вакцинации (34%). Практически все дети с известным прививочным анамнезом и с зафиксированным случаем коклюша в Москве в 2012–2017 гг. (4821 ребе-



Рис. 1. Заболеваемость коклюшем на 100 тыс. населения и охват прививками от коклюша (%) в России в 2000–2019 гг.

Fig. 1. Pertussis incidence per 100,000 population and pertussis vaccination coverage (%) in the Russian Federation from 2000 to 2019.



Рис. 2. Заболееваемость коклюшем у детей до 17 лет в г. Москве в 2012–2019 гг. (в расчете на 100 тыс. населения).
Fig. 2. Pertussis incidence in children under 18 years of age in Moscow from 2012 to 2019 (per 100,000 population).

нок, или 95%) были вакцинированы с нарушением схемы проведения профилактических прививок, что подтверждает наличие проблемы с охватом иммунизацией среди детей младшего возраста.

Как видно из представленных данных, в большинстве случаев иммунизация проходит с нарушением графика, что связано с медицинскими отводами и отказами родителей от вакцинации. Выявлено, что среди заболевших коклюшем своевременно начат курс вакцинации в 3 мес только 1 ребенку, при этом 261 ребенок (5% от числа заболевших коклюшем детей) не достиг возраста начала вакцинации. Ни одному ребенку в возрасте 6 мес не были введены 3 дозы вакцины от коклюша, по достижении указанного возраста только 7 и 3 детям проведена однократная и двукратная вакцинация соответственно. Менее 3% детей до года имели в анамнезе хотя бы 1 вакцинирующую дозу от коклюша, и только 18 (2,5%) детей в возрасте 2 лет получили полный курс вакцинации с соответствующей ревакцинирующей дозой.

Для группы 3–6 лет каждый третий случай приходится на привитого ребенка, среди детей 7–14 лет доля полностью привитых оказалась близкой к 50%, а среди заболевших коклюшем подростков 15–17 лет получили полный вакцинальный комплекс (3 прививки + ревакцинация) более 60% детей. Именно поэтому детям 6–7 лет и подросткам в возрасте 14 лет необходима дополнительная ревакцинация от коклюша.

Четверть заболевших коклюшем детей не имели в анамнезе ни одной прививки от коклюша. По анализу экстренных извещений, среди общего числа невакцинированных и переболевших коклюшем пациентов не были привиты по причине отказа родителей 565 (45%) детей, причем наибольшее число отказов наблюдается в группах детей 3–6 и 7–14 лет. Значимую долю среди причин отсутствия вакцинации занимают медицинские отводы (20%).

Для оценки эффективности мероприятий по иммунопрофилактике в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.3.2367-08 «Организация иммунопрофилактики инфекционных болезней» был проведен анализ карт ребенка в 2 медицинских организациях Москвы: 158 карт ребенка из поликлиники Центрального административного округа (2009–2017 г.р.) и 142 карты ребенка из поликлиники Северо-Западного административного округа (2005–2016 г.р.). Возраст детей колебался от 0 до 14 лет, 5 детей не достигли возраста начала иммунизации.

Выявлено, что основная причина несвоевременной вакцинации — временные медицинские отводы, которые были зарегистрированы более чем в половине случаев. В поликлинике ЦАО большую долю среди медицинских отводов от вакцинации занимают отводы по причине ОРЗ/ОРВИ (диагноз присутствует в 33% карт детей с медицинскими отводами), открытого овального окна (28%), дисбактериоза кишечника (20%), дакриоцистита (15%), вегетососудистой дистонии (15%), аллергического дерматита (14%), инфекции мочевыводящих путей (14%) и других состояний — лактазной недостаточности (11%), синдрома мышечной дистонии (6%), задержки психомоторного развития (6%), недоношенности (3%), конъюнктивита, грыжи, оперативных вмешательств различной этиологии, анемии, вульвовагинита.

Второй по значимости причиной несвоевременной вакцинации были отказы родителей (выявлено 26 отказов, 19%), третьей — несвоевременная явка на прививку (8 случаев, 6%). В 12 амбулаторных картах данные о причинах несвоевременной вакцинации отсутствовали, в том числе в 5 — в связи с наблюдением в частных медицинских центрах, в 2 — в связи с переездом.

Среди медицинских противопоказаний к вакцинации в поликлинике СЗАО наиболее часто встречались ОРЗ/ОРВИ (19%), сопутствующая ал-

Таблица 1. Возрастной состав и прививочный анамнез детей с подтвержденной коклюшной инфекцией в Москве в 2012–2017 гг.
Table 1. Age structure and vaccination history of children with confirmed pertussis infection in Moscow in 2012–2017

Возрастная группа Age group	1 доза АКДС/АаКДС 1 dose of DTwP/DTaP	2 дозы АКДС/АаКДС 2 doses of DTwP/DTaP	3 дозы АКДС/АаКДС 3 doses of DTwP/DTaP	RV АКДС/ АаКДС RV DTwP/ DTaP	Неизвестное число доз АКДС/АаКДС Unknown number doses DTwP/DTaP	Нет данных о вакци- нации No data on vaccination	Не достиг возраста вакцинации Not reached the age of vaccination	Медицинский отвод от вакцинации Medical exemption from vaccination	Отказ ро- дителей от вакцинации Refusal of parents from vaccination	Причина отсут- ствия вакцина- ции неизвестна Reason for the lack of vaccination is unknown	Итого Total
0–3 мес / months	1	–	–	–	0	97	261	4	10	69	442
4–6 мес / months	7	3	0	–	9	193	–	41	18	56	327
7–12 мес / months	12	7	2	–	8	205	–	35	44	50	363
1–2 года / years	21	7	46	18	28	330	–	57	141	77	725
3–6 лет / years	31	10	30	291	42	336	–	46	194	74	1054
7–14 лет / years	46	13	54	867	174	513	–	71	151	114	2003
15–17 лет / years	1	1	11	59	30	67	–	4	7	7	187
Всего / Total	119	41	143	1235	291	1741	261	258	565	447	5101

лергическая патология (бронхиальная астма, пищевая аллергия) диагностирована у 5% детей; имелись указания на энцефалопатии различного генеза (4%), а также острый аденоидит, гипоксически-ишемическое поражение центральной нервной системы, вентрикулопатия, синдром мышечной дистонии, анемия, черепно-мозговая травма.

При этом по результатам анализа карт в поликлинике СЗАО выявлено, что дети с такими диагнозами, как синдром мышечной дистонии ($n = 24$), атопический дерматит ($n = 6$), энцефалопатия гипоксически-ишемического генеза ($n = 4$), перинатальное поражение центральной нервной системы и внутриутробная гипоксия (по 3 ребенка), задержка темпа моторного развития ($n = 2$), анемия ($n = 2$) и нейтропения ($n = 1$), не имели в анамнезе медицинских отводов по соответствующим заболеваниям, привиты в срок, без осложнений.

При сборе анамнестических данных проводился анализ переносимости проведенной вакцинации. Оценивали нежелательные явления, связанные с иммунизацией: местные реакции (болезненность, покраснение, уплотнение), общие реакции (повышение температуры, вялость, капризность, нарушение сна, снижение аппетита) в течение 3 дней с момента введения вакцины. Не зарегистрировано ни одного серьезного поствакцинального осложнения (анафилактические реакции, афебрильные судороги, коллаптоидные реакции), что могло бы потребовать отвода от выполнения последующей вакцинации или бустеризации. У 27% детей вакцинация однократно сопровождалась развитием местных или общих реакций, все поствакцинальные эффекты у привитых были легкой и умеренной степени выраженности, благополучно проходили в течение 3 сут и не требовали обращения за медицинской помощью.

Как было указано выше, самой частой причиной временного медицинского отвода от вакцинации является ОРЗ/ОРВИ, причем общее количество случаев ОРЗ/ОРВИ, приходящееся на перенос 1 дозы вакцинации у ребенка, доходило до 9. Количество часто болеющих детей до 3 лет составило 13,4%, причем 80% из них — дети до 1 года. Также выявлено, что регистрация первого в жизни ребенка случая ОРЗ/ОРВИ в среднем была в возрасте 6 мес, при этом только у 8 детей заболевание начиналось в возрасте 2 мес и младше, что подтверждает целесообразность проведения первой вакцинации от коклюша в возрасте 6 нед в соответствии с рекомендациями ВОЗ.

Нарушение графика иммунизации приводит к недостаточному иммунному ответу и неполноценному иммунитету к коклюшной инфекции, следствием чего является рост заболеваемости в группах, которые должны быть защищены вакцинацией. Для выявления наиболее важных для защитного им-

Таблица 2. Интервал в днях между введением вакцин от коклюша в анамнезе у детей до 6 лет в городе Москве по сравнению с интервалом, рекомендуемым НКПП

Table 2. The interval in days between the administration of pertussis vaccines in anamnesis in children under 6 years of age in Moscow compared to the interval recommended by the National calendar of preventive vaccinations

Уровень Level	V1–V2			V2–V3		Уровень Level	V3–RV		
	дни days	заболевшие diseased	здоровые no disease	заболевшие diseased	здоровые no disease		дни days	заболевшие diseased	здоровые no disease
0	0–45	19	10	27	21	0	<365	18	21
1	46–60	83	101	48	83	1	366–455	49	88
2	61–75	16	25	20	22	2	456–545	12	23
3	76–90	20	28	17	22	3	546–635	24	12
4	91–180	25	35	32	28	4	636–730	15	1
5	181–365	10	18	9	19	5	>731	4	1
6	>366	7	4	8	9		Всего Total	122	146
	Всего Total	180	221	161	204				

мунитета против коклюша нарушений было проведено исследование «случай–контроль». Все случаи ($n = 245$) были подтвержденными случаями коклюша среди детей в возрасте от 3 мес до 6 лет, зарегистрированными в Москве в 2012–2017 гг.; контрольной группой ($n = 238$) были дети, не болевшие коклюшем, той же возрастной группы, которые прикреплены для медицинского обслуживания в двух поликлиниках. Истории прививок были получены из экстренных извещений (форма № 058/у) о подозрении на заболевание коклюшем для случаев и из медицинских карт (форма № 112/у) для контрольной группы.

По результатам статистической обработки полученных данных по интервалам между введением вакцин у исследуемых групп (табл. 2) установлено,

что наиболее значимым для возможности заболевания коклюшем у привитого ребенка является увеличение интервала между 3-й вакцинацией от коклюша и введением бустерной дозы более чем на год (интервал между 3-й дозой и введением ревакцинирующей дозы составляет более 2 лет) — отношение шансов 17,5 [2,1; 145,3], различия достоверны с $p < 0,001$ (табл. 3).

Распределение участников исследования в зависимости от сдвига в днях между введением вакцин от коклюша в анамнезе и датой, рекомендуемой для введения вакцины по НКПП, представлены в табл. 4. По результатам статистической обработки получены отношения шансов заболеть коклюшем у детей, вакцинированных в соответствии с НКПП, в сравнении с детьми, вакцинированными

Таблица 3. Оценка возрастания риска заболевания коклюшем при увеличении временного интервала между введением противокклюшных вакцин в анамнезе у детей до 6 лет с использованием метода «случай–контроль»

Table 3. Assessment of the increase in the risk of pertussis disease with an increase in the time interval between the administration of anti-pertussis vaccines in children under 6 years of age using the «Case–Control» method

Показатель Index	V1–V2	V2–V3	V3–RV
Уровень 1 против уровня 0 Level 1 against level 0	0,43 [0,19; 0,98]	0,45 [0,23; 0,88]	0,65 [0,32; 1,34]
Уровень 2 против уровня 0 Level 2 against level 0	0,34 [0,13; 0,9]	0,71 [0,31; 1,62]	0,61 [0,24; 1,56]
Уровень 3 против уровня 0 Level 3 against level 0	0,38 [0,14; 0,98]	0,60 [0,26; 1,41]	2,33 [0,92; 5,95]
Уровень 4 против уровня 0 Level 4 against level 0	0,38 [0,15; 0,95]	0,89 [0,41; 1,91]	17,50 [2,1; 145,3]
Уровень 5 против уровня 0 Level 5 against level 0	0,29 [0,1; 0,87]	0,37 [0,14; 0,98]	4,67 [0,48; 45,62]
Уровень 6 против уровня 0 Level 6 against level 0	0,92 [0,22; 3,92]	0,69 [0,23; 2,1]	–

Таблица 4. Сдвиг в днях между введением вакцин от коклюша в анамнезе у детей до 6 лет в г. Москве и датой, рекомендуемой НКПП для введения вакцины

Table 4. Shift in days between the administration of pertussis vaccines in anamnesis in children under 6 years of age in Moscow and the date recommended for the administration of the vaccine by the National calendar of preventive vaccinations

Уровень Level	Сдвиг начала вакцинации, число дней Shift in the beginning of vaccination, number of days	V1		V2		V3		RV		Всего Total
		заболевшие diseased	здоровые no disease							
0	0–30	97	97	59	58	1	40	1	14	366
1	31–60	36	36	31	39	1	28	1	19	191
2	61–90	19	22	13	23	1	27	0	7	112
3	91–120	10	18	12	20	1	2	1	20	84
4	121–150	9	12	10	10	15	0	8	15	79
5	151–180	12	11	8	7	29	4	24	19	114
6	181–365	31	23	24	38	73	35	60	35	319
7	>365	31	19	23	26	40	38	29	17	223
	Всего Total	245	238	180	221	161	174	124	146	1489

ми с нарушением графика, индивидуально по каждому временному диапазону (табл. 5). Выявлено, что наибольшую значимость для вероятности заболеть коклюшем имеет сдвиг в сроках введения 3-й вакцины и ревакцинирующей дозы у привитого ребенка более чем на 4 и 5 мес соответственно ($p < 0,001$).

Обсуждение

Реализацию программы массовой вакцинопрофилактики детей сдерживают ряд факторов: nascence в вакцинации детей с патологиями и сохранившееся предубеждение врачей практического звена здравоохранения к иммунопрофилактике коклюша, особенно цельноклеточными вакцинами,

Таблица 5. Оценка возрастания риска заболевания коклюшем при увеличении сдвига в днях между введением вакцин от коклюша в анамнезе у детей до 6 лет в г. Москве и датой, рекомендуемой для введения вакцины, с использованием метода «случай–контроль»

Table 5. Assessment of the increased risk of pertussis disease with an increase in the shift in days between the administration of pertussis vaccines in anamnesis in children under 6 years of age in Moscow and the date recommended for the administration of the vaccine using the «Case–Control» method

Показатель Index	V1	V2	V3	RV
Уровень 1 против уровня 0 Level 1 against level 0	1,00 [0,59; 1,79]	0,78 [0,43; 1,42]	1,43 [0,08; 23,81]	0,74 [0,04; 12,82]
Уровень 2 против уровня 0 Level 2 against level 0	0,86 [0,44; 1,7]	0,56 [0,26; 1,20]	1,48 [0,1; 29,14]	2,00 [0,11; 36,95]
Уровень 3 против уровня 0 Level 3 against level 0	0,56 [0,24; 1,27]	0,59 [0,27; 1,32]	1,82 [0,1; 30,5]	0,70 [0,04; 12,16]
Уровень 4 против уровня 0 Level 4 against level 0	0,75 [0,3; 1,86]	0,98 [0,38; 2,54]	60,00 [7,06; 509,7]	7,47 [0,82; 67,56]
Уровень 5 против уровня 0 Level 5 against level 0	1,09 [0,46; 2,59]	1,12 [0,38; 3,3]	290,00 [30,79; 2731]	17,68 [2,131; 146,7]
Уровень 6 против уровня 0 Level 6 against level 0	1,35 [0,73; 2,48]	0,62 [0,33; 1,16]	83,43 [11,1; 631,9]	24,00 [3,025; 190,4]
Уровень 7 против уровня 0 Level 7 against level 0	1,63 [0,86; 3,08]	0,87 [0,45; 1,7]	42,11 [6,8; 404]	23,88 [2,881; 198]

опасение неонатологов вводить вакцину недоношенным детям.

В настоящее время только 10% детей можно отнести к практически здоровым. Однако, помимо наличия у ребенка в анамнезе сильной реакции или поствакцинального осложнения на предыдущее введение либо непереносимости компонента вакцины, лишь ограниченное число медицинских диагнозов можно отнести к абсолютным противопоказаниям к введению цельноклеточной АКДС: прогрессирующее заболевание нервной системы и афебрильные судороги в анамнезе (указанные состояния встречаются реже, чем у 1% детей) [8].

Дети с установленным перинатальным поражением нервной системы, или с диагнозом «перинатальная энцефалопатия», зачастую получают не вполне обоснованные отводы от проведения профилактической вакцинации АКДС/АаКДС, что приводит к возникновению сравнительно широкой прослойки неиммунизированных детей, привитых в лучшем случае по «облегченной» схеме вакцинации, когда вместо АКДС использовали АДС и даже АДС-м.

Дети, родившиеся недоношенными (их число в популяции достигает 10–12%), также нередко получают отвод от АКДС-вакцинации без учета объективных обстоятельств. Но недоношенные дети наиболее подвержены инфекционным болезням: так, среди детей, болеющих коклюшем в первые месяцы жизни, риск для недоношенных составляет 1,86, инфекция у них протекает, как правило, тяжело и высока вероятность ее летального исхода [9]. Опыт вакцинации недоношенных детей, включая детей с низкой массой тела, отражен в международных рекомендациях: прививать в соответствии с паспортным возрастом, по обычным схемам в стандартных дозировках, обязательное завершение первичного курса вакцинации и контроль за получением бустерной дозы вакцины от коклюша [10].

Все существующие программы вакцинации направлены в первую очередь на защиту детей до года, у которых часто развивается тяжелая и опасная для жизни форма коклюша, но которые еще не защищены вакцинацией от коклюша в силу возраста. Несколько различных графиков соответствуют рекомендациям Всемирной организации здравоохранения: 6–10–14 нед, 2–3–4 мес, 2–4–6 мес и 3–4–5 мес, которые наиболее часто используются во всем мире [11, 12]. По результатам опубликованного исследования детерминированной математической модели возрастной структуры для передачи коклюша были проанализированы уровни заболеваемости при применении четырех вышеупомянутых графиков иммунизации. Полученные результаты показали, что 6–10–14 нед — лучший вариант графика, результатом перехода на который является

примерно 36% снижения заболеваемости детей до года по сравнению с графиком 2–4–6 мес.

Для защиты детей до формирования ими иммунитета в результате первичной серии вакцинации перспективным решением является вакцинация матерей во время беременности, причем рекомендуется получать бустерную дозу во время каждой беременности. В странах, которые ввели иммунизацию матерей во время беременности, было выявлено значительное снижение показателя младенческой смертности [13–15]. Бустер следует вводить между 20 и 36 нед, хотя он может быть сделан в любое время в течение беременности. В настоящее время имеющиеся данные свидетельствуют о том, что вакцинация в период 27–36 нед позволит максимизировать пассивный перенос антител к младенцу [16].

Подростки и взрослые (например, родители, братья или сестры, бабушки и дедушки, сотрудники, предоставляющие услуги по уходу за детьми и медицинский персонал, работающий с детьми), которые имеют или ожидают постоянный тесный контакт с младенцем младше 12 мес, должны получать разовую бустерную дозу для защиты от коклюша по крайней мере за 2 нед до начала тесного контакта с ребенком.

Многие стороны организации вакцинации детей в поликлиниках по-прежнему требуют совершенствования. Выявлено, что большинство детей имеют нарушенный график вакцинации. В поликлиниках ведущими причинами отклонений от НКПП в графике вакцинации в основном были отказы родителей от вакцинации, несвоевременная явка на прививку и временные медицинские отводы. Анализ причин несвоевременной иммунизации против коклюша свидетельствует о том, что нередко встречаются случаи отводов от вакцинации детей, не имеющих должных противопоказаний. Основными неоправданными причинами отводов и задержек вакцинации являются перинатальная энцефалопатия, врожденные пороки сердца, аллергические заболевания, анемия и некоторые хронические заболевания. Отсутствие осложнений и низкий процент поствакцинальных реакций (1%) у детей, в том числе с отклонениями в состоянии здоровья, подтверждают клиническую переносимость и безопасность вакцинации против коклюша.

В целях снижения заболеваемости коклюшем детей дошкольного возраста необходимо проводить контроль своевременного начала вакцинации от коклюша и соблюдения регламентированных НКПП интервалов между введением вакцин. Проведенное нами эпидемиологическое исследование «случай–контроль» подтверждает, что основным принципом для формирования полноценного защитного иммунитета от коклюшной инфекции у детей является введение обязательного полного первичного курса

вакцинации с завершением трех прививок в возрасте 10–12 мес и обязательный контроль за своевременным получением бустерной дозы не позже достижения ребенком 2 лет. При выполнении этих условий с большой уверенностью можно утверждать, что сформированный иммунитет против коклюша позволит защитить ребенка от заболевания до момента поступления в школу.

Кроме того, для стабилизации и последующего снижения заболеваемости коклюшной инфекцией в России необходимо ввести дополнительные бустерные дозы вакцины от коклюша в возрасте 6–7, 12–14 лет, вакцинацию взрослых каждые 10 лет, а также рассмотреть возможность введения вакцинации будущих матерей в каждую беременность на сроке 27–36 нед и обязательной вакцинации для медицинского персонала и сотрудников, предоставляющих услуги по уходу за детьми (первоочередное внимание следует уделять сотрудникам, имеющим непосредственный контакт с младенцами в возрасте 12 мес и младше).

ЛИТЕРАТУРА

1. Yeung K.H.T., Duclos P., Nelson E.A.S., Hutubessy R.C.W. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect. Dis.* 2017; 17(9): 974–80. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30390-0](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30390-0)
2. Степенко А.В., Миндлина А.Я. Управление рисками развития эпидемического процесса коклюша: упущенные возможности и новые перспективы. *Медицинский альманах.* 2017; (4): 83–6.
3. Althouse B.M., Scarpino S.V. Asymptomatic transmission and the resurgence of Bordetella pertussis. *BMC Med.* 2015; 13: 146. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12916-015-0382-8>
4. Skoff T.H., Kenyon C., Cocoros N., Liko J., Miller L., Kudish K., et al. Sources of infant pertussis infection in the United States. *Pediatrics.* 2015; 136(4): 635–41. DOI: <http://doi.org/10.1542/peds.2015-1120>
5. Fedele G., Carollo M., Palazzo R., Stefanelli P., Pandolfi E., Gesualdo F., et al. Parents as source of pertussis transmission in hospitalized young infants. *Infection.* 2017; 45(2): 171–8. DOI: <http://doi.org/10.1007/s15010-016-0943-6>
6. Kara E.O., Campbell H., Ribeiro S., Fry N.K., Litt D., Eletu S. Survey of household contacts of infants with laboratory-confirmed pertussis infection during a national pertussis outbreak in England and Wales. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2017; 36(2): 140–5. DOI: <http://doi.org/10.1097/INF.0000000000001378>
7. Субботина К.А., Фельдблюм И.В., Кочергина Е.А., Лехтина Н.А. Эпидемиологическое обоснование к изменению стратегии и тактики специфической профилактики коклюша в современных условиях. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2019; 18(2): 27–33. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-27-33>
8. Каплина С.П., Харит С.М., Скрипченко Н.В. Вакцинирование детей с неврологическими нарушениями (обзор литературы). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2016; 15(2): 66–72. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-2-66-72>
9. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Беляева И.А., Давыдова И.В., Володин Н.Н., Вишнева Е.А. и др. Иммунопрофилактика инфекционных болезней у недоношенных детей. *Педиатрическая фармакология.* 2018; 15(5): 376–89. DOI: <http://doi.org/10.15690/pf.v15i5.1960>

10. Зверев В.В., Семенов Б.Ф., Хаитов Р.М., ред. *Вакцины и вакцинация. Национальное руководство.* М.: ГЕОТАР-Медиа; 2014.
11. Bergero P.E., Fabricius G., Hozbor D.F., Theeten H., Hens N. Potential impact of changes in the Schedule for primary diphtheria-tetanus toxoids-pertussis immunization as control strategy for pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2018; 37(2): e36–e42. DOI: <http://doi.org/10.1097/INF.0000000000001752>
12. Pertussis vaccines: WHO position paper – September 2015. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2015; 90(35): 433–58.
13. Dabrera G., Amirhalingam G., Andrews N., Campbell H., Ribeiro S., Kara E., et al. A case-control study to estimate the effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in England and Wales, 2012–2013. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 60(3): 333–7. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/ciu821>
14. Amirhalingam G., Campbell H., Ribeiro S., Norman K.F., Ramsay M., Miller E., et al. Sustained effectiveness of the maternal pertussis immunization program in England 3 years following introduction. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 63(Suppl. 4): S236–43. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/ciw559>
15. Winter K., Cherry J.D., Harriman K. Effectiveness of prenatal tetanus, diphtheria, and acellular pertussis vaccination on pertussis severity in infants. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64(1): 9–14. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/ciw633>
16. Petousis-Harris H., Walls T., Watson D., Paynter J., Graham P., Turner N. Safety of Tdap vaccine in pregnant women: an observational study. *BMJ Open.* 2016; 6(4): e010911. DOI: <http://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010911>

REFERENCES

1. Yeung K.H.T., Duclos P., Nelson E.A.S., Hutubessy R.C.W. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect. Dis.* 2017; 17(9): 974–80. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30390-0](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30390-0)
2. Stepenko A.V., Mindlina A.Ya. Risk management of the development of epidemiological whooping cough process: lost possibilities and new prospects. *Meditsinskiy al'manakh.* 2017; (4): 83–6. (in Russian)
3. Althouse B.M., Scarpino S.V. Asymptomatic transmission and the resurgence of Bordetella pertussis. *BMC Med.* 2015; 13: 146. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12916-015-0382-8>
4. Skoff T.H., Kenyon C., Cocoros N., Liko J., Miller L., Kudish K., et al. Sources of infant pertussis infection in the United States. *Pediatrics.* 2015; 136(4): 635–41. DOI: <http://doi.org/10.1542/peds.2015-1120>
5. Fedele G., Carollo M., Palazzo R., Stefanelli P., Pandolfi E., Gesualdo F., et al. Parents as source of pertussis transmission in hospitalized young infants. *Infection.* 2017; 45(2): 171–8. DOI: <http://doi.org/10.1007/s15010-016-0943-6>
6. Kara E.O., Campbell H., Ribeiro S., Fry N.K., Litt D., Eletu S. Survey of household contacts of infants with laboratory-confirmed pertussis infection during a national pertussis outbreak in England and Wales. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2017; 36(2): 140–5. DOI: <http://doi.org/10.1097/INF.0000000000001378>
7. Subbotina K.A., Fel'dblyum I.V., Kochergina E.A., Lekhtina N.A. Epidemiological rationale for changing the strategy and tactics of vaccination of pertussis in current conditions. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2019; 18(2): 27–33. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-27-33> (in Russian)
8. Kaplina S.P., Kharit S.M., Skripchenko N.V. Vaccination for children with neurological and genetic violations (literature review). *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2016; 15(2): 66–72. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-2-66-72> (in Russian)
9. Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Belyaeva I.A., Davydova I.V., Volodin N.N., Vishneva E.A., et al. Immunoprophylaxis of infectious diseases in premature infants. *Pediatrics.*

cheskaya farmakologiya. 2018; 15(5): 376-89.

DOI: <http://doi.org/10.15690/pf.v15i5.1960> (in Russian)

10. Zverev V.V., Semenov B.F., Khaitov R.M., eds. *Vaccines and Vaccination. National Guidelines [Vaktsiny i vaktsinatsiya. Natsional'noe rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2014. (in Russian)
11. Bergero P.E., Fabricius G., Hozbor D.F., Theeten H., Hens N. Potential impact of changes in the Schedule for primary diphtheria-tetanus toxoids-pertussis immunization as control strategy for pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2018; 37(2): e36-e42. DOI: <http://doi.org/10.1097/INF.0000000000001752>
12. Pertussis vaccines: WHO position paper – September 2015. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2015; 90(35): 433-58.
13. Dabrera G., Amirthalingam G., Andrews N., Campbell H., Ribeiro S., Kara E., et al. A case-control study to estimate the effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in England and Wales, 2012-2013. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 60(3): 333-7. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/ciu821>
14. Amirthalingam G., Campbell H., Ribeiro S., Norman K.F., Ramsay M., Miller E., et al. Sustained effectiveness of the maternal pertussis immunization program in England 3 years following introduction. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 63(Suppl. 4): S236-43. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/ciw559>
15. Winter K., Cherry J.D., Harriman K. Effectiveness of prenatal tetanus, diphtheria, and acellular pertussis vaccination on pertussis severity in infants. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64(1): 9-14. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/ciw633>
16. Petousis-Harris H., Walls T., Watson D., Paynter J., Graham P., Turner N. Safety of Tdap vaccine in pregnant women: an observational study. *BMJ Open.* 2016; 6(4): e010911. DOI: <http://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010911>

Информация об авторе:

Ломоносова Алена Вячеславовна  — ассистент кафедры эпидемиологии и доказательной медицины Института общественного здоровья имени Ф.Ф. Эрисмана ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119435, Москва, Россия. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6280-4325>. E-mail: astepenko@rambler.ru

Information about the author:

Alena V. Lomonosova  — assistant, Department of epidemiology and evidence-based medicine, Public Health Institute named after F.F. Erisman, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119435, Moscow, Russia. ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6280-4325>. E-mail: astepenko@rambler.ru

РЕЦЕНЗИЯ

© Суворов А.Н., 2020



Рецензия на монографию Boris A. Shenderov, Alexander V. Sinitsa, Mikhail M. Zakharchenko, Christine Lang «Metabiotics. Present State, Challenges and Perspectives» (Springer Nature Switzeland AG, 2020)

В опубликованной на английском языке в известном зарубежном издательстве книге трех российских исследователей — доктора медицинских наук, профессора Б.А. Шендерова, кандидата технических наук А.В. Синицы, кандидата медицинских наук М.М. Захарченко — и консультанта правительства Германии в области биоэкономики С. Lang увлеченно обсуждаются все аспекты предыдущих, настоящих и будущих направлений научных исследований по разработке и практическому применению новой группы биологически активных биодобавок и лекарственных препаратов (метабиотики/постбиотики), изготавливаемых на основе множества низкомолекулярных соединений, продуцируемых представителями симбиотической микробиоты человека. Это вещества схожи по структуре, биоактивной и сигнальной активности с молекулами, обнаруживаемыми у клеток тканей и органов человека, а также в составе различных продуктов питания.

Как известно, индивидуальный фенотип каждого человека является результатом взаимодействия продуктов экспрессии его генетического аппарата с совокупной продукцией микробиома (генов бактерий, вирусов, архей, простейших и грибов) между собой и средой обитания. Человеческий суперорганизм в процессе эволюции отбирал для себя те микроорганизмы, которые функционально и метаболически были наиболее оптимальными для его роста и развития.

Взаимоотношения между хозяином и его симбиотической микробиотой в конкретных условиях среды обитания — один из основных факторов, определяющих рост, развитие, здоровье, риск метаболических мультифакторных заболеваний и среднюю продолжительность жизни человека. Взаимодействие между организмом и его симбиотической микробиотой связано с широким набором низкомолекулярных микробных соединений, способных активировать, ингибировать, модифицировать

процессы, функции и реакции различных органов и тканей. Дефицит или нарушение состава симбиотической микробиоты, прежде всего присутствующей в пищеварительном тракте организма хозяина, при воздействии на него различных биотических и абиотических факторов приводит к дисбалансу микробных и клеточных метаболитов, что может явиться фактором риска многих метаболических заболеваний.

До настоящего времени наиболее распространенным способом сохранения и восстановления микробной экологии человека является прием пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков. К сожалению, благоприятные эффекты пробиотиков, изготовленных на основе живых микроорганизмов, обычно кратковременны и определяются особенностями микробиоты пациента с дисбиозом. Кроме того, оказалось, что некоторые традиционные пробиотики могут вызывать различные побочные эффекты, особенно у иммунокомпрометированных пациентов. В связи с этим в последние 15–20 лет для поддержания и восстановления микробной экологии в медицинскую практику все шире начинают внедрять новые микроэкологические средства, в основе которых — использование отдельных или широкого профиля низкомолекулярных соединений микробного происхождения, получивших в научной литературе название *метабиотиков*. Основоположниками этого микроэкологического приема поддержания и восстановления микробной экологии стали немецкие и российские исследователи, в том числе авторы рецензируемой монографии.

Метабиотики являются структурными компонентами известных и новых штаммов и видов симбиотических (пробиотических) микроорганизмов, и/или их метаболитов, и/или сигнальных молекул с определенной (известной) химической структурой, которые при оральном (или ином) применении способны оптимизировать специфические для организма-хозяина физиологические функции, ме-

таболические, эпигенетические, информационные, регуляторные, транспортные и/или поведенческие реакции, связанные с деятельностью симбиотической микробиоты. Метабиотики могут выступать как самостоятельные средства в виде лекарственных препаратов, биологически активных добавок к пище или как функциональные продукты питания, обогащенные этими низкомолекулярными соединениями. Последующие генерации полусинтетических, синтетических и гибридных метабиотиков могут стать аналогами или улучшенными копиями природных микробных низкомолекулярных соединений. Метабиотики — это новая нутритивная и микрoэкологическая стратегия поддержания здоровья, активного долголетия и профилактики хронических метаболических заболеваний, реализация которой позволяет резко снизить риск и прогрессирование основных «болезней цивилизации». В сравнении с традиционными пробиотиками они имеют более длительный период сохранности, четкие мишени

приложения, их легче дозировать, их безопасность легче контролировать, они лучше абсорбируются, метаболизируются, распределяются по организму, тканям и органам. Эффекты метабиотиков могут реализовываться на различных уровнях макроорганизма: молекулярном, клеточном, в межклеточном матриксе, тканях, органах, физиологических системах и в целом организме.

Прочтение этой книги студентами, аспирантами и авторитетными учеными нашей страны, обучающимися или специализирующимися в медицине, диетологии, микробиологии, биохимии и пищевых технологиях, поможет ознакомиться с российскими и международными идеями и направлениями исследований в области метабиотиков, связанных с активностью симбиотической микробиоты. Надеюсь, что сведения, полученные читателями этой книги, будут также способствовать установлению и налаживанию новых профессиональных контактов.

А.Н. Суворов, доктор медицинских наук,
профессор, член-корреспондент РАН,
заведующий отделом молекулярной микробиологии
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»