

ISSN 0372.9311

ЖУРНАЛ

МИКРОБИОЛОГИИ  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ  
И  
ИММУНОБИОЛОГИИ

Издательский  
дом



С-ИНФО

3 2016

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY  
EPIDEMIOLOGY  
AND  
IMMUNOBIOLOGY



4 602607 00085

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

СОЮЗ ПЕДИАТРОВ РОССИИ

ООО «С-ИНФО»

# ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

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

*Двухмесячный научно-практический журнал*

*Основан в 1924 г.*

3

май—июнь

МОСКВА 2016

«С-ИНФО»

## СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

АДАМБЕКОВ Д.А. (Бишкек), БРУСИНА Е.Б. (Кемерово), ЗУЕВА Л.П. (Санкт-Петербург), КОРОЛЮК А.М. (Санкт-Петербург), МАГАЗОВ Р.Ш. (Уфа), МЕЛЬНИЧЕНКО П.И. (Москва), МИНИН Г.Д. (Уфа), ПРИСАКАРЬ В.И. (Кишинев), СОЛОДОВНИКОВ Ю.П. (Москва), ТИТОВ Л.П. (Минск), ФРОЛОВ А.Ф. (Киев), ШАРКОВА В. (Владивосток), ШВАГЕР М.М. (Ростов), ШЕНДЕРОВ Б.А. (Москва), ШКАРИН В.В. (Н.Новгород), ШУРАТОВ И.Х. (Алматы), ЯСТРЕБОВ В.К. (Омск)

Адрес редакции и издателя:

121059, Москва, ООО «С-инфо», а/я 88,

редакция ЖМЭИ (для отправки статей и запросов о прохождении статей)

Телефон редакции: (495) 796-92-91 (не для справок о прохождении статей)

Зав. редакцией Л.В.Иванчева

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору  
в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.

Свидетельство ПИ № ФС77-36745

Индексы 71436 : 1 111 р. 44 к. (цена за полугодие)  
16729

<http://www.jmicrobiol.com>

Журнал входит в базу данных: PubMed, Scopus, Web of Science, Chemical Abstract.  
Журнал входит в перечень ВАКовских изданий

**УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ И АВТОРЫ ЖМЭИ!  
ПОДДЕРЖИТЕ ЖУРНАЛ, ПОДПИСАВШИЕСЯ  
НА II ПОЛУГОДИЕ 2016 Г. ИНДЕКСЫ ПОДПИСКИ СМ. ВЫШЕ.**

---

Подписано в печать 25.05.16. Выход в свет 14.06.16. Формат 70x108 1/16  
Печать офсетная. Тираж 1000. Заказ 24-2016

---

Отпечатано в АО «Красная Звезда»  
123007, Москва, Хорошевское шоссе, д. 38  
Тел.: (495)941-28-62, (495)941-34-72, (495)941-31-62  
[www.redstarph.ru](http://www.redstarph.ru)  
E-mail: [kr\\_zvezda@mail.ru](mailto:kr_zvezda@mail.ru)

© «С-инфо», 2016

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

О.В.Бухарин, Н.Б.Перунова, Е.В.Иванова, С.В.Андрющенко

### МЕЖМИКРОБНОЕ РАСПОЗНАВАНИЕ «СВОЙ-ЧУЖОЙ» В ПАРЕ «ДОМИНАНТ-АССОЦИАНТ» ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* M-17 И *ESCHERICHIA COLI* ЛЭГМ-18

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург

**Цель.** Разработанный ранее метод межмикробного распознавания «свой-чужой» в паре «доминант-ассоциант» использовать для оценки чужеродности пробиотических культур *Escherichia coli* M-17 (с островом патогенности) и *E. coli* ЛЭГМ-18 (без острова патогенности). **Материалы и методы.** В качестве доминантов в работе использованы эталонные и клинические штаммы бифидобактерий, в качестве ассоциантов взяты культуры *E. coli* M-17 и ЛЭГМ-18, различающиеся по наличию генов, кодирующих колибактин. Определение феномена микробного распознавания проводили по разработанному алгоритму (Бухарин О.В., Перунова Н.Б., 2011), основанному на принципе индукции метаболитов в результате предварительного соинкубирования доминантов (бифидобактерий) с супернатантом ассоциантов и формирования обратной связи в паре «доминант-ассоциант». В качестве биологических характеристик исследуемых кишечных палочек были определены ростовые свойства, биоупленкообразование и антилизоцимная активность. **Результаты.** Тестирование культуры *E. coli* M-17 выявило угнетение изучаемых биологических признаков, и она оценивалась как «чужая», вероятно, за счет наличия острова патогенности, тогда как *E. coli* ЛЭГМ-18 (без этого фрагмента) резко усиливала свои биологические характеристики и подлежала оценке как «своя». **Заключение.** Использование межмикробного распознавания «свой-чужой» в паре «доминант-ассоциант» перспективно в качестве базового метода при отборе пробиотических штаммов и культур микроорганизмов для создания новых синбиотических композиций и пригодно для контроля за качеством пробиотической продукции.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 3—9

**Ключевые слова:** межмикробное распознавание «свой-чужой», метаболиты микроорганизмов, индукция, доминанты, ассоцианты, бифидобактерии, *Escherichia coli* M-17, *Escherichia coli* ЛЭГМ-18, колибактин, пробиотики

O.V.Bukharin, N.B.Perunova, E.V.Ivanova, S.V.Andryuschenko

### INTERMICROBIAL «SELF-NON-SELF» DISCRIMINATION IN «DOMINANT-ASSOCIANT» PAIR OF PROBIOTIC STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* M-17 AND *E.COLI* LEGM-18

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

**Aim.** To use earlier developed method of intermicrobial «self-non-self» discrimination in «dominant-associant» pair for the assessment of foreignness of probiotic cultures of *Escherichia coli* M-17 (with pathogenicity island) and *E. coli* LEGM-18 (without pathogenicity island). **Materials and methods.** As dominants reference and clinical strains of bifidobacteria were used in the work, cultures of *E. coli* M-17 and *E. coli* LEGM-18 were taken as associants, differing in the presence of genes which code colibactin. Detection of the phenomenon of microbial discrimination was conducted according to the developed algorithm (Bukharin O.V., Perunova N.B., 2011) based on the principle of metabolite induction as a result of preliminary coinubation of dominants



(bifidobacteria) with supernatant of associants and the formation of feed back in «dominant-associant» pair. Special growth properties, biofilm formation, and antilysozyme activity served as biological characteristics of investigated coliform bacteria. *Results.* Testing of *E. coli* M-17 culture revealed depression of biological properties under investigation and it was estimated as «non-self» possibly due to the presence of pathogenicity island whereas *E. coli* LEGM-18 (without this fragment) sharply strengthened its biological characteristics and was subjected to assessment as «self». *Conclusion.* Use of intermicrobial «self-non-self» discrimination in «dominant-associant» pair is promising as basic method when selecting probiotic strains and cultures for creation of new symbiotic compositions and is suitable for quality control of probiotic products.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 3–9

Key words: intermicrobial «self-non-self» discrimination, metabolites of microorganisms, induction, dominants, associants, bifidobacteria, *Escherichia coli* M-17, *Escherichia coli* LEGM-18, colibactin, probiotics

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что живые организмы, не зависимо от уровня сложности (от прокариот до высших эукариот), имеют системы защиты от чужеродной информации [5, 10]. Механизмы самоидентификации и микробного распознавания в настоящее время активно изучаются на модели роста различных культур бактерий на поверхности агаровых сред [7, 15]. Однако при этом не известно, как будут складываться взаимоотношения микроорганизмов в бульонной культуре, а также с учетом микробных метаболитов в этом процессе, тогда как на значение метаболитов микроорганизмов при формировании межмикробных взаимоотношений, указывали в своей работе Shank A.E. и Kolter R. [14], связывая регуляторные взаимодействия микроорганизмов с наличием в супернатанте «сигнальных» молекул. Это не исключает, что фенотипические изменения микробных популяций при их взаимодействии осуществляются с помощью молекул, которые используются в качестве индукторов новых метаболитов-посредников, оказывающих влияние на формирование антагонистических/синергидных связей микроорганизмов в ассоциации [3].

Использование приема индукции микробными метаболитами в условиях пары «доминант-ассоциант» с последующим определением антагонистических/синергидных типов связей между микросимбионтами способствовало созданию алгоритма микробного распознавания «свой-чужой» на модели микросимбионтов дистального отдела толстого кишечника человека. Разработка метода определения «чужеродности» штаммов микроорганизмов позволила дифференцировать «свои» и «чужие» культуры микросимбионтов среди клинических изолятов бактерий и грибов [2].

Очевидно, что присутствие в супернатанте микроорганизмов факторов, связанных с патогенностью и персистентными свойствами микроорганизмов, значимо для микробного «распознавания», что было выявлено фенотипически в ряде экспериментов. Показано, что наличие токсинов (гемолизина, энтеротоксина) и факторов, обеспечивающих антилизосомный признак энтеробактерий, позволяет доминантной микрофлоре (бифидобактериям) «распознавать» штаммы в качестве «чужеродных» в условиях стабильного подавления параметров репродукции и адаптации микроорганизмов [3]. Однако вопрос о химической природе этих факторов остается открытым. Кроме того, выяснение механизмов феномена микробного распознавания требует создания моделей *in vitro*, основанных на оппозитных штаммах одного и того же вида микроорганизмов, различающихся по своим биологическим характеристикам, метаболическому и генетическому профилю.

В продолжение исследований микробного распознавания «свой-чужой» были

выбраны культуры *Escherichia coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18. Целью данного исследования явилось определение различий в распознавании бифидобактериями «чужеродности» среди штаммов кишечных палочек, различающихся по наличию острова патогенности, кодирующего колибактин.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение феномена микробного распознавания проводили по разработанному алгоритму [2], основанному на принципе индукции метаболитов в результате предварительного соинкубирования доминантов (бифидобактерий) с супернатантом ассоциантов и формировании обратной связи в паре «доминант-ассоциант». При этом соинкубирование микробных культур с метаболитами проводили в несколько этапов, оценивая результат по изменению базовых параметров физиологических характеристик микросимбионтов: ростовые свойства (рост/размножение, РС), био пленкообразование (БПО) и антилизоцимная активность (АЛА).

В качестве доминантов использовали эталонные штаммы бифидобактерий: *Bifidobacterium bifidum* 791 (№ депонента АС-1247 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ГосНИИ «Генетика»), *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 (ГИСК им. Л.А.Тарасевича), являющиеся производственными пробиотическими культурами. Также были использованы клинические культуры *Bifidobacterium longum* 505, *Bifidobacterium bifidum* 349, *Bifidobacterium catenulatum* 504, изолированные от пациентов при обследовании на дисбиоз кишечника. Выделение и идентификацию бифидобактерий осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями [9].

В качестве культур ассоциантов, в отношении которых изучалась способность бифидобактерий дифференцировать «свои» и «чужие» штаммы, использовали эталонные культуры бактерий *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18 (№ депонента В-6240 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика»). Ранее было установлено, что штамм *E. coli* М-17 содержит введенную неконъюгативную, немобилизуемую плазмиду pColar, несущую гены продукции колицина Е1 и детерминант устойчивости к ампициллину в дозах до 150 мг/л, а также гены clbV, clbN, clbA и clbQ, ассоциированные с образованием генотоксического колибактина [1, 8]. Культура *E. coli* ЛЭГМ-18 была получена от здорового человека, предложена в качестве нового штамма для производства колибактерина (патент РФ № 2065875) и не содержит острова патогенности, кодирующего четырехгенную систему нерибосомального синтеза гибридного пептидополикетидного генотоксина и индуцирующего двухцепочечные разрывы ДНК в эукариотических клетках [12].

При реализации алгоритма «свой-чужой» на 1 этапе исследований штаммы бифидобактерий индуцировали метаболитами *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18 методом предварительного соинкубирования. Для этого были получены супернатанты (СН) *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18 из «ночных» бульонных культур микроорганизмов. Далее бульонные культуры кишечных палочек центрифугировали (3200 об/мин 15 минут) и пропускали внеклеточную жидкость через мембранные фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,2 мкм. Метаболиты кишечной палочки соинкубировали со взвесями бифидобактерий ( $9 \times 10^8$  КОЕ/мл, 3 McF) в соотношении 1:2 в течение 1 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Binder, Германия). В качестве контрольных проб служили штаммы бифидобактерий, к которым вместо супернатантов *E. coli* добавляли питательный бульон в эквивалентном соотношении. После соинкубирования смеси культуры бифидобактерий с метаболитами кишечных палочек ее трижды отмывали физраствором (0,9% NaCl), ресуспендировали в питательном Schaedler-бульоне (BBL, США) и культивировали в течение 48 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Binder, Германия).

На 2 этапе изучали влияние метаболитов индуцированных и контрольных проб

бифидобактерий на биологические свойства (ростовые свойства, биоуплотнение и антилизоцимную активность) изучаемых культур *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18. Для этого из бульонных культур бифидобактерий получали супернатант и добавляли его в соотношении 1:9 в питательный бульон со взвесью кишечных палочек (3 McF). Культивировали штаммы в течение 24 часов при 37°C.

На 3 этапе определяли изменение биомассы культуры (ростовые свойства), способность к образованию биоуплотнения и антилизоцимную активность изучаемых культур кишечных палочек в опытных и контрольных пробах фотометрическим методом на 8-канальном планшетном фотометре ELx808 (BioTek, США). В качестве контроля на каждом этапе исследований вместо СН микроорганизмов использовали эквивалентное количество питательного бульона.

Оценку полученных данных проводили по изменению РС, АЛА и БПО кишечных палочек в сравнении с исходными биологическими характеристиками изучаемых культур, и по снижению изучаемых параметров штаммы относили к «чужим» видам. А при увеличении РС, АЛА и БПО ассоциантов культуры микроорганизмов относили к «своим» видам [2].

Статистическую обработку данных осуществляли методом вариационной статистики из пакета прикладных программ Microsoft Office Excel и программы Биостат путем подсчета М и m; данные по определению регулирующего влияния бифидобактерий на биологические свойства кишечных палочек — непараметрическими методами с применением критерия Манна-Уитни. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке полученных результатов следует обратить внимание на то, что в начале опыта был поставлен контроль изучаемых биологических характеристик *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18. В табл. суммированы эти данные на основании 9 дублей опытов, и оказалось, что различия между изучаемыми культурами были отмечены только в отношении пролиферативной активности бактерий, которая значительно выше была у *E. coli* М-17, где РС составили  $0,93 \pm 0,06$  ед $\times$ ОП<sub>450</sub>, тогда как для *E. coli* ЛЭГМ-18 этот показатель был ниже —  $0,57 \pm 0,1$  ед $\times$ ОП<sub>450</sub> ( $p \leq 0,05$ ). Характеристики БПО и АЛА у сравниваемых кишечных палочек существенно не различались. У *E. coli* М-17 эти показатели составили для БПО —  $0,3 \pm 0,03$  ед $\times$ ОП<sub>630</sub>, АЛА —  $0,52 \pm 0,1$  мкг/мл $\times$ ОП<sub>450</sub>, а для штамма *E. coli* ЛЭГМ-18

**Динамика биологических свойств пробиотических культур *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18 под воздействием метаболитов бифидобактерий при межмикробном распознавании «свой-чужой»**

Исследуемые ассоцианты		<i>E. coli</i> М-17			<i>E. coli</i> ЛЭГМ-18		
		РС, ед. ОП <sub>450</sub>	БПО, ед. ОП <sub>630</sub>	АЛА, мкг/мл $\times$ ОП <sub>450</sub>	РС, ед. ОП <sub>450</sub>	БПО, ед. ОП <sub>630</sub>	АЛА, мкг/мл $\times$ ОП <sub>450</sub>
		контроль 0,93 $\pm$ 0,06	контроль 0,3 $\pm$ 0,03	контроль 0,52 $\pm$ 0,1	контроль 0,57 $\pm$ 0,1	контроль 0,25 $\pm$ 0,09	контроль 0,4 $\pm$ 0,08
Эталонные культуры	<i>B. bifidum</i> № 791 <sub>к</sub>	0,94 $\pm$ 0,2	0,33 $\pm$ 0,04	0,87 $\pm$ 0,03*	0,56 $\pm$ 0,07	0,57 $\pm$ 0,004*	0,48 $\pm$ 0,005*
	<i>B. bifidum</i> № 791 <sub>инд.</sub>	0,76 $\pm$ 0,03**	0,24 $\pm$ 0,02**	0,15 $\pm$ 0,03**	0,75 $\pm$ 0,02*	0,96 $\pm$ 0,03*	0,39 $\pm$ 0,04
	<i>B. adolescentis</i> М-42 <sub>к</sub>	0,77 $\pm$ 0,003**	0,28 $\pm$ 0,04	0,53 $\pm$ 0,07	0,55 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,09*	0,65 $\pm$ 0,1*
	<i>B. adolescentis</i> М-42 <sub>инд.</sub>	0,65 $\pm$ 0,04**	0,2 $\pm$ 0,02**	0,14 $\pm$ 0,03**	0,7 $\pm$ 0,09*	0,61 $\pm$ 0,05*	1,01 $\pm$ 0,3*
Клинические культуры	<i>B. longum</i> 505 <sub>к</sub>	0,9 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,03	0,63 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,03
	<i>B. longum</i> 505 <sub>инд.</sub>	0,81 $\pm$ 0,03**	0,18 $\pm$ 0,03**	0,22 $\pm$ 0,03**	0,83 $\pm$ 0,04*	0,51 $\pm$ 0,01*	0,87 $\pm$ 0,04*
	<i>B. bifidum</i> 349 <sub>к</sub>	0,91 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,04**	0,33 $\pm$ 0,04**	0,61 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,04*	0,42 $\pm$ 0,02
	<i>B. bifidum</i> 349 <sub>инд.</sub>	0,89 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,1**	0,24 $\pm$ 0,01**	0,74 $\pm$ 0,1*	0,32 $\pm$ 0,02*	0,65 $\pm$ 0,06*
	<i>B. catenulatum</i> 504 <sub>к</sub>	0,94 $\pm$ 0,1	0,31 $\pm$ 0,05	0,6 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,05*	0,75 $\pm$ 0,03*	0,38 $\pm$ 0,01
	<i>B. catenulatum</i> 504 <sub>инд.</sub>	0,78 $\pm$ 0,02**	0,12 $\pm$ 0,06**	0,37 $\pm$ 0,01**	0,71 $\pm$ 0,03*	0,54 $\pm$ 0,07*	0,45 $\pm$ 0,07

Примечание. Отсутствие индекса — нейтрал., \* синергизм, \*\* антагонизм ( $p \leq 0,05$ ).

—  $0,25 \pm 0,09$  ед $\times$ ОП<sub>630</sub> и  $0,4 \pm 0,08$  мкг/мл $\times$ ОП<sub>450</sub> соответственно. Таковы были исходные биологические характеристики изучаемых культур.

На следующем этапе опытов было оценено влияния метаболитов интактной бифидофлоры на биологические характеристики изучаемых штаммов (еще один контроль), а в последующем было определено воздействие индуцированной бифидофлоры метаболитами ассоциантов на изучаемые характеристики *E. coli* М-17 и ЛЭГМ-18. Результаты представлены в табл.

Оценивая культуру *E. coli* М-17, следует отметить негативное отношение к ней (подавление изучаемых признаков) со стороны индуцированной нормофлоры эталонных культур — *B. bifidum* № 791<sub>инд</sub> и *B. adolescentis* МС-42<sub>инд</sub>. Интересно, что в целом сходно повели себя и наши клинические штаммы *B. longum* 505<sub>инд</sub>, *B. bifidum* 349<sub>инд</sub> и *B. catenulatum* 504<sub>инд</sub>, что позволяет отнести *E. coli* М-17 к «чужим» видам, хотя она использовалась в коммерческом препарате колибактерин в прошлом. Что касается результатов оценки культур с использованием интактных метаболитов бифидофлоры в отношении ассоциантов (промежуточный контроль), то изучение *E. coli* ЛЭГМ-18 (без острова патогенности) не вызывало нареканий, что эта культура — «своя» и не имеет признаков «чужеродности», что демонстрирует *B. bifidum* № 791<sub>к</sub>, не проявляя выраженного антагонизма. То же можно сказать и о другой эталонной культуре — *B. adolescentis* МС-42<sub>к</sub>, проявляющей четко выраженный синергизм в отношении *E. coli* ЛЭГМ-18. Не проявляли выраженного антагонизма в отношении кишечной палочки ЛЭГМ-18 и клинические культуры (даже на промежуточном контрольном этапе) *B. longum* 505<sub>к</sub>, не говоря уже о *B. longum* 505<sub>инд</sub>. То же следует сказать о *B. bifidum* 349<sub>к</sub> и *B. catenulatum* 504<sub>к</sub>.

Полученные материалы позволяют заключить, что использование метода межмикробного определения «свой-чужой» позволяет отнести *E. coli* М-17 к штаммам, имеющим признаки «чужеродности», тогда как *E. coli* ЛЭГМ-18 лишена их.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Концепция «своего» тесно связана с процессами самоидентификации и саморегуляции биологической системы любого уровня организации. В настоящее время актуальным направлением исследований межмикробных взаимодействий является определение индукции метаболитов микроорганизмов в их ассоциации. Наличие систем, осуществляющих телесенсинг состояния окружающей среды (наличие питательных веществ, хемоаттрактантов и др.) предполагает, что микроорганизмы координируют свое «поведение» в контексте сложившихся условий. Изменение химических или физических параметров индуцирует продукцию специфических молекул, что позволяет бактериям адаптироваться к внешним условиям [13].

Проведенные ранее эксперименты по взаимодействию микроорганизмов в ассоциации наводят на мысль, что в регуляции межмикробных взаимоотношений при функционировании микросимбиоза важную роль играют метаболиты, оказывающие регуляторное действие на биологические свойства микросимбионтов [3].

В данной работе были выявлены особенности регуляторного влияния в отношении модельных штаммов *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18 как у бифидобактерий из контрольных проб, так и у индуцированных метаболитами тест-культур, заключающиеся в преимущественном усилении исследуемых биологических характеристик у *E. coli* ЛЭГМ-18 и подавлении у *E. coli* М-17, которые усиливались или появлялись у индуцированных культур бифидобактерий. По-видимому, наблюдаемые различия при действии штаммов *E. coli*, различающихся по наличию генотоксин-кодирующего острова патогенности, могут быть связаны с много-



функциональной ролью низкомолекулярных пептид-поликетидных соединений, тесно связанных с системами сидерофоров [11]. Известно, что эти молекулы имеют широкое адаптивное значение для множества микроорганизмов в условиях конкуренции за ионы многовалентных металлов [4, 6], детекция которых, таким образом, может играть важную роль в межвидовой коммуникации бактерий в системе распознавания «свой-чужой». Полученные результаты свидетельствуют, что данные низкомолекулярные пептид-поликетидные соединения могут являться одними из кандидатов на роль маркеров «чужеродности» микросимбионтов, значимых при микробном распознавании, что требует дальнейших исследований в этом направлении.

Кроме того, учитывая тот факт, что в экспериментах *in vitro* нами были использованы эталонные штаммы бифидобактерий, являющиеся производственными культурами пробиотиков, полученные данные открывают перспективу использования микробного распознавания «свой-чужой» в качестве базового метода при отборе пробиотических препаратов и штаммов микроорганизмов для создания новых синбиотических композиций.

*Работа выполнена при грантовой поддержке фундаментальных исследований УрО РАН — проект № 15-5-4-7 «Роль бифидофлоры в формировании гомеостаза человека» и проект № 15-3-4-36 «Механизмы микробной регуляции ассоциативного симбиоза при инфекции»; фонда РГНФ — проект № 16-16-56004 «Клинико-микробиологическое обоснование новых подходов к профилактике развития патологии опорно-двигательного аппарата на основе изучения их факторов риска у детей Оренбуржья».*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М., Фиалкина С.В. Наличие генов генотоксина, ассоциированных с pks островом патогенности, у пробиотического штамма *Escherichia coli* M-17. Журн. микробиол. 2012, 5: 25-27.
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микробное распознавание «свой-чужой» в условиях кишечного микросимбиоза человека. Журн. микробиол. 2011, 6: 46-51.
3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2014.
4. Бухарин О.В., Сгибнев А.В. Влияние метаболитов коринебактерий на антагонистическую активность  $H_2O_2$ -продуцирующих лактобацилл. Журн. микробиол. 2012, 4: 48-51.
5. Марков А.В., Куликов А.М. Гипотеза «иммунологического тестирования» партнеров — системы распознавания «своих» и «чужих» в исторической перспективе. Известия РАН. Серия биологическая. 2006, 4: 389-403.
6. Сгибнев А.В. Механизмы выживания бактерий в условиях окислительного стресса и дефицита ионов железа. Журн. микробиол. 2006, 4: 20-22.
7. Gibbs K. A., Urbanowski M.L., Greenberg E.P. Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. Science. 2008, 321 (5886): 256-259.
8. Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A. et al. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. J. Clin. Microbiol. 2008, 46 (12): 3906-3911.
9. Jousime-Somers H., Summanen P. et al. Anaerobic Bacteriology Manual. Star Publishing; 2002.
10. Lypez-Larrea C. (ed.). Self and nonself. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. Adv. Experiment. Med. Biology. 2012, 738.
11. Martin P., Marcq I., Magistro G. et al. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli*. PLoS Pathog. 2013, 9 (7): e1003437. doi:10.1371/journal.ppat.1003437.
12. Nougayrède J.P., Homburg S., Taieb F. et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. Science. 2006, 313 (5788): 848-851.
13. Roux A., Payne S.M., Gilmore M.S. Microbial telesensing: probing the environment for friends, foes, and food. Cell Host Microbe. 2009, 6 (2): 115-124.

14. Shank A. E., Kolter R. New developments in microbial interspecies signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009, 12 ( 2): 205-214.
15. Wenren L.M., Sullivan N.L., Cardarelli L. et al. Two independent pathways for self-recognition in proteus mirabilis are linked by type VI-dependent export. *mBio.* 2013, 4 (4): e00374-13. doi:10.1128/mBio.00374-13.

Поступила 12.03.16

Контактная информация: Бухарин Олег Валерьевич, д.м.н., проф.,  
460000, Оренбург, ул. Пионерская, 11, р.т. (3532)77-54-17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

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

## ТОРМОЖЕНИЕ РОСТА БАКТЕРИЙ В КУЛЬТУРАХ STAPHYLOCOCCUS AUREUS И PSEUDOMONAS AERUGINOSA КАТИОНАМИ МЕДИ И ЦИНКА, ПРИМЕНЕННЫМИ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

*Цель.* Оценка антибактериального действия связанных белками  $\gamma$ -глобулиновой фракции и свободных катионов меди и цинка, примененных в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa* в физиологических (микромольных) концентрациях. *Материалы и методы.* Суточную культуру бактерий *S.aureus* или *P.aeruginosa* переводили с агара в физиологический раствор и готовили суспензию клеток, содержащую ориентировочно  $10^3 - 10^4$  КОЕ/мл. В суспензию вносили образцы металлокомплексов  $\gamma$ -глобулина с катионами меди или цинка (белка 30 или 45 мкг/мл), контрольные  $\gamma$ -глобулины (30 или 45 мкг/мл) и солевые растворы меди или цинка, содержание катионов в которых соответствовало количеству металла, связавшегося с белком на этапе получения металлокомплексов (75 нг/мл). Суспензии инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 6 час, через каждые 2 час производя отбор проб и подсчет КОЕ в соответствии с принятым микрометодом. По окончании инкубации (6 ч наблюдения) суспензии переводили в питательный бульон, термостатировали в течение суток при  $37^\circ\text{C}$ , после чего оценивали прозрачность питательного бульона в сравнении с контрольным (стерильным). *Результаты.* Начиная с 3 часа наблюдения в культуре *S.aureus* обнаруживается токсическое действие катионов цинка и меди. Жизнеспособные бактерии отсутствуют в культуре с цинком спустя 6 час, с медью — спустя 4 час инкубации. Связавший катионы меди  $\gamma$ -глобулин на сроках 4 и 6 час инкубации на 11,9 — 33,0% ( $p < 0,05 - 0,1$ ) снижает количество жизнеспособных клеток в сравнении с контрольным белком. В культуре *P.aeruginosa* токсическое действие катионов меди проявляется сразу же после инициации культуры и приводит к реализации полного бактерицидного эффекта спустя 4 час наблюдения. Катионы цинка подобными свойствами не обладают. Связавший катионы меди  $\gamma$ -глобулин на сроках 4 и 6 час инкубации на 19,3 — 25,8% ( $p < 0,001$ ) снижает количество жизнеспособных клеток в сравнении с контрольным белком. *Заключение.* Поддерживаемые в физиологическом растворе бактерии *S.aureus* подвержены токсическому действию физиологических (микромольных) концентраций свободных катионов меди и цинка, а также катионов меди, связанных человеческим сывороточным  $\gamma$ -глобулином. В тех же условиях бактерии *P.aeruginosa* испытывают токсическое воздействие катионов меди (но не цинка) как свободных, так и связанных человеческим сывороточным  $\gamma$ -глобулином. При этом в присутствии свободных катионов меди в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa* реализуется полный бактерицидный эффект.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 9—18

Ключевые слова: антибактериальное действие, медь, цинк, *S.aureus*, *P.aeruginosa*

## INHIBITION OF GROWTH OF BACTERIA IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CULTURES BY COPPER AND ZINC CATIONS, APPLIED AT PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS

Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

**Aim.** Evaluation of antibacterial effect of  $\gamma$ -globulin fraction bound and free copper and zinc cations, applied in cultures of *S. aureus* and *P. aeruginosa* at physiological (micromolar) concentrations. **Materials and methods.** Day cultures of *S. aureus* or *P. aeruginosa* were transferred from agar to physiological solution, and cell suspension was prepared, containing approximately  $10^3 - 10^4$  CFU/ml. Samples of metal-complexes of  $\gamma$ -globulin with copper and zinc cations (30 and 45  $\mu\text{g/ml}$ ), control  $\gamma$ -globulins (30 and 45  $\mu\text{g/ml}$ ) and salt solutions of copper and zinc, cation content in those corresponded to the quantity of the metal, that had bound with the protein at the stage of metal-complex obtaining (75 ng/ml), were introduced into the suspension. The suspensions were incubated at 37°C for 6 hours, sampling and CFU count according to the accepted micromethod was carried out every 2 hours. By the end of incubation (6 hours of observation) the suspensions were transferred into nutrient broth, thermostated for 1 day at 37°C, transparency of the nutrient broth compared with control (sterile) was evaluated afterwards. **Results.** Toxic effect of copper and zinc cations is detected starting from the 3rd hour of observation in *S. aureus* culture. Viable bacteria are absent in the culture with zinc after 6 hours, with copper — after 4 hours of incubation.  $\gamma$ -globulin, that had bound copper cations, reduces the quantity of viable cells compared with control protein by 11.9 — 33.0% ( $p < 0.05 - 0.1$ ) at 4 and 6 hours of incubation. In *P. aeruginosa* culture, toxic effect of copper cations manifests immediately after initiation of the culture and results in realization of complete bactericidal effect after 4 hours of observation. Zinc cations do not have such properties.  $\gamma$ -globulin, that had bound copper cations, reduces the quantity of viable cells compared with control protein at 4 and 6 hours of incubation by 19.3 — 25.8% ( $p < 0.001$ ). **Conclusion.** *S. aureus* bacteria, supported in physiological solution are subject to toxic effect of physiological (micromolar) concentrations of free copper and zinc cations, and also copper cations, bound by human serum  $\gamma$ -globulin. *P. aeruginosa* bacteria under the same conditions experience toxic effect of copper cations (but not zinc), free as well as bound by human serum  $\gamma$ -globulin. Whereas a full bactericidal effect is realized in *S. aureus* and *P. aeruginosa* cultures in the presence of free cations of copper.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 9—18.

Key words: antibacterial effect, copper, zinc, *S. aureus*, *P. aeruginosa*

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из факторов вирулентности патогенных бактерий выступает их способность к детоксикации по тяжелым металлам, в частности, меди и цинку [8, 16, 17], которые, в свою очередь, играют существенную роль в защите организма хозяина от бактериальных патогенов [8, 23, 24]. В реализации токсического действия катионы меди и цинка могут замещать атомы других металлов в каталитических центрах бактериальных белков [8], ингибировать включение бактериальной клеткой необходимых для обеспечения ее жизнедеятельности микроэлементов [19], опосредовать прямое бактериостатическое или бактерицидное действие [5, 24].

Работами последнего времени, включая результаты наших недавних исследований, обоснованы представления о ранее не известных механизмах преодоления толерантности бактерий к тяжелым металлам [5, 9, 13, 18, 21]. Эти механизмы связаны со стабилизацией цинком исходно недоступных металлу сайтов присоединения меди, в результате чего структуры бактериальной стенки могут подвергаться дестабилизирующему воздействию редокс-активных катионов [5, 18, 21]. Эти механизмы связаны также с вызываемым цинком агрегированием поперх-

ностных бактериальных белков, следствием чего оказывается снижение их функциональной пластичности, активности трансмембранного обмена, способности бактерий к формированию биопленок и обретению всего уровня и степени защиты, которые формируются в условиях бактериального сообщества [5, 9, 13].

Понятно, что в контексте торможения образования биопленки речь может идти только об инициальных стадиях инфекционного процесса — когда биопленка еще не сформировала своего функционального потенциала, не оформилась морфологически и метаболически. По существу, это условия нормального тканевого обмена, не индуцированных межклеточных взаимодействий. Это условия, когда содержание связанного белками и свободного металла в тканях и циркуляции соответствует биохимической норме, а концентрации катионов находятся в пределах физиологических.

Физиологические концентрации меди и цинка в плазме крови человека определяются на уровне 10 — 20 мкМ [14, 20]. При этом медь находится в циркуляции и в тканях в практически полностью связанном белками (преимущественно, церулоплазмином) состоянии, тогда как цинк биологически доступен и в свободной (ионной) форме, содержание которой оценивают в пределах от 0,2 до 1,0 нМ [7, 14]. Металл может дополнительно поступать в кровоток или в периклеточный матрикс тканей за счет активной дегрануляции тромбоцитов и нейтрофилов, когда его локальная концентрация возрастает в 30 — 60 раз [7]. Любое тканевое повреждение или воспаление вызывает высвобождение из тромбоцитарных и нейтрофильных депо значительного количества биологически доступного (лабильного) цинка [7, 20].

В наших исследованиях культуры бактерий *S.aureus* и *P.aeruginosa* проявляли чувствительность к бактериостатическому действию катионов цинка и бактерицидному — меди, примененных в миллимолярных концентрациях [5]; а рост *S.aureus* обнаруживал тенденцию к торможению в присутствии 15 нМ меди и 40 нМ цинка [4], т.е. концентраций катионов, почти на три порядка меньших, чем физиологические. При этом, в отличие от меди, активной в свободном (ионном) состоянии [4], эффект катионов цинка в большей степени характеризовал действие металла, связанного белками  $\gamma$ -глобулиновой фракции [4].

Целью работы явилась оценка антибактериального действия связанных белками  $\gamma$ -глобулиновой фракции и свободных катионов меди и цинка, примененных в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa* в физиологических (микромольных) концентрациях.

Реализация эффекта столь низких концентраций катионов металлов в питательных средах, принятых для культивирования бактерий, сопряжена с известными трудностями, определяемыми возможностью хелатирования катионов присутствующими в объеме белками, гликопротеинами, аминокислотами, сахарами, активно и неспецифически связывающими металл. Поэтому в работе применена технология перевода бактерий из питательной среды в физиологический раствор и постановки опытов в физиологическом растворе. Это предполагало проведение на препаративном этапе исследования сравнительной оценки устойчивости выделенных клинических изолятов к термостатированию в минимальной по основным питательным компонентам среде.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные культуры бактерий *S.aureus* и *P.aeruginosa* получены принятым методом посева патологического биоматериала человека на элективные и селективные питательные среды [1]. В работе использовали один клинический изолят *S.aureus* и один *P.aeruginosa*, отобранные в ходе предварительных исследований из трех изолятов *S.aureus* и трех изолятов *P.aeruginosa* в качестве наиболее устойчивых к термостатированию в течение 24 час при 37°C в физиологическом растворе — снижение динамики роста бактерий не более чем на 1 lg (КОЕ/мл).

Для построения кривых роста (выживания) бактерий из суточной культуры



*S.aureus* или *P.aeruginosa*, выращенной на чашках Петри с питательным агаром Nutrient Agar (HiMedia Lab.), с использованием стандарта мутности и серии последовательных десятикратных разведений в физиологическом растворе (рН 5,3 — 5,6) готовили суспензию, содержащую ориентировочно  $10^3$  —  $10^4$  КОЕ/мл. В полученную суспензию вносили образцы металлокомплексов  $\gamma$ -глобулина с медью или цинком и контрольные белки (конечная концентрация 30 или 45 мкг/мл), а также солевые растворы меди (водный сульфат) (Mec) или цинка (хлорид), содержание металлов в которых соответствовало их количеству, связавшемуся с белком на стадии получения экспериментальных образцов (75 нг/мл в 0,15 M NaCl), или контрольный 0,15 M NaCl.

Суспензии бактериальных клеток в объеме 1,5 мл инкубировали при 37°C в течение 6 час. Отбор проб и подсчет числа КОЕ в культуре проводили на 0, 2, 4 и 6 час инкубации в соответствии с принятым микрометодом.

Для установления вклада бактерицидного компонента в действие свободных и связанных белком катионов металлов по окончании срока наблюдения (6 час) в исследуемые пробы объемом 0,5 мл вносили по 4,5 мл питательного бульона Nutrient Broth (HiMedia Lab.). Образцы термостатировали в течение суток при 37°C, после чего оценивали прозрачность питательного бульона в сравнении с контрольным (стерильным).

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

Для получения белковых металлокомплексов использовали препарат человеческого сывороточного  $\gamma$ -глобулина (ICN) в 0,15 M растворе NaCl (рН 6,92 — 6,93) с концентрацией белка по навеске 100 мкг/мл. Освобожденные от крупных ассоциатов мембранной фильтрацией (0,45 мкм, Millipore) образцы  $\gamma$ -глобулина инкубировали в течение 1 час при 37°C с водным сульфатом меди (Mec) или хлоридом цинка; концентрация металла — 0,5 мкг/мл. В качестве контроля использовали образцы  $\gamma$ -глобулина, инкубированные в тех же условиях, но без солей указанных металлов.

По истечении срока инкубации опытные и контрольные образцы в объеме 10 мл подвергали двукратной молекулярной ультрафильтрации в ячейках Ultracel-30k (Millipore) в режиме 1700 g 5 мин с умеренным охлаждением. По окончании фракционирования супернатанты поднимали из ячеек, восстанавливали в 0,15 M растворе NaCl и (как и на всех этапах исследования) анализировали спектрофотометрически в ультрафиолете, в диапазоне длин волн от 190 до 320 нм с шагом 0,1 нм, в автоматическом режиме с использованием дифференцирующего спектрофотометра UV-1800 Shimadzu.

Содержание свободных (не связавшихся с белком) металлов в фильтрате оценивали с использованием фотометрии реакций комплексообразования: меди — с диэтилдитиокарбаматом натрия (рН 9,0 — 9,2), длина волны 440 нм; цинка — с о-фенантролином (нейтральный рН), длина волны 226 нм (UV-1800 Shimadzu). Далее проводили расчет концентрации металлов, связавшихся с белком.

Расчет показателей изменения оптической плотности и молярных отношений в растворе осуществляли на основании концентрации  $\gamma$ -глобулина, установленной спектрофотометрически при длине волны 280 нм (коэффициент экстинкции 0,7). Полученные и использованные в работе образцы  $\gamma$ -глобулина содержали по шесть катионов меди или цинка на молекулу белка.

Кислотность образцов контролировали с помощью базового электронного рН-метра Sartorius PB-11, укомплектованного электродом PY-P11.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно на рис. 1 (А, Б), в физиологическом растворе, дополненном 30 или 45 мкг/мл человеческого сывороточного  $\gamma$ -глобулина (линия 1), роста бактерий в культуре *S.aureus* не наблюдается, количество жизнеспособных клеток в культуре проявляет тенденцию к некоторому монотонному снижению, составляющему на

крайнем сроке наблюдения (6 час) в ед. логарифма КОЕ/мл 14,8 — 24,8% от показателя на старте исследования.

Начиная с третьего часа наблюдения в культуре *S.aureus* обнаруживается токсическое действие катионов цинка (А, линия 3) и меди (Б, линия 3), примененных в дозе 75 нг/мл. В присутствии катионов цинка жизнеспособные бактерии отсутствуют в культуре спустя 6 час наблюдения (рис. 1, А), в присутствии катионов меди жизнеспособных бактерий не определяется на сроке 4 час после инициации культуры (рис. 1, Б).

Белок, связавший 75 нг/мл катионов цинка (А, линия 2), достоверно не отличается в культуре бактерий *S.aureus* от контрольного  $\gamma$ -глобулина. Белок, связавший 75 нг/мл катионов меди (Б, линия 2), на сроках 4 и 6 час после инициации культуры достоверно снижает количество жизнеспособных клеток в сравнении с контрольным  $\gamma$ -глобулином. Выраженная в ед. логарифма КОЕ/мл разница с контрольным белком составляет 11,9% ( $p < 0,05$ ) и 33% ( $p < 0,1$ ) на сроках 4 и 6 час, соответственно.

Очевидно, что поддерживаемые в физиологическом растворе бактерии *S.aureus* подвержены токсическому действию физиологических концентраций катионов меди и цинка, а также катионов меди, связанных человеческим сывороточным  $\gamma$ -глобулином. При этом в присутствии свободных катионов меди и цинка в культуре достигается полный бактерицидный эффект, который в условиях применения катионов меди реализуется на 2 час раньше, чем в присутствии катионов цинка (рис. 1, А и Б).

Как видно на рис. 2 (А, Б), в физиологическом растворе, дополненном 30 или 45 мкг/мл человеческого сывороточного  $\gamma$ -глобулина (линия 1), в культуре *P.aeruginosa* отмечается некоторый рост числа жизнеспособных клеток (А) или их количество практически не меняется на всем сроке наблюдения — до 6 час после инициации культуры (Б).

Сразу же после внесения 75 нг/мл катионов меди в культуре *P.aeruginosa* проявляется их токсическое действие на клетки бактерий, приводящее на сроке 4 час наблюдения к реализации полного бактерицидного эффекта (Б, линия 3). Катионы

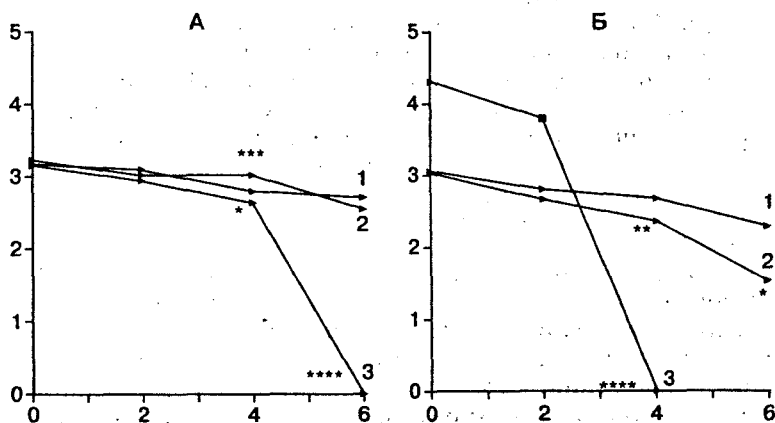


Рис. 1. Торможение роста культуры *S.aureus* в присутствии металлокомплексов человеческого сывороточного  $\gamma$ -глобулина, образованных с катионами цинка (А) и меди (Б) в сравнении с эффектом контрольных белков и катионов металлов, примененных изолированно,  $n=6$ .

\* $p < 0,1$  и \*\* $p < 0,05$  по сравнению с контрольным белком (1), \*\*\* $p < 0,02$  по сравнению с катионами цинка (3), \*\*\*\* $p < 0,001$  по сравнению с контрольным белком (1) и модифицированным катионами металлов  $\gamma$ -глобулином (2). Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время инкубации (час), по оси ординат —  $\lg(\text{КОЕ}/\text{мл})$ . 1 (А и Б) — контрольные  $\gamma$ -глобулины, 2 (А) — модифицированный цинком  $\gamma$ -глобулин, 2 (Б) — модифицированный медью  $\gamma$ -глобулин, 3 (А) — катионы цинка, 3 (Б) — катионы меди; точка с ординатой 0 приведена на сроке, когда в культуре отсутствуют жизнеспособные бактерии (подтверждено оценкой стерильности питательного бульона).

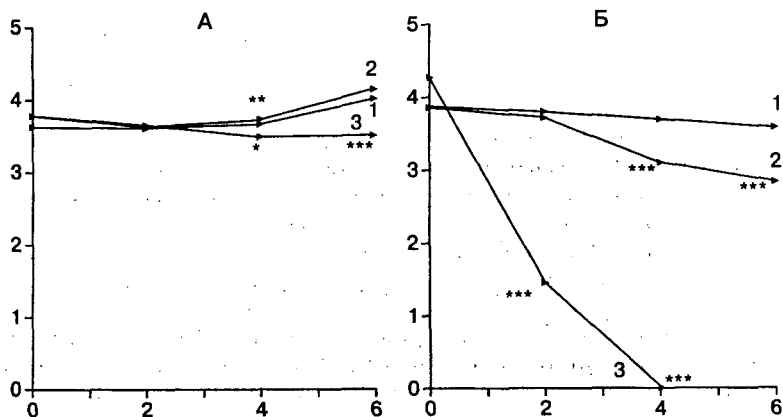


Рис. 2. Торможение роста культуры *P.aeruginosa* в присутствии металлокомплексов человеческого сывороточного  $\gamma$ -глобулина, образованных с катионами цинка (А) и меди (Б) в сравнении с эффектом контрольных белков и катионов металлов, примененных изолированно,  $n=6$  или  $n=9$ .

\* $p < 0,02$  по сравнению с контрольным белком (1), \*\* $p < 0,001$  по сравнению с катионами цинка (3), \*\*\* $p < 0,001$  по сравнению с контрольным белком (1) и модифицированным катионами металлов  $\gamma$ -глобулином (2) — А и Б или по сравнению с контрольным белком (1) — Б.

цинка, примененные в дозе 75 нг/мл, подобным действием в отношении клеток *P.aeruginosa* не обладают (А, линия 3). Они, скорее, реализуют бактериостатическое действие, поскольку в сравнении с чистым физиологическим раствором снижают число жизнеспособных клеток в культуре *P.aeruginosa* на 9,4% ( $p < 0,001$ ).

Белок, связавший 75 нг/мл катионов цинка (А, линия 2), достоверно не отличается в культуре бактерий *P.aeruginosa* от контрольного  $\gamma$ -глобулина. Белок, связавший 75 нг/мл катионов меди (Б, линия 2), на сроках 4 и 6 час после инициации культуры достоверно снижает количество жизнеспособных бактерий в сравнении с контрольным  $\gamma$ -глобулином. Выраженная в ед. логарифма КОЕ/мл разница с контрольным белком составляет 19,3% ( $p < 0,001$ ) и 25,8% ( $p < 0,001$ ) на сроках 4 и 6 час наблюдения, соответственно.

Следовательно, поддерживаемые в физиологическом растворе бактерии *P.aeruginosa* подвержены токсическому действию физиологических концентраций катионов меди, а также катионов меди, связанных человеческим сывороточным  $\gamma$ -глобулином. В отличие от свободных катионов цинка и катионов меди, связанных белками  $\gamma$ -глобулиновой фракции, свободные катионы меди реализуют в отношении *P.aeruginosa* очевидное бактерицидное действие (рис. 2 А, Б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования получены в культурах бактерий, поддерживавшихся в ходе постановки экспериментов в физиологическом растворе, дополненном физиологическими (микромольными) концентрациями катионов меди и цинка, примененных в виде водного сульфата и хлорида, соответственно, человеческим сывороточным  $\gamma$ -глобулином и его металлокомплексами, образованными белком, связавшим физиологические (микромольные) концентрации катионов меди или цинка.

Как и в наших предшествующих исследованиях, выполненных на модели «капли на газоне» [5], катионы цинка реализуют выраженное токсическое действие на клетки *S.aureus* и не обладают подобными свойствами в отношении бактерий *P.aeruginosa*. В связанном белками  $\gamma$ -глобулиновой фракции состоянии катионов цинка эффект их воздействия в культуре *S.aureus* утрачивается, а для клеток *P.aeruginosa* металлокомплекс  $\gamma$ -глобулина с цинком, скорее, выступает питательным субстратом, необходимым для жизнеобеспечения бактерий и соответствующим контрольному  $\gamma$ -глобулину.

Диапазон активности катионов меди значительно шире, чем цинка. Как в отношении клеток *S.aureus*, так и в культуре *P.aeruginosa*, они обеспечивают достижение полного бактерицидного эффекта, который в обеих культурах регистрируется на сроке 4 час от старта исследования. При этом показательно, что аналогично экспериментальной модели «капли на газоне» [5] чувствительность *P.aeruginosa* к воздействию катионов меди оказывается заметно выше, чем клеток *S.aureus*, в отношении которых спустя 2 час от старта исследования токсичность металла не определяется. Клетки *P.aeruginosa* в присутствии катионов меди теряют в течение первых 2 час наблюдения почти 75% численности популяции, выраженной в ед. логарифма КОЕ/мл ( $p < 0,001$  по сравнению с действием катионов цинка).

В отличие от цинка, будучи хелатированными белками  $\gamma$ -глобулиновой фракции, катионы меди сохраняют способность ингибировать размножение клеток в культурах *S.aureus* и *P.aeruginosa*, достоверно снижать в динамике наблюдения число жизнеспособных бактерий.

В сравнении с широким спектром токсической активности катионов меди, реализуемой в отношении как грамотрицательных (*P.aeruginosa*), так и грамположительных (*S.aureus*) бактерий, действие катионов цинка в значительно большей степени специфично. Известно, что металл определяет функциональную активность многих поверхностных белков и факторов вирулентности патогенных стрептококков [23]. Установлено также, что в концентрациях, не ингибирующих рост *Escherichia coli*, цинк снижает экспрессию факторов вирулентности бактерий и адгезию клеток в культуре [11].

Сказанное позволяет рассматривать эффекты цинка в отношении этих бактерий в качестве патоген-специфических [11, 23] и предполагать, следовательно, реализацию патогенами определенных сигнальных путей, замкнутых на участке, связанных с воздействием или находящихся под контролем катионов цинка, распределенных в межклеточном пространстве.

Действие металла на патогенные стафилококки тоже можно трактовать как патоген-специфическое. Кальпротектин нейтрофилов, хелатируя пищевой цинк, вызывает перепрограммирование бактериального транскриптома и ингибирует рост *S.aureus* [10]. Наоборот, в обогащенных металлом абсцессах отмечают активную пролиферацию бактерий [10].

Белки  $\gamma$ -глобулиновой фракции, хелатирующие катионы металлов из периглобулярного пространства, в силу своих физико-химических и биофизических характеристик выступают переносчиками цинка и меди, пусть даже в локальном окружении [3]. По отношению к бактериям *S.aureus*, экспрессирующим в качестве одного из факторов патогенности поверхностный белок А, служащий Fc рецептором (FcR) клеток [2],  $\gamma$ -глобулины и их металлокомплексы представляются естественными лигандами, сбрасывание которых с рецептора вызывает активацию клетки бактерии [2].

В условиях метаболического стресса, которому подвергаются бактерии, переведенные для поддержания в физиологический раствор, белки  $\gamma$ -глобулиновой фракции и их металлокомплексы, компенсируя недостаточность питательного субстрата, посредством связывания FcR могут поступать в периплазму и цитозоль *S.aureus* и переносить присоединенный ими металл (цинк или медь) внутрь бактериальной клетки.

Но поскольку в биологических системах большая часть цинка (до 70% в плазме крови) непрочно связана с белками (включая  $\gamma$ -глобулины), нет необходимости транспортировать металл в клетку бактерии в связанном белком состоянии [3, 6]. Под действием активируемых контактом клетки с лигандом FcR протеолитических ферментов поверхности цинк может высвобождаться белком в периклеточное (пристеночное) пространство и поступать в клетку напрямую, независимо от трансмембранного перемещения доставившего металл к клетке белка [3, 6]. И хотя у некоторых бактерий, например *E.coli*, репрессия импортера цинка *ZnuC*



отмечается при более низких концентрациях металла, чем индукция экспортера ZntA [26], условия метаболического стресса и белкового голодания могут существенно изменять функционирование систем жизнеобеспечения бактерий и способствовать реализации вектора транспорта металла внутрь клетки даже при физиологических, значительно превышающих пороговые по активации импортеров, концентрациях цинка в пристеночном пространстве бактерии [26].

Сказанное в той же степени относится к катионам меди, хотя составляющая  $10^{-21}$  М аффинность наиболее чувствительного к меди сенсора бактерий *E.coli* CueR на несколько порядков превышает таковую цинковых сенсорных белков Zng и ZntR, соответствующую  $10^{-15}$  М [25]. Достаточно сравнить результаты данной работы по меди и цинку, чтобы вынести заключение о высоком сходстве динамики выживания бактерий *S.aureus* в присутствии свободных катионов металлов и накоплении меди, как и цинка, внутри бактериальной клетки. Понятно, что катионы меди и цинка слишком различаются реализуемой редокс-активностью и участием в окислительно-восстановительных процессах, чтобы вызвать форсированную и пролонгированную всего до 2 час гибель бактерий исключительно за счет внешнего воздействия на мембрану.

Показательны данные, полученные в нашей работе в культуре бактерий *P.aeruginosa*, для которых не описано поверхностных структур, соответствующих белку A *S.aureus* и способных связывать белки  $\gamma$ -глобулиновой фракции посредством захвата их Fc региона [2]. Тем не менее, динамика выживания бактерий *S.aureus* и *P.aeruginosa* совпадает по времени реализации полного бактерицидного эффекта свободных катионов меди (4 час от старта исследования) и демонстрирует сходные тенденции в условиях применения связавшего катионы меди  $\gamma$ -глобулина.

Следовательно, в условиях метаболического стресса, сопровождающегося белковым голоданием, подверженные воздействию неблагоприятных факторов бактерии перепрограммируют системы жизнеобеспечения и включают дополнительные механизмы извлечения питательных веществ из внешней среды. Возникает нагрузка клетки металлом, которая не компенсируется активным эффлюксом, поскольку системы детоксикации в названных неблагоприятных условиях тоже будут испытывать недостаток субстратов для обеспечения эффективной работы.

Рассматривая полученные данные в контексте взаимодействия патогена с клетками организма хозяина в ходе развития инфекционного процесса можно полагать, что в реальных условиях инфицирования весьма вероятны и достаточно широко распространены ситуации, при которых бактерии, инфицирующие биологические жидкости и ткани макроорганизма, испытывают воздействие неблагоприятных для них местных или системных изменений гомеостаза в локальном окружении.

Известно, что первичный острофазовый ответ на инфекцию предполагает системное перераспределение цинка (а возможно, и меди) в организме, приводящее к резкому снижению содержания металла в плазме и накоплению его в тканях (прежде всего, печени), где цинк, как и медь, достаточно прочно связывается металлотионеинами [6]. В результате, количество доступного для усвоения бактериями металла существенно снижается, в бактериальных клетках активируется работа транспортеров (у сальмонелл — ZnuABC), позволяющих извлекать цинк из внешней среды, лимитированной по доступности металла [6].

С другой стороны, как отмечено выше, любое тканевое повреждение или воспаление сопровождается активной дегрануляцией тромбоцитов и нейтрофилов, приводящей к высвобождению из внутриклеточных депо значительного количества лабильного (свободного) цинка, в результате чего локальная концентрация металла может возрасти в 30 — 60 раз [7, 20]. И хотя эффективность систем детоксикации бактерий по тяжелым металлам необычайно высока [8, 16, 17], осла-

бленные клетки патогена будут испытывать серьезные проблемы с эффлюксом цинка в условиях многократного повышения его содержания в пристеночном окружении [7, 20].

Не исключено при этом, что активный выброс цинка из клетки может компенсироваться, особенно на фоне формирующейся дисрегуляции транспортных процессов, поступлением в клетку определенного количества меди, известной функциональным антагонизмом цинку и способной даже в физиологических концентрациях реализовать бактерицидное действие, в том числе, на клетки *P. aeruginosa*, считающиеся высокорезистентными к ней [22].

Свидетельства тому, что ослабленные, поддерживаемые в условиях, неблагоприятных для обеспечения жизнедеятельности, бактерии не справляются с активным эффлюксом металла и утрачивают толерантность к его токсическому воздействию, очевидно, представляют результаты опытов на сухих медных поверхностях, в ходе которых вследствие так называемого контактного киллинга численность бактериальных популяций снижалась на 7 — 8 ед. логарифма КОЕ/мл за 1 час, до полного отсутствия нанесенных аэрозолем жизнеспособных бактерий после длительной инкубации [15].

В определенном алгоритме сравнения воздействие сухой меди на клетки бактерий, прежде всего, *S. aureus*, оказывается более эффективным, чем меди, поступающей из раствора [15]. В клетках бактерий, инкубирующихся на сухих медных поверхностях, накапливается больше катионов меди, чем в клетках суспензионной культуры, извлекающих из питательной среды растворенную медь [12]. Уже спустя несколько минут инкубации отмечают повреждение мембраны с последующей утратой целостности бактериальной клетки [12].

Понятно, что системы детоксикации бактерий по тяжелым металлам замкнуты на сохранность и известную степень гидратации поверхностных структур. Дегидратация поверхности клетки резко ограничивает возможности бактерии выводить избыток тяжелых катионов и, наоборот, повышает эффективность реализации механизмов их токсического воздействия [12, 15].

С позиций метаболического стресса, ослабляющего системы детоксикации бактерий по тяжелым металлам и формирующего условия проявления токсического воздействия физиологических концентраций катионов меди и цинка на грамположительные (*S. aureus*) и грамотрицательные (*P. aeruginosa*) бактерии, обоснованно полагать, что в развитии любого инфекционного процесса отдельные этапы взаимодействия патогена с организмом хозяина могут контролироваться физиологическими концентрациями катионов меди и цинка, способными, следовательно, вносить определенный вклад в реализацию механизмов антибактериальной защиты.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Медицинская микробиология. В.И.Покровский, О.К.Поздеев (ред.). М., ГЭОТАР Медицина, 1998.
2. Тоголян А.А., Бурова Л.А. Fc-рецепторные белки *Streptococcus pyogenes* и патогенез постинфекционных осложнений. Журн. микробиол. 2014, 3: 78-90.
3. Чекнёв С.Б., Бабаева Е.Е., Голуб А.Е., Денисова Е.А., Воробьева У.А. Эффекты меди и цинка при связывании с человеческим сывороточным  $\gamma$ -глобулином. Мед. иммунология. 2006, 8 (5-6): 615-622.
4. Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Писковская Л.С., Востров А.В. Эффекты катионов меди и цинка, связанных белками  $\gamma$ -глобулиновой фракции, в культуре *Staphylococcus aureus*. Журн. микробиол. 2014, 3: 4-9.
5. Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Апрецова М.А., Писковская Л.С., Востров А.В. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии катионов меди и цинка. Журн. микробиол. 2015, 2: 9-17.
6. Ammendola S., Pasquali P., Pistoia C. et al. High-affinity  $Zn^{2+}$  uptake system *ZnuABC* is

- required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect. Immunity*. 2007, 75 (12): 5867-5876.
7. Borza D.-B., Morgan W.T. Histidine-proline-rich glycoprotein as a plasma pH sensor. Modulation of its interaction with glycosaminoglycans by pH and metals. *J. Biol. Chemistry*. 1998, 273 (10): 5493-5499.
  8. Botella H., Stadthagen G., Lugo-Villarino G. et al. Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends Microbiol.* 2012, 20(3):106-112.
  9. Conrady D.G., Brescia C.C., Horii K. et al. A zinc-dependent adhesion molecule is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008, 105 (49): 19456-19461.
  10. Corbin B.D., Seeley E.H., Raah A. et al. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*. 2008, 319 (15): 962-965.
  11. Crane J.K., Naeher T.M., Shulgina I. et al. Effect of zinc in enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immunity*. 2007, 75 (12): 5974-5984.
  12. Espirito Santo C., Lam E.W., Elowsky C.G. et al. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl. Environm. Microbiol.* 2011, 77 (3): 794-802.
  13. Golub E.E., Cheruka J., Boosz B. et al. A comparison of bacterial aggregation induced by saliva, lysozyme, and zinc. *Infect. Immunity*. 1985, 48 (1): 204-210.
  14. Gorgani N.N., Parish C.R., Altin J.G. Differential binding of histidine-rich glycoprotein (HRG) to human IgG subclasses and IgG molecules containing  $\kappa$  and  $\lambda$  light chains. *J. Biol. Chemistry*. 1999, 274 (42): 29633-29640.
  15. Grass G., Rensing C., Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl. Environm. Microbiol.* 2011, 77 (5): 1541-1547.
  16. Hodgkinson V., Petris M.J. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J. Biol. Chemistry*. 2012, 287 (17): 13549-13555.
  17. Hood M.I., Skaar E.P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature Rev. Microbiol.* 2012, 10: 525-537.
  18. Lu Y. Metal ions as matchmakers for proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010, 107 (5): 1811-1812.
  19. Remy L., Carrière M., Derré-Bobillot M. et al. The *Staphylococcus aureus* Opp1 ABC transporter imports nickel and cobalt in zinc-depleted conditions and contributes to virulence. *Molec. Microbiol.* 2013, 87 (4): 730-743.
  20. Rink L., Kirchner H. Zinc-altered immune function and cytokine production. *J. Nutrition*. 2000, 130 (5, Suppl.): 1407-1411.
  21. Salgado E.N., Ambroggio X.I., Brodin J.D. et al. Metal templated design of protein interfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010, 107 (5): 1827-1832.
  22. Samanovic M.I., Ding C., Thiele D.J., Darwin K.H. Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. *Cell Host Microbe*. 2012, 11: 106-115.
  23. Shafeeq S., Kuipers O.P., Kloosterman T.G. The role of zinc in the interplay between pathogenic streptococci and their hosts. *Molec. Microbiol.* 2013, 88 (6): 1047-1057.
  24. Stafford S.L., Bokil N.J., Achard M.E.S. et al. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Bioscience Reports*. 2013, 33 (4): 541-554.
  25. Waldron K.J., Robinson N.J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nature Rev. Microbiol.* 2009, 7: 25-35.
  26. Yamamoto K., Ishihama A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external zinc. *J. Bacteriol.* 2005, 187 (18): 6333-6340.

*Поступила 05.11.15*

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

*Н.П.Буравцева<sup>1</sup>, С.Н.Антюганов<sup>2</sup>, О.В.Семенко<sup>1</sup>, А.Г.Рязанова<sup>1</sup>,  
Е.И.Еременко<sup>1</sup>, А.Н.Куличенко<sup>1</sup>, В.М.Мезенцев<sup>1</sup>*

## **ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЙОНИРОВАНИЕ ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРО-КАВКАЗСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА ПО СТЕПЕНИ НЕБЛАГОПОЛУЧИЯ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОГРАММЫ ARC GIS10**

<sup>1</sup>Ставропольский противочумный институт, <sup>2</sup>Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора по Ставропольскому краю, Ставрополь

*Цель.* Проведение эпизоотолого-эпидемиологического районирования территории Северо-Кавказского федерального округа (СКФО) по степени неблагополучия по сибирской язве с использованием программы Arc GIS10. *Материалы и методы.* При районировании территорий субъектов СКФО (Ставропольский край, Карачаево-Черкесская, Кабардино-Балкарская, Чеченская республики, республики Северная Осетия-Алания, Ингушетия, Дагестан) по степени неблагополучия по сибирской язве были использованы два показателя: интегрированный показатель риска инфицирования и индекс эпизоотичности. Показатели вводились в программу Arc GIS10. Использованы материалы по заболеваемости людей и животных сибирской язвой за последние 55 лет (с 1960 по 2014 гг). *Результаты.* Районы территорий субъектов СКФО распределялись по степени неблагополучия на 4 группы: 1 группа — районы с низкой степенью неблагополучия, 2 группа — районы со средней степенью неблагополучия, 3 группа — районы с высокой степенью неблагополучия, 4 группа — районы с очень высокой степенью неблагополучия. *Заключение.* Учитывая высокие показатели распространенности и напряженности эпизоотолого-эпидемиологической обстановки, районы 3 и 4 группы можно классифицировать как территории эндемичные по сибирской язве, тогда как все остальные районы можно отнести к зоне спорадического проявления инфекции.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 19—24

Ключевые слова: сибирская язва, районирование, заболеваемость, эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка

*N.P.Buravtseva<sup>1</sup>, S.N.Antyuganov<sup>2</sup>, O.V.Semenko<sup>1</sup>, A.G.Ryazanova<sup>1</sup>,  
E.I.Eremenko<sup>1</sup>, A.N.Kulichenko<sup>1</sup>, V.M.Mezentsev<sup>1</sup>*

## **EPIZOOTOLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ZONING OF THE TERRITORY OF NORTH CAUCASUS FEDERAL REGION BY A DEGREE OF NON-WELFARE BY ANTHRAX USING ARC GIS10 PROGRAM**

<sup>1</sup>Stavropol Institute for Plague Control, <sup>2</sup>Centre of State Sanitary-Epidemiological Control in Stavropol Region, Stavropol, Russia

*Aim.* Conducting epizootological and epidemiological zoning of the territory of North Caucasus Federal Region (NCFR) by the degree of non-welfare by anthrax using Arc GIS10 program. *Materials and methods.* 2 parameters were used during zoning of the territories of subjects of NCFR (Stavropol Region, Karachaevo-Cherkessia, Kabardino-Balkaria, Chechen, North Ossetia-Alania, Ingushetia, Dagestan Republics) by non-welfare by anthrax: integrated parameter of infection risk and epizootics risk. The parameters were input into the Arc GIS10 program. Materials on infection of humans and animals with anthrax for the last 55 (1960 — 2014) years were used. *Results.* The regions of the territories of NCFR subjects were distributed by non-welfare degree into 4 groups: group 1 — regions with a low degree of non-welfare, group 2 — regions with an average degree of non-welfare, group 3 — regions with a high degree of non-welfare, group 4 — regions with a very high degree of non-welfare. *Conclusion.* Taking into account high parameters of spread and intensity of epizootological and epidemiological situation, regions of groups 3 and 4 could be classified as endemic territories for anthrax, whereas all the other regions could be attributed to the zone of sporadic infection manifestation.



Key words: anthrax, zoning, morbidity, epizootological and epidemiological situation

## ВВЕДЕНИЕ

Регион Северо-Кавказского федерального округа (СКФО) всегда отличался высокой заболеваемостью зоонозными инфекциями, среди которых сибирская язва занимает одно из ведущих мест [2, 5, 6, 7, 9, 11]. Одной из характерных особенностей эпизоотологии и эпидемиологии сибирской язвы является контрастность ее территориального распространения. Эта контрастность выявляется на глобальном уровне, в пределах отдельных континентов, в пределах отдельных стран, отдельных регионов и отдельных административных районов [10]. На территориальную распространенность сибирской язвы влияют многочисленные факторы: ландшафты территорий, характер почв, климатические факторы, хозяйственное использование отдельных территорий и др. Одним из аспектов повышения эффективности эпидемиологического надзора за сибирской язвой является оптимизация эпидемиологического мониторинга. На основе данных эпидемиологического и эпизоотологического обследования районов Ставропольского края и республик Северного Кавказа, входящих в состав СКФО, было установлено, что отдельные административные территории существенно отличаются по количеству больных и павших от сибирской язвы животных, по количеству стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП) и по количеству лет проявления активности сибирской язвы в СНП [1]. С учетом различной частоты и интенсивности этих показателей в разрезе административных районов нами проведено эпизоотолого-эпидемиологическое районирование территорий субъектов СКФО по степени неблагополучия по сибирской язве с использованием программы Arc GIS10 [3].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При районировании территорий субъектов СКФО по степени неблагополучия по сибирской язве были использованы два показателя: заболеваемость населения на той или иной территории — интегрированный показатель риска инфицирования (А) и индекс эпизоотичности (ИЭ). Используются материалы по заболеваемости людей и животных сибирской язвой за последние 55 лет (с 1960 по 2014 гг.). Для каждого района Ставропольского края и республик были рассчитаны величины А и ИЭ следующим образом. Интегрированный показатель риска инфицирования (А) по районам ранжировали по формуле [8]:  $A = (\bar{x} \cdot t) : T$ , где  $\bar{x}$  — средний интенсивный показатель заболеваемости на 10 000 населения,  $t$  — число лет регистрации сибирской язвы на конкретной территории,  $T$  — продолжительность изучаемого периода.

Для характеристики напряженности эпизоотической ситуации использовали предложенный М.Г.Таршис индекс эпизоотичности [10]:  $ИЭ = (n \cdot t) : (N \cdot T)$ , где  $n$  — число СНП, проявивших активность в течение периода наблюдения,  $t$  — число лет, в течение которых отмечались проявления активности,  $N$  — число всех населенных пунктов на изучаемой территории,  $T$  — число лет наблюдения. Затем для каждого района рассчитывали величину СН (степень неблагополучия) по формуле [4]:  $СН = (А + ИЭ) : 2$ , что позволило оценить территории по степени эпизоотической и эпидемической опасности. В результате проведенных расчетов территории с использованием программы Arc GIS10 были разделены на 4 группы: 1 группа — районы с низкой степенью неблагополучия, 2 группа — районы со средней степенью неблагополучия, 3 группа — районы с высокой степенью неблагополучия, 4 группа — районы с очень высокой степенью неблагополучия.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных расчетов районы края по степени неблагополучия по сибирской язве распределены следующим образом. Первая группа — районы с низкой степенью неблагополучия (показатели от 0 до 0,084) — Арзгирский, Благодарненский, Грачевский, Кировский, Левокумский, Минераловодский, Нефтекумский, Советский (8 районов). Вторая группа — районы со средней степенью неблагополучия (показатели от 0,085 до 0,307) — Буденовский, Георгиевский; Предгорный, Туркменский (4 района). Третья группа — районы с высокой степенью неблагополучия (показатели от 0,308 до 0,487) — Александровский, Андроповский, Апанасенковский, Красногвардейский, Новоселецкий, Степновский, Шпаковский (7 районов). Четвертая группа — районы с очень высокой степенью неблагополучия (показатели от 0,488 и выше) — Изобильненский, Ипатовский, Кочубеевский, Курской, Новоалександровский, Петровский, Труновский (7 районов).

Как видно из представленных данных, сибирская язва распространена на территории всех 26 районов. В некоторых районах активность СНП 1 группы проявлялась, в основном, до 1960 г. Так, после 1960 г. в Арзгирском, Благодарненском, Грачевском и Кировском районах не зарегистрировано ни одного случая заболевания людей, в остальных районах этой группы показатель А оказался значительно ниже в сравнении с другими районами. Наибольший интерес представляют 7 районов с очень высокой степенью неблагополучия. Эти районы в совокупности отличаются высокими показателями по количеству выявленных больных (58%), павших животных (46,5%) в сравнении с остальными группами. Характерным для этой группы являются наиболее высокие показатели по количеству лет проявления инфекции в СНП: от 10 лет (Кочубеевский, Новоалександровский районы) до 18 лет (Труновский район). В Курском, Труновском и Петровском районах наблюдалось наибольшее количество вспышек сибирской язвы в последние два периода. Если всего с 1990 г. на всей территории Ставропольского края заболели 25 человек, то 10 случаев из них приходится на эти 3 района, что составляет 40%.

В Карачаево-Черкесской республике (КЧР) по степени неблагополучия по сибирской язве районы распределены следующим образом. Первая группа — районы с низкой степенью неблагополучия (показатели от 0 до 0,20) — Абазинский, Зеленчукский, Урупский. Вторая группа — районы со средней степенью неблагополучия (показатели от 0,21 до 0,46) — Адыге-Хабльский, Малокарачаевский, Хабезский. Третья группа — районы с высокой степенью неблагополучия (показатели от 0,47 до 1,38) — Карачаевский, Усть-Джегутинский. Четвертая группа — районы с очень высокой степенью неблагополучия (показатели от 1,39 и выше) — Ногайский, Прикубанский.

В Урупском и Абазинском районах сибирская язва не регистрировалась в течение всего анализируемого периода, в Зеленчукском районе болели только животные (районы с низкой степенью неблагополучия). В КЧР обстановка по сибирской язве резко ухудшилась в 1992 г., когда произошла крупная вспышка, в результате которой заболел 21 человек. Большинство больных (19 человек) были зарегистрированы в Адыге-Хабльском районе, но после разделения района в 2006 г. это количество больных переведено в Ногайский район. В результате самые высокие позиции по СН занимает Ногайский район в группе с очень высокой степенью неблагополучия (2,64).

Районы в Кабардино-Балкарской республике (КБР) по степени неблагополучия по сибирской язве были разделены следующим образом. Первая группа — районы с низкой степенью неблагополучия (показатели от 0 до 0,04) — Майский, Эльбрусский и г. Нальчик. Вторая группа — районы со средней степенью неблагополучия (показатели от 0,05 до 0,16) — Зольский, Прохладненский,

Чегемский. Третья группа — районы с высокой степенью неблагополучия (показатели от 0,17 до 0,90) — Лескенский, Черекский, Урванский. Четвертая группа — районы с очень высокой степенью неблагополучия (показатели от 0,91 и выше) — Баксанский, Терский.

В Майском, Эльбрусском районах и г. Нальчик больные после 1960 г. не зарегистрированы, поэтому индекс А для этих районов равен 0 и по СН эти районы оказались в 1 группе. В 1993 г. и 1998 г. зарегистрированы две крупные вспышки сибирской язвы среди людей и животных. При вспышке сибирской язвы в 1993 г. в с. В. Куркужин (Баксанский район) заболели 16 человек, пали от сибирской язвы 22 головы КРС, в с. Хамиди Терского района в 1998 г. заболели 12 человек, пали от сибирской язвы 5 голов коров. Эти районы вошли в 4 группу и представляют до сих пор очень высокую степень неблагополучия.

По показателям неблагополучия по сибирской язве районы Республики Северная Осетия-Алания (РСО-А) разделены следующим образом: первая группа — районы с низкой степенью неблагополучия (показатели от 0 до 0,43) — Правобережный и г. Владикавказ. Вторая группа — районы со средней степенью неблагополучия (показатели от 0,44 до 1,20) — Алагирский, Ардонский и Моздокский. Третья группа — районы с высокой степенью неблагополучия (показатели от 1,21 до 2,19) — Дигорский, Кировский. Четвертая группа — районы с очень высокой степенью неблагополучия (показатели от 2,20 и выше) — Ирафский, Пригородный. В основном, заболеваемость людей в республике носит спорадический характер, однако в 1983 г. в Пригородном районе зафиксирована крупная вспышка сибирской язвы среди людей, заболели 16 человек, а в 1988 г. в Алагирском районе пали 30 голов коров. В этом периоде оказались неблагополучными все 8 районов республики. Обращает на себя внимание тот факт, что количество павших животных в каждом районе почти в 10 раз превышало количество больных. В РСО-А к 4 группе с очень высокой степенью неблагополучия отнесены Ирафский и Пригородный районы.

Существенные отличия в проявлении сибиреязвенной инфекции в республиках (КЧР, КБР, РСО-А) наблюдаются в последнем периоде. В КЧР и КБР в течение последних 15 лет сибирская язва не регистрировалась, в то время как в РСО-А в 3 районах (Ирафский, Моздокский и Пригородный) сибирская язва проявляла свою активность в 2005 — 2007 и 2009 гг.

По показателям неблагополучия по сибирской язве районы Чеченской Республики (ЧР) и Республики Ингушетия (РИ) распределены следующим образом. Первая группа — районы с низкой степенью неблагополучия (показатели от 0 до 0,6) — Джейрахский, Веденский, Наурский, Сунженский (ЧР), Сунженский (РИ). Вторая группа — районы со средней степенью неблагополучия (показатели от 0,601 до 1,22) — г. Грозный, Итум-Калинский, Шалинский, Шатойский, Шаройский районы. Третья группа — районы с высокой степенью неблагополучия (показатели от 1,221 до 2,130) — Ачхой-Мартановский, Курчалойский, Малгобекский, Ножай-Юртовский, Шелковской. Четвертая группа — районы с очень высокой степенью неблагополучия (показатели от 2,131 и выше) — Грозненский, Гудермесский, Назрановский, Надтеречный, Урус-Мартановский.

По количеству выявленных больных районы ЧР и РИ не равнозначны. Можно выделить такие районы, как Грозненский, Гудермесский, Курчалоевский, Надтеречный, Урус-Мартановский, Назрановский, где количество заболевших людей превышало 40 — 50 человек в течение анализируемого периода. Все эти районы при окончательном расчете оказались в 3 и 4 группе с высокой и очень высокой степенью неблагополучия. Следует заметить, что в ЧР, в сравнении с другими субъектами РФ, было выявлено самое большое количество больных. Это сказалось на количестве лет активности проявления сибирской язвы в этой рес-

публике. Особенно активными были такие районы, как Надтеречный (29 лет), Грозненский (25), Урус-Мартановский (24), Курчалоевский и Назрановский (по 22 года). В республике Ингушетия последний год активности приходится на 1992 г., в последующем сибирская язва не регистрировалась, в то время, как в ЧР активность сибирской язвы не прекратилась и в последнем периоде (2003, 2005 — 2007 и 2010 годы).

При районировании территории Республики Дагестан (РД) было обращено внимание на тот факт, что в анализируемом периоде в 18 районах регистрировалась низкая заболеваемость как среди людей, так и животных. В результате, к 1 группе с низкой степенью неблагополучия (показатели от 0 до 0,03) были отнесены 7 районов, в которых сибирская язва среди людей не зарегистрирована: Дахадаевский, Курахский, Лакский, Ногайский, Тарумовский, Хивский, Хунзахский. Вторая группа — средняя степень неблагополучия (показатели от 0,031 до 0,265) — Ахтынский, Гергебильский, Гумбетовский, Левашинский, г. Махачкала, Магарамкентский, Новолакский, Табасаранский, Цуматинский, Цунтинский, Шамильский (11 районов). Третья группа — высокая степень неблагополучия (показатели от 0,266 до 1,037) — Акушинский, Дербентский, Казбековский, Карабудахкентский, Каякентский, Кизлярский, Кулинский, Рутульский, Тляротинский, Чародинский, Унцукульский (11 районов). Четвертая группа — очень высокая степень неблагополучия (показатели от 1,038 и выше) — Ахвахский, Бабаюртовский, Ботлихский, Буйнакский, Гунибский, Кайтагский, Кизилюртский, Сергокалинский, Сулейман-Стальский, Хасавюртовский (10 районов).

Особую настороженность вызывают 10 районов с очень высокой степенью неблагополучия. Эти районы занимают всего 26% площади территории республики, однако 66,8% больных и 36,7% павших от сибирской язвы животных в последние 55 лет приходятся на эти районы. В эту группу входят районы, у которых самые высокие показатели по количеству активных лет проявления инфекции: Сергокалинский район — 17 лет, Буйнакский. — 18 лет, Бабаюртовский и Хасавюртовский районы — по 20 лет. Активность СНП в большинстве районов этой группы проявлялась и в последнем периоде, начиная с 2000 г. и заканчивая 2012 г. (Ахвахский район).

Существующая система противосибирезвенных мероприятий, обеспечивая снижение заболеваемости до единичных случаев как среди людей, так животных, не может однако привести к надежному предупреждению заболеваний и тем более к ликвидации возбудителя, поскольку она не оказывает прямого влияния на жизнедеятельность сибирезвенного микроба в зараженных участках почвы. Современная противоэпидемическая практика, к сожалению, не располагает надежными и пригодными для широкого применения методами санации почвенных очагов. Основные функции эпизоотолого-эпидемиологического надзора за сибирской язвой — это выявление, учет, паспортизация и постоянное слежение за санитарно-ветеринарным состоянием и проявлениями эпизоотологической или эпидемиологической активности в СНП. Информация о СНП, прежде всего, дает возможность построения дифференцированной системы противосибирезвенных мероприятий, комплекс которых должен быть разным для территорий с разной степенью проявления эпизоотологической и эпидемиологической активности.

Обобщая полученные данные о заболеваемости сибирской язвой людей и животных, количестве СНП, степени проявления их активности в прошлом и тенденции к активизации в настоящем, можно сделать заключение, что районы с высокой и очень высокой степенью неблагополучия сформировали статус неблагополучия по сибирской язве в отдельных районах различных субъектов СКФО. Учитывая высокие показатели распространенности и напряженности эпи-

зоотолого-эпидемиологической обстановки, районы 3 и 4 группы на территории СКФО можно классифицировать как территории, эндемичные по сибирской язве, тогда как все остальные районы можно отнести к зоне спорадического проявления инфекции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Буравцева Н.П., Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Воропаев В.В., Аксенова Л.Ю., Головинская Т.М., Куличенко А.Н., Антюганов С.Н. Эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по сибирской язве в Северо-Кавказском федеральном округе. Здоровье населения и среда обитания. 2014, 9: 38-41.
2. Бугаев Т. М. Некоторые аспекты заболеваемости людей и животных бруцеллезом и сибирской язвой в Республике Северная Осетия-Алания в современных условиях. Дис. канд. мед. наук. Ставрополь, 2004.
3. Дубянский В.М., Куличенко А.Н., Семенко О.В., Малецкая О.В., Мезенцев В.М. Совершенствование эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями с использованием геоинформационных систем. Журн. микробиол. 2014, 1: 85-91.
4. Куклев Е.В, Кокушкин А.М., Кутырев В.В. Районирование природных очагов чумы на основе величины их эпидемического потенциала. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2001, 4: 15-17.
5. Куличенко А.Н., Буравцева Н.П., Антюганов С.Н., Омариева Э.Я., Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Мезенцев В.М., Цыганкова О.И., Гаджиева А.А., Алжанбекова И.Г., Бамматов Д.М. Сибирская язва в Республике Дагестан. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 2: 22-25.
6. Мицаев Ш.Ш., Буравцева Н.П. Эпизоотологическая характеристика Чеченской и Ингушской Республик по сибирской язве. Вестник ветеринарии. 2008, 47 (4): 33-41.
7. Петрюк В.А. Совершенствование противоэпидемических и профилактических мероприятий сибирской язве в Карачаево-Черкесской республике. Автореф. дис. канд. мед. наук. Саратов, 1999.
8. Русанова Д.В., Лямкин Г.И., Манин Е.А., Ляпустина Л.В., Вилинская С.В., Богданов И.К. Методические рекомендации по эпидемиологической классификации административных территорий по уровню заболеваемости. Ставрополь, 2003.
9. Урусбамбетов З.Х., Буравцева Н.П., Вайсман И.В., Тлупов Р.А., Казаков А.М. Эпидемиология и эпизоотология сибирской язвы в Кабардино-Балкарской республике. Деп. в ВИНТИ 19.07.00, 2010—В00.
10. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: Интерсэн, 2002.
11. Феньев В. М. Сибирская язва в Дагестане. Журн. микробиол. 1969, 12: 118-121.

*Поступила 12.01.16*

Контактная информация: Буравцева Нина Пантелеймоновна, д.м.н., проф., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т.(8652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*П.А.Мочалкин<sup>1</sup>, А.П.Мочалкин<sup>1</sup>, Е.Г.Степанов<sup>2</sup>, Л.А.Фарвазова<sup>2</sup>, Н.В.Попов<sup>3</sup>*

#### **ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН**

<sup>1</sup>Республиканский центр дезинфекции, Уфа, <sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по Республике Башкортостан, Уфа; <sup>3</sup>Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

*Цель.* Типизация природных очагов ГЛПС Республики Башкортостан и дифференциация их территорий по степени потенциальной эпидемической опасности. *Материалы и методы.* Использованы материалы эпизоотологического и эпидемиологического мони-

торинга природных очагов ГЛПС Республики Башкортостан за 1980 — 2014 гг. Оценка площади территории с высокой, средней и низкой потенциальной эпидемической опасностью по ГЛПС проведена с учетом многолетних показателей заболеваемости по административным районам Республики Башкортостан. Для эпидемиологической дифференциации территории использованы три градации уровня заболеваемости ГЛПС — более 201, 101 — 200, до 100 чел. на 100 тыс. населения. *Результаты.* Выделены три основных ландшафтно-эпидемиологического типа очагов ГЛПС — лесной, лесостепной и степной, а также их ландшафтные варианты. Установлено, что площадь с высокой степенью потенциальной эпидемической опасности по ГЛПС составляет около 3,8%; средней — 15,9%; низкой — 80,3% от всей территории Республики Башкортостан. *Заключение.* Обоснована необходимость дифференцированного подхода к территориям с различной степенью потенциальной эпидемической опасности по ГЛПС при проведении профилактических мероприятий.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 24—31

Ключевые слова: типы и ландшафтные варианты природных очагов ГЛПС, потенциальная эпидемическая опасность территории, неспецифическая профилактика

*P.A.Mochalkin<sup>1</sup>, A.P.Mochalkin<sup>1</sup>, E.G.Stepanov<sup>2</sup>, L.A.Farvazova<sup>2</sup>, N.V.Popov<sup>3</sup>*

## EPIDEMIOLOGICAL DIFFERENTIATION OF NATURAL FOCI OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME OF THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN

<sup>1</sup>Republic Centre of Disinfection, Ufa, <sup>2</sup>Administration of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights' Protection and Human Well-being for the Republic of Bashkortostan, Ufa; <sup>3</sup>Russian Research Institute for Plague Control «Microbe», Saratov, Russia

*Aim.* Typization of natural foci of HFRS of the Republic of Bashkortostan and differentiation of their territories by the degree of potential epidemic hazard. *Materials and methods.* Materials of epizootologic and epidemiologic monitoring of natural foci of HFRS of the Republic of Bashkortostan for 1980 — 2014 were used. Evaluation of area of territory with high, medium and low potential epidemic hazard by HFRS was carried out taking into account multi-year parameters of morbidity by administrative districts of the Republic of Bashkortostan. 3 gradations of morbidity level by HFRS — more than 201, 101 — 200, less than 100 per 100 thousand of the population — were used for epidemiologic differentiation of the territory. *Results.* 3 main landscape-epidemiologic types of HFRS foci were isolated — forest, forest-barrens, barrens, as well as their landscape variants. The area with a high degree of potential epidemic hazard by HFRS was established to be around 3.8%; medium — 15.9%, low — 80.3% of the whole territory of the Republic of Bashkortostan. *Conclusion.* A necessity of a differentiated approach to territories with various degree of potential epidemic hazard by HFRS is justified during execution of prophylaxis activities.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 24—31

Key words: types and landscape variants of natural foci of HFRS, potential epidemic hazard of a territory, non-specific prophylaxis

## ВВЕДЕНИЕ

С середины 80-х гг. прошлого столетия на фоне роста интенсивной урбанизации и антропогенной трансформации лесостепных и лесных ландшафтов эпидемиологическая обстановка по ГЛПС на территории Республики Башкортостан резко обострилась [1, 2, 7]. В последнее десятилетие в Республике Башкортостан в среднем регистрируются от 1,5 до 2,5 тысяч больных ежегодно. Наибольшее эпидемиологическое значение имеют две ландшафтные зоны республики — лес-

ная и лесостепная [3]. При этом напряженная эпидемиологическая обстановка по ГЛПС постоянно сохраняется в пригороде Уфы и близлежащих районах [4]. Существует также определенная зависимость уровня заболеваемости ГЛПС от численности и инфицированности грызунов, прежде всего, рыжей полевки [8]. При этом наибольшее количество больных заражается в населенных пунктах и пригородных лесных массивах. Все это в целом обуславливает необходимость установления границ участков, характеризующихся высоким риском заражения ГЛПС, выполнения дифференциации очагов ГЛПС Республики Башкортостан по степени потенциальной эпидемической опасности как основы для современной стратегии и тактики неспецифической профилактики [5, 6]. Цель работы — типизация природных и природно-антропоургических очагов ГЛПС и дифференциация очаговых территорий Республики Башкортостан по степени потенциальной эпидемической опасности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основой выполненного исследования послужили материалы эпидемиологического мониторинга эндемичных по ГЛПС территорий Республики Башкортостан Управления Роспотребнадзора по Республике Башкортостан; Дезинфекционной станции (Уфа) и Республиканского центра дезинфекции МЗ Республики Башкортостан; Регионального центра по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней I — II групп патогенности при РосНИПЧИ «Микроб» за период 1980 — 2014 гг.; данные «Кратких обзоров численности мелких млекопитающих и членистоногих и эпизоотологических прогнозов природно-очаговых инфекций» Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Башкортостан за период 2000 — 2014 гг. Анализ пространственных особенностей эпидемических проявлений ГЛПС проведен на основании сведений из первичных учетных форм по лабораторно подтвержденным случаям. Оценка площади территории с высокой, средней и низкой потенциальной эпидемической опасностью по ГЛПС проведена с учетом многолетних показателей заболеваемости (на 100 тыс. населения) по 54 административным районам Республики Башкортостан. Статистическая обработка данных и визуализация полученных результатов проводилась с использованием пакета стандартных приложений Microsoft Office и Statistica 8.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа данных эколого-эпидемиологического мониторинга за природными очагами ГЛПС в период 1980 — 2014 гг. выполнена ландшафтно-эпидемиологическая типизация эндемичных по ГЛПС территорий Республики Башкортостан. Выделены три основных ландшафтно-эпидемиологических типа очагов ГЛПС, а именно: лесной, лесостепной и степной. Выделенные типы очагов ГЛПС имеют различные ландшафтные варианты, отличающиеся между собой, в первую очередь, по биоценотической структуре и степени потенциальной эпидемической опасности.

Природный очаг ГЛПС лесного типа включает горнолесной, предгорно-лесной ландшафтные варианты. Распространение природных очагов ГЛПС лесного типа совпадает с зоной широколиственных, светло- и темнохвойных лесов северо-западной, западной и центральной части Башкирского Южного Урала, Уфимского и Зилаирского плато. Территория лесной зоны Республики Башкортостан охватывает 11 административных районов, в том числе: Аскинский, Белорецкий, Бурзянский, Гафурийский, Зилаирский, Иглинский, Ишимбайский, Караидельский, Кугарчинский, Мелеузовский, Нуримановский. Видовой спектр носителей хантовирuсов представлен здесь желтогорлой и лесной мышами, рыжей полевкой. Общая площадь территории, занятая природными очагами лесного



типа, составляет 48,597 тыс. км<sup>2</sup>, т.е. 33,84% от общей площади Республики Башкортостан. Для горных и предгорно-лесных ландшафтов характерна низкая степень урбанизации. Средняя плотность сельского населения составляет 10,6 чел. на 1 км<sup>2</sup>. Невысокий уровень хозяйственной освоенности лесных ландшафтов обуславливает относительно низкую интенсивность контактов населения с природноочаговыми комплексами и спорадический характер заболеваемости ГЛПС. При этом наиболее высокий уровень заболеваемости ГЛПС (более 100 на 100 тыс. населения) отмечен в Аскинском, Нуримановском, Караидельском, Иглинском; Мелеузовском административных районах, территории которых подвергаются интенсивной антропогенной трансформации (лесозаготовки, зоны рекреации, туризм и др.). Преобладающий эпидемический тип заражения лесной. Сезонный пик заболеваемости регистрируют в летне-осенние месяцы, что, связано, в основном, с посещением лесных массивов (лесозаготовка, туризм, сбор грибов, ягод).

Природный очаг ГЛПС лесостепного типа охватывает территорию западных предгорий Южного Урала (правобережье низовий р. Белой), башкирской части Высокого Заволжья (Белебеевская, Стерлибашевско-Федоровская возвышенность, северные отроги Общего Сырта), Уфимского плато и междуречий р. Таныпа и Буя, рр. Камы и Белой, северо-восточного Предуралья (Месягутовская лесостепь). Лесные массивы, сохранившиеся в северной части Республики Башкортостан, в значительной степени нарушены хозяйственной деятельностью человека. Общая площадь лесостепного природного очага ГЛПС Республики Башкортостан составляет 56,199 тыс. км<sup>2</sup>, т.е. 39,14% от общей площади Республики Башкортостан. В лесостепной зоне расположены наиболее крупные города Республики Башкортостан, в том числе Уфа, Стерлитамак, Салават, Нефтекамск, Октябрьский. Средняя плотность сельского населения достигает 19,6 чел. на 1 км<sup>2</sup>. Природный очаг ГЛПС лесостепного типа представлен равнинно-лесным, прибрежно-лесным, садово-лесным, кустарниково-луговым и лесопарковым ландшафтными вариантами. В природных биотопах равнинно-лесного и прибрежно-лесного ландшафтных вариантов лесостепных очагов ГЛПС основными носителями хантовирюсов являются рыжая и обыкновенная полевки, полевая, желтогорлая и лесная мыши. Здесь зарегистрирован, в основном, лесной эпидемический тип заражения. На антропогенно измененных участках лесостепных очагов ГЛПС (садово-лесной, кустарниково-луговой, лесопарковый ландшафтные варианты) видовой спектр носителей хантовирюсов представлен рыжей, обыкновенной полевками, полевой, лесной и домовый мышами, серой крысой. Наиболее эпидемиологически значимыми элементами пространственной структуры отдельных лесостепных урбанизированных служат, в первую очередь, сопряжённые участки городских (сельских) селитебных и природных ландшафтов. В сформировавшихся здесь природно-антропоургических очагах ГЛПС преобладающими эпидемическими типами заражения являются садово-огородный, сельскохозяйственный, летне-оздоровительный. В связи с большей, по сравнению с горнолесными и предгорно-лесными ландшафтами, степенью урбанизации и хозяйственной освоенностью лесостепной зоны, плотность, а также интенсивность контактов населения с очагами ГЛПС здесь значительно выше. Здесь ежегодно регистрируется высокий уровень спорадической заболеваемости ГЛПС, а в прошлом неоднократно имели место крупные вспышки ГЛПС. При этом наиболее высокая комплексность селитебных и природных ландшафтов, равно как и уровень заболеваемости ГЛПС, характерна для территорий Уфы, Уфимского, Благовещенского, Мишкинского районов, где сконцентрировано около 30% городского населения Республики Башкортостан и зарегистрирован самый высокий уровень заболеваемости ГЛПС. При этом в Уфе ежегодно регистрируют около 50% всех случаев заражения ГЛПС в Республике Башкортостан. В 2000 — 2014 гг. сред-

ний многолетний уровень заболеваемости ГЛПС в очагах лесостепного типа достигал 200 — 300 чел. на 100 тыс. населения. В лесостепных очагах ГЛПС имеют место два пика заболеваемости: весенне-летний (конец мая или начало июня) и осенний (в сентябре—октябре). В природно-антропоургических очагах весенний пик заболеваемости связан с началом дачного сезона, осенне-зимний — с миграцией грызунов в строения и началом работ по перевозке стогов и фуража.

Природные очаги степного типа наиболее широко распространены, в основном, в границах Прибельской равнины, южной части Высокого Заволжья, степного Зауралья (14 административных районов: Абзелиловский, Альшеевский, Баймакский, Бижбулякский, Благоварский, Буздякский, Давлекановский, Зианчуринский, Кармаскалинский, Миякинский, Стерлибашевский, Учалинский, Хайбуллинский, Чекмагушевский). Общая площадь природного очага степного типа составляет 38,404 тыс. км<sup>2</sup>; т.е. 27,02% от общей площади Республики Башкортостан. Средняя плотность сельского населения составляет 13,8 чел. на 1 км<sup>2</sup>. Здесь преобладают сельскохозяйственные земли на месте заволжско-казахстанских, низкогорных уральских, восточно-европейских и западно-сибирских степей, остепненных лугов. Природный очаг ГЛПС степного типа представлен садово-огородным, луго-полевым и кустарниково-пойменным ландшафтными вариантами. Основными резервуарами хантовирюсов в степных (сельскохозяйственных) ландшафтах является обыкновенная и рыжая полевки, полевая, лесная, домовая мыши, серая крыса.

В связи с низкой эпизоотологической и эпидемиологической значимостью агроландшафтов в природной очаговости ГЛПС для природного очага степного типа характерен низкий уровень спорадической заболеваемости. Наибольшей потенциальной эпидемической опасностью характеризуются пойменные участки многочисленных степных речек с прилегающими надпойменными степными биотопами, которые используются как зоны рекреации (Альшеевский, Кармаскалинский, Стерлибашевский административные районы). В 2000 — 2014 гг. средний многолетний уровень заболеваемости ГЛПС в очагах степного типа не превышал 100 чел. на 100 тыс. населения. Преобладающими типами заражения являются садово-огородный, бытовой, производственный и сельскохозяйственный. Пик заболеваемости ГЛПС регистрируют в весенне-летний и осенне-зимний сезон.

В последние десятилетия, вследствие радикальных изменений условий хозяйственного использования (бытового, лесо- и сельскохозяйственного, промышленного) территорий Республики Башкортостан на антропогенно-измененных участках всех типов очагов происходит интенсивное распространение хантовирюсов в пригородных лесных массивах и периферийных зонах населенных пунктов. В селитебных ландшафтах, в первую очередь в урбозонах крупных городов, преобладают бытовой, сельскохозяйственный типы заражения.

Отмечаемая специфика эколого-эпидемиологических особенностей, равно как и пространственного распределения интразональных ландшафтных вариантов лесных, лесостепных и степных природных очагов ГЛПС, определяют, в целом, различный уровень заболеваемости в конкретных административных районах и городах Республики Башкортостан. В качестве основного критерия дифференциации очаговых территорий по степени потенциальной эпидемической опасности был использован показатель уровня заболеваемости ГЛПС по административным районам Республики Башкортостан за период 1980 — 2014 гг. (на 100 тыс. населения). При этом использовали три основные градации заболеваемости ГЛПС — 201 и выше; от 101 до 200; до 100 чел. на 100 тыс. населения. Соответственно, территория Республики Башкортостан условно подразделена на три категории — с высокой (3 района — Уфимский, Благовещенский, Мишкинский), средней (11 районов — Альшеевский, Аскинский, Бирский, Бураевский, Иглинский,

Кармаскалинский, Нуримановский, Салаватский, Стерлибашевский, Татышлинский, Туймазинский), низкой (40 районов) степенью потенциальной эпидемической опасности. В результате выполненного эпидемиологического районирования эндемичных по ГЛПС территорий Республики Башкортостан также определена фактическая площадь участков высокой, средней и низкой потенциальной эпидемической опасности для каждого выделяемого типа очагов. Последнее позволило также выделить зоны высокой, средней и низкой потенциальной эпидемической опасности по ГЛПС в границах Республики Башкортостан. Причем площадь с высокой степенью потенциальной эпидемической опасности по ГЛПС составляет 5493 км<sup>2</sup> (3,8%); средней — 22 864 км<sup>2</sup> (15,9%); низкой — 11 5243 км<sup>2</sup> (80,3% от всей территории Республики Башкортостан). Также существенно, что до 80% ежегодных случаев заражения ГЛПС в Республике Башкортостан имеет место при посещении лесных массивов; около 16% — в бытовых условиях; около 3% — в коллективных садах и огородах. В связи с выраженной неравнозначностью потенциальной эпидемической опасности очаговых территорий, целесообразно значительно повысить надежность защиты людских контингентов, подвергающихся наибольшему риску заражения, оптимизировать объемы профилактических мероприятий, обосновать приоритетность финансирования профилактических работ, в первую очередь на участках, характеризующихся высокой степенью потенциальной эпидемической опасности.

В связи с многообразием ландшафтно-географических и климатических условий на территории Республики Башкортостан сформировался широкий спектр эпидемически активных интразональных ландшафтных вариантов природных и природно-антропоургических очагов ГЛПС [3]. Антропогенная трансформация очаговых территорий усилила сопряженность селитебных (городских, сельских) и природных ландшафтов, что послужило основной причиной формирования в ближайших окрестностях населенных пунктов многовидовых сообществ мышевидных грызунов — носителей ГЛПС, в том числе синантропных и экзоантропных их видов [4]. Сформировавшиеся в урбозонах крупных городов природно-антропоургические очаги ГЛПС, по сравнению с природными, характеризуются большей степенью потенциальной эпидемической опасности, в первую очередь, за счет большей частоты и интенсивности контактов населения с их биоценотическими комплексами. При этом наиболее высокой степенью потенциальной эпидемической опасности характеризуются прибрежно-лесной, садово-лесной, лесопарковый варианты лесостепного природного очага ГЛПС. Существенно, что характерной чертой участков с высокой потенциальной эпидемической опасностью по ГЛПС является выраженная сопряженность городских селитебных, садово-парковых и природных ландшафтов. В частности, наиболее высокая комплексность селитебных и природных ландшафтов наиболее характерна для Уфы и прилегающих Уфимского, Благовещенского, Мишкинского административных районов, где проживает около 1,2 млн человек, т.е. 30% всего населения Республики Башкортостан. Вплоть до 2005 г. здесь ежегодно регистрировали групповую заболеваемость ГЛПС. В 1997 г. уровень заболеваемости в г. Уфа составил 606 чел. на 100 тыс. населения. Инфраструктура Уфы характеризуется наличием зеленой зоны, лесных массивов в районах многоэтажной застройки и в поймах рек, зон рекреации, сельхозугодий различного назначения, дачных массивов. Общая площадь участков, характеризующихся широким спектром урболандшафтов (от природных через природно-антропогенные до техногенных) достигает здесь 20 — 25%. При этом общая площадь территории, характеризующейся высокой потенциальной эпидемической опасностью, составляет в Республике Башкортостан около 5493 км<sup>2</sup>, т.е. всего 3,8% от общей площади Республики Башкортостан.

Средней степенью потенциальной эпидемической опасности характеризуются равнинно-лесной вариант лесостепного и луго-полевой, садово-огородный

варианты степного природных очагов ГЛПС. Ландшафтными признаками территорий со средней степенью потенциальной эпидемической опасностью служат различные варианты сочетанных сельских селитебных, пойменных, агропромышленных и предгорных лесных ландшафтов. В окрестностях населенных пунктов (поселки городского типа и др.) встречаются пойменные лесные массивы, зоны рекреации. Общая площадь территории в Республике Башкортостан, характеризующейся средней степенью потенциальной эпидемической опасностью, составляет около 22 864 км<sup>2</sup>, т.е. 15,9% от общей площади Республики Башкортостан.

Низкой степенью потенциальной эпидемической опасности характеризуются территории горнолесных, предгорно-лесных вариантов лесного, кустарниково-луговых вариантов лесостепного, а также кустарниково-пойменных вариантов степного природных очагов ГЛПС. Ландшафтными признаками территорий с низкой потенциальной эпидемической опасностью служат различные сочетания сельских селитебных, аграрных, горнолесных и горно-лесостепных ландшафтов. Общая площадь территории, характеризующейся низкой степенью потенциальной эпидемической опасности составляет около 115 243 км<sup>2</sup>, т.е. 80,3% от общей площади Республики Башкортостан.

Установленные эпидемиологические, физико-географические и ландшафтно-эпизоотологические особенности очагов ГЛПС необходимо учитывать для рационального планирования, организации и осуществления неспецифических профилактических мероприятий [5, 9]. Выполненная эпидемиологическая дифференциация эндемичных по ГЛПС территорий Республики Башкортостан по степени потенциальной эпидемической опасности служит основой для обоснования соответствующего регламента профилактических мероприятий. При этом для дальнейшего снижения заболеваемости ГЛПС необходимо направленно концентрировать дезинфектологические обработки (дератизация, дезинфекция) на участках с высоким риском заражения, обеспечивать адекватное увеличение объемов профилактических мероприятий в соответствии с ростом потенциальной эпидемической опасности территорий природных очагов ГЛПС.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Минин Г.Д., Коробов Л.И., Валеев В.Т. и др. Организация неспецифической профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом на эндемичной территории в Республике Башкортостан. Эпидемиол. инф. болезни. 2013, 2: 50-53.
2. Мочалкин П.А., Рябов С.В., Мочалкин А.П. и др. Неспецифическая профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Республике Башкирия. Пробл. особо опасных инф. 2009, 2: 30-37.
3. Мочалкин П.А., Рябов С.В., Мочалкин А.П. и др. Неспецифическая профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в антропоургических и природных очагах Башкортостана. Дезинфекционное дело. 2007, 3: 54-59.
4. Мочалкин П.А., Мочалкин А.П., Степанов Е.Г. и др. Оценка потенциальной эпидемической опасности сопряженных очагов ГЛПС в г. Уфе. Пест-менеджмент. 2014, 1: 11-15.
5. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б. Эпидемиологический надзор и профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в РФ. Эпидемиол. инф. болезни. 2013, 4: 23-32.
6. Попов Н.В., Топорков В.П., Сафронов В.А. и др. Современные направления снижения уровня заболеваемости природно-очаговыми инфекционными болезнями на территории Российской Федерации. Эпидемиол. инф. болезни. Актуальные вопр. 2013, 5: 15-17.
7. Такаев Р.М., Кучимова Н.А., Мавлютов О.М. Профилактика инфекционных заболеваний в Республике Башкортостан. Дезинфекционное дело. 2009, 3: 37-39.
8. Такаев Р.М., Кучимова Н.А., Фарвазова Л.А. и др. Неспецифическая профилактика

геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Республике Башкортостан. Методические рекомендации. Уфа, 2010.

9. Ткаченко Е.А., Бернштейн А.Д., Дзагурова Т.К. и др. Актуальные проблемы геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Журн. микробиол. 2013, 1: 51-58.

Поступила 30.08.15

Контактная информация: Мочалкин Павел Александрович, к.м.н., 450005, Республика Башкортостан, Уфа, ул. Мингажева, 127/1, р.т. (347)273-83-27

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

К.М.Курбанов<sup>1</sup>, С.С.Саторов<sup>2</sup>, Е.Г.Симонова<sup>3,4</sup>, Н.Н.Филатов<sup>4</sup>

## СОВРЕМЕННЫЕ ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БРУЦЕЛЛЕЗА В РЕСПУБЛИКЕ ТАДЖИКИСТАН

<sup>1</sup>Таджикский НИИ профилактической медицины, <sup>2</sup>Таджикский государственный медицинский университет, Душанбе; <sup>3</sup>Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; <sup>4</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

*Цель.* Изучение эпизоотологических и эпидемиологических особенностей бруцеллеза на территории Республики Таджикистан в условиях социально-экономических преобразований с оценкой широты и масштабов его распространенности, а также причин сложившейся ситуации. *Материалы и методы.* Использованы данные официальной статистики, результаты экспертных оценок, отчеты, аналитические материалы национальных и международных организаций, результаты клинико-эпидемиологического анализа. Применялись описательно-оценочные эпидемиологические методы; серологические исследования проб, полученных от людей, животных, из объектов внешней среды в период с 2000 по 2013 гг.; картографирование с использованием элементов ГИС-технологии, а также статистический анализ. Использовались методики расчета индекса DALY и показателя риска инфицирования населения. *Результаты.* Выявлены особенности ситуации по бруцеллезу, заключающиеся в его широком распространении среди людей и сельскохозяйственных животных, изменении структуры заболеваемости, а также характера ее сезонного и территориального распределения, связанного с преимущественным действием социальных факторов риска. *Заключение.* Современная ситуация по бруцеллезу в Республике Таджикистан характеризуется выраженным неблагополучием и детерминирована действующими социально-экономическими условиями. Основными факторами являются изменения условий ведения сельскохозяйственной деятельности на фоне высокого уровня безработицы и внешней трудовой миграции.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 31—37

Ключевые слова: эпидемиология бруцеллеза, эпизоотология бруцеллеза, социальные факторы риска, надзор за бруцеллезом

К.М.Kurbanov<sup>1</sup>, S.S.Satorov<sup>2</sup>, E.G.Simonova<sup>3,4</sup>, N.N.Filatov<sup>4</sup>

## CONTEMPORARY EPIZOOTOLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF BRUCELLOSIS IN THE REPUBLIC OF TAJIKISTAN

<sup>1</sup>Tajik Research Institute of Prophylactic Medicine, <sup>2</sup>Tajik State Medical University, Dushanbe; <sup>3</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; <sup>4</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

*Aim.* Study epizootological and epidemiological features of brucellosis on the territory of the Republic of Tajikistan under the conditions of social-economic transformation with evaluation of width and scale of its spread, as well as reasons of the present situation. *Materials and methods.* Official statistics data, results of expert evaluations, reports, analytical material of national and

international organizations, results of clinical and epidemiological analysis were used. Descriptive-evaluative epidemiologic methods, serologic studies of samples obtained from humans, animals, environmental objects between 2000 and 2013; mapping using GIS-technology, as well as statistical analysis were used. Techniques of calculation of DALY index and population infection risk parameter were used. *Results.* Features of situation by brucellosis were detected, that lay in its wide spread among humans and agricultural animals, changes in morbidity structure, as well as character of its seasonal and territorial spread, connected with predominant effect of social risk factors. *Conclusion.* Contemporary situation for brucellosis in the Republic of Tajikistan is characterized by a pronounced non-welfare and determined by acting social-economic conditions. The main factors are changes in the conditions of conducting agricultural activity against the background of high level of unemployment and external work migration.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 31—37

Key words: brucellosis epidemiology, brucellosis epizootology, social risk factors, brucellosis control

## ВВЕДЕНИЕ

Среди стран, где в совокупности ежегодно регистрируется до 500 тыс. впервые выявленных случаев бруцеллеза, Республика Таджикистан по частоте и уровню заболеваемости занимает лидирующую позицию [9]. Значительное обострение ситуации по бруцеллезу в Таджикистане, также как и в других странах постсоветского пространства, произошло в начале 90-х годов прошлого века. Вследствие резкого слома политической и социально-экономической системы, оттока основного поголовья сельскохозяйственных животных из коллективных в мелкие индивидуальные хозяйства, а также неадекватно проводимых профилактических, противозооэпидемических и противозооцических мероприятий бруцеллез приобрел характер эпидемического распространения [3].

Действие социальных факторов риска, таких как активная миграция населения, ввоз и передвижение животных из неблагополучных по бруцеллезу регионов, в основном из сопредельных государств и др., еще больше осложнило ситуацию по бруцеллезу в Таджикистане, определило ее современные особенности [5, 7]. В данной статье приводятся результаты изучения эпизоотолого-эпидемиологических особенностей бруцеллеза на территории Республики Таджикистан в условиях продолжающихся социально-экономических преобразований с оценкой широты и масштабов его распространенности, а также причин сложившейся ситуации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами исследования послужили данные официальной статистики, результаты экспертных оценок, отчеты, аналитические материалы национальных и международных организаций, результаты лабораторных исследований проб, полученных от людей, животных, из объектов внешней среды в период с 2000 по 2013 гг.

Клинико-эпидемиологический анализ бруцеллеза среди больных, госпитализированных в инфекционные отделения городских и областных больниц Хатлонской области и г. Душанбе, проводили ретроспективно за 2012 — 2013 гг. Истинная распространенность бруцеллеза среди населения горных и равнинных кишлаков Хатлонской области изучалась на основе результатов выборочных исследований. Подворными обходами было охвачено 769 хозяйств с населением 6628 человек, из них 541 человек с клиническими проявлениями бруцеллеза были обследованы лабораторно с применением реакций Хеддльсона и Райта. Положительным считали титр антител 1:200 и более.

Определение территорий риска проводили путем районирования Республики

Таджикистан по показателю риска инфицирования населения бруцеллезом (РИНБ), вычисленному по методике А.И. Кологорова с соавт. (1992):  $A=a-(t:T)$ , где: А — показатель риска инфицирования, а — средний интенсивный показатель заболеваемости, t — число лет регистрации бруцеллеза на конкретной территории, Т — продолжительность изучаемого периода.

Уровень экономического ущерба определяли на основе расчета индекса DALY (потенциально потерянные годы жизни из-за преждевременной смерти или нетрудоспособности) по методике ВОЗ [8]. Из-за отсутствия достоверных данных о заболеваемости хроническим бруцеллезом расчеты проводились на основе числа зарегистрированных случаев острого бруцеллеза с учетом показателя ВВП на душу населения в 2012 г., опубликованного Всемирным Банком.

Оценку эпизоотологической ситуации проводили на основе изучения распространенности бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных по показателю серопревалентности, выявленному по результатам многолетних выборочных серологических исследований.

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием методов биостатистики, которые включали определение средней арифметической, медианы, стандартных ошибок и доверительных интервалов сравниваемых средних величин с помощью компьютерных программ Social Science Statistics и Microsoft Excel. Степень достоверности сравниваемых средних величин оценивали с помощью t-критерия, где разность результатов считалась статистически значимой при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ социально-экономической и демографической ситуации показал, что 36% 8 млн населения страны моложе 15 лет, около 74% проживают в сельской местности и 60% населения занято в сельскохозяйственном секторе [1]. При доле женщин (50,5%) отмечается незначительный темп ежегодного прироста населения, который составляет не более 2%. Низкие объем ВВП и уровень доходов на душу населения, а также высокий уровень безработицы способствовали активной внешней трудовой миграции. Отток преимущественно мужского трудоспособного населения, составивший более 1 млн человек, усугубил и без того непростую социальную и демографическую ситуацию в стране [2, 4].

Условия формирования рыночной экономики и приватизация государственных животноводческих хозяйств способствовали переходу основного поголовья скота из общественных хозяйств в частные, что, в свою очередь, привело к бесконтрольному увеличению числа лиц, занимающихся передвижением, а также широкой оптовой и розничной торговлей скотом, обусловивших смешивание поголовья, в том числе больного бруцеллезом.

Проведенное исследование показало, что бруцеллез по-прежнему остается значимой для Республики Таджикистан проблемой. Так, индекс DALY по данным 2012 г. составил 1893 потерянных потенциальных лет жизни, а потери потенциального ВВП — более 1,6 млн долларов США. Однако реальный экономический ущерб намного выше, так как в большинстве случаев бруцеллез диагностируется в подострой и хронической форме, что подтверждено полученными клинико-эпидемиологическими данными. Показано, что от 70 до 95% госпитализированных в областные инфекционные больницы находились на лечении с впервые установленным диагнозом «хронический бруцеллез», что свидетельствует о проблемах в диагностике.

Оценка эпидемиологической ситуации показала, что средний уровень заболеваемости бруцеллезом в Республике Таджикистан по данным статистического наблюдения составил 14 случаев на 100 тыс. населения.

Выявленные в динамике высокие интенсивные показатели заболеваемости



населения, регистрируемые вплоть до 2006 г., демонстрируют неэффективность проводившихся противобруцеллезных мероприятий, а постепенное снижение заболеваемости, начавшееся с 2007 г., связано с реализацией программы массовой вакцинации мелкого рогатого скота (МРС) [10].

Между тем, реальный уровень заболеваемости населения бруцеллезом многократно превосходит приводимые цифры. Так, проведенные выборочные исследования, направленные на активное выявление случаев бруцеллеза, показали, что уровень заболеваемости в кишлаках Хатлонской области составил 1358 на 100 тыс. населения, что в 65 раз выше официально регистрируемого.

В динамике также выявлены изменения структуры заболеваемости населения, характера сезонных и территориальных проявлений эпидемического процесса, обусловленные преимущественно действием социальных факторов риска. Так, смена условий хозяйствования, а также демографические сдвиги отразились на возрастной структуре заболевших бруцеллезом, которая в настоящее время характеризуется широким вовлечением в эпидемический процесс лиц молодого трудоспособного возраста от 15 до 49 лет (79%), преимущественно женщин (56%) ( $p < 0,05$ ).

Полученные результаты диктуют необходимость пересмотра традиционного отношения к группам риска инфицирования бруцеллезом на территории Республики Таджикистан, к которым наряду с профессиональными контингентами в настоящее время следует относить домохозяек, а также детей и подростков, доля которых в структуре заболевших составила 28 и 30% соответственно.

Выявленный высокий удельный вес школьников и дошкольников (14%,  $p < 0,05$ ) свидетельствует о наличии тесных контактов детей с инфицированными животными, происходящих при уходе за животными и их выпасе. Увеличение доли неработающих (12%) и служащих (7%) в структуре заболевших бруцеллезом также имеет социально-экономические корни и связано с высоким уровнем безработицы, низкой заработной платой, послуживших причиной для разведения сельскохозяйственных животных как источника дохода семей. Действительно, в частных животноводческих и личных подсобных хозяйствах сконцентрировано до 73% молочно-товарного и овце-товарного производства Республики Таджикистан.

Таким образом, эпидемический процесс бруцеллеза на территории Республики Таджикистан в последние годы характеризовался преимущественно непрофессиональным заражением, а его тип сменился с сельскохозяйственного на бытовой, точнее, на приусадебный [6].

Изменения во внутригодовой динамике заболеваемости населения бруцеллезом, как показало исследование, обусловлено действием природно-климатических и в большей степени социальных факторов, таких как практика разведения сельскохозяйственных животных. В растущих из года в год личных хозяйствах все чаще используется стойловое содержания скота, что способствует внесезонным случаям животных и влияет на сезонные проявления бруцеллеза у людей. Выраженная весенне-летняя сезонность (март — июль) свидетельствует о доминировании козье-овечьих очагов.

Проведенный анализ территориального распределения заболеваемости бруцеллезом населения Республики Таджикистан показал, что 90% административных образований представляют собой эндемичные территории с разным риском инфицирования. Показатели заболеваемости колебались от 12 на 100 тыс. населения в Хатлонской области до 41 на 100 тыс. в Горно-Бадахшанской автономной области.

Установлено, что высокий уровень риска инфицирования бруцеллезом (РИНБ) характерен для 14 из 65 административных образований Республики Таджикистан. Остальные территории имеют средние, умеренные и низкие значения РИНБ.

Максимально вовлеченными в эпидемический процесс бруцеллеза остаются территории, расположенные в равнинном поясе (66%). Для них характерна тенденция, вектор которой направлен в сторону уменьшения РИНБ — большинство районов относились к группе с низким РИНБ (31%).

Географическое расположение, климатические и ландшафтные особенности Таджикистана способствуют ведению многоотраслевого животноводства, имеющего свои характерные особенности с преобладанием овцеводства и связанной с ним отгонно-пастбищной системой, сезонными перегонами стад на пастбища и в места зимовки. Отсутствие четких графиков перегона скота, несоблюдение границ маршрутов перегона, отсутствие ветеринарных постов и неясность прав хозяйствующих субъектов в пользовании естественными пастбищами способствовали интенсивному контакту и смешиванию стад. Все это в совокупности создало условия, при которых изолированный перегон и выпас скота стали невозможными. В результате изменились проявления эпизоотического процесса бруцеллеза.

Как показало исследование, бруцеллез широко распространен среди сельскохозяйственных животных — среднемноголетние показатели серопревалентности МРС составили 0,3%, крупного рогатого скота (КРС) — 0,14%. Максимальный уровень серопревалентности выявлен на территориях районов республиканского подчинения — 1,6% среди МРС и 2% среди КРС, в Хатлонской области — 0,5 и 1,6% соответственно, а также в районах Файзабад, Бохтар и г. Душанбе, где средние показатели колебались от 1,4 до 5,1%.

При изучении причин сложившейся ситуации установлено, что за последние 14 лет в Республике Таджикистан наблюдался значительный прирост поголовья КРС и, особенно, МРС, численность которого выросла в 2 и 2,2 раза соответственно. Большая часть поголовья МРС (71,5%) и КРС (69%) сконцентрирована в районах Хатлонской и Согдийской областей, где имеются предпосылки для выпаса скота и развита инфраструктура для перегона и содержания животных в зимний период в виде скотопрогонных трасс и подкормочных площадок. Деградикация пастбищных угодий из-за интенсивного выпаса поголовья и отсутствия контроля за использованием и поддержанием растительного потенциала пастбищ привела к дефициту кормовой базы, что также способствовало развитию эпизоотического процесса бруцеллеза. К 2013 г. 79% поголовья КРС и 66% поголовья МРС принадлежали частным владельцам, и эти показатели с каждым годом увеличиваются. Особенно велика доля частного животноводства в Горно-Бадахшанской автономной области, где учтено 94% поголовья КРС и 89% МРС. Именно на этой территории наблюдался наиболее интенсивный прирост поголовья МРС и наиболее выраженный рост заболеваемости населения. В Хатлонской области, как показало исследование, поголовье КРС выросло в 10,2 раза, при этом большинство кишлаков были неблагополучными по бруцеллезу (64,1%). Высокие показатели серопревалентности, выявленные в пригородных кишлаках (МРС — 6,7%, КРС — 2,3%), свидетельствуют о существовании потенциального риска инфицирования городского населения.

В районах Бохтар, Вахдат, Рудаки, г. Турсунзаде, г. Душанбе высокая серопревалентность сельскохозяйственных животных ассоциируется с сосредоточением в них базаров с перекупщиками и продавцами скота из разных регионов страны, что способствует частым контактам здоровых животных с больными. К тому же, эти базары являются основными поставщиками сырого мяса и мясных продуктов на многочисленные рынки крупных городов.

Неблагополучная ситуация по бруцеллезу усугубляется выявленными проблемами эпизоотолого-эпидемиологического надзора и контроля. Так, ослабление потенциала ветеринарной службы привело к потере ее мобильности, отсутствию координации действий и дефициту лечебно-профилактических средств, в частности, для регулярной вакцинации животных. Так, охват вакцинацией животных

в период 2000 — 2012 гг. составил всего 8% для МРС и 1,3% для КРС при приросте поголовья на 6 и 5% соответственно. На фоне широко распространенной практики уличной продажи молока, мяса и мясо-молочных продуктов значительно ослаб контроль на рынках и объектах общественного питания (с 2000 по 2012 гг. исследовано всего 137 проб молока). Практически не исследуется абортированный материал от животных, а охват поголовья серологическими исследованиями ежегодно не превышает 20 %.

При расследовании очагов бруцеллеза отсутствует должная координация между специалистами ветеринарной и санитарно-эпидемиологической служб. Проблемы эпидемиологического надзора связаны также со слабым материально-техническим оснащением санитарно-эпидемиологической службы и его центров, нехваткой кадров, низким уровнем профессиональной подготовки специалистов и информированности населения. Недостаточное обеспечение надзора приводит к низкому качеству его информационного обеспечения, отсутствию полного и своевременного выявления, учета и регистрации случаев бруцеллеза в учреждениях первичной медико-санитарной помощи и лабораториях центров государственного санитарно-эпидемиологического надзора.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Современная эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Республике Таджикистан характеризуется выраженным неблагополучием. Действующие социальные и природные условия способствуют сохранению стойкой циркуляции возбудителя среди сельскохозяйственных животных (средние значения серопревалентности среди МРС — 0,3%, КРС — 0,14%) и высокой заболеваемости населения, среднемноголетний уровень которой по данным официальной статистики составил 14 случаев на 100 тыс. населения.

К особенностям современной эпидемиологической ситуации относятся: значительный рост заболеваемости и, как следствие, медико-социального и экономического ущерба, наносимого впервые выявленным острым бруцеллезом (по индексу DALY); увеличение в структуре заболеваемости доли хронических форм инфекции (до 95% от числа госпитализированных); изменение характера внутригодовой динамики заболеваемости со смещением ее максимума с июня на май; преимущественное вовлечение в эпидемический процесс женщин (56%), в т.ч. домохозяйек (28%), трудоспособного возраста (83%), а также детей и подростков (30%).

Эпизоотологическая ситуация характеризуется широким распространением бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных, преимущественно МРС, содержащихся в общественных и частных животноводческих хозяйствах ( $0,3 \pm 0,1$  и  $0,2 \pm 0,16\%$  соответственно) на территориях всех климатических зон, включая горные и предгорные районы, природно-ландшафтные условия которых пригодны для выпаса, перегона и зимовки скота. Максимальный уровень серопревалентности выявлен на территориях районов республиканского подчинения (1,6% среди МРС и 2% среди КРС), в Хатлонской области (0,5 и 1,6%), а также в районах Файзабад, Бохтар и г. Душанбе, где показатели колеблются от 1,4 до 5,1%.

На территории Республики Таджикистан выявлены четыре группы районов, характеризующихся высокими (24,5 — 62,4), средними (8,0 — 22,2), умеренными (3,7 — 7,8) и низкими (до 3,15) показателями РИНБ. Максимально вовлеченными в эпидемический процесс остаются территории, расположенные в равнинном поясе (66%), относящиеся преимущественно к группе с низким РИНБ (31%). Высокий риск характерен для высокогорного пояса (25%).

Основные факторы эпизоотолого-эпидемиологического неблагополучия по бруцеллезу детерминированы социально-экономической ситуацией и выражаются в изменении условий ведения сельскохозяйственной деятельности на фоне

высокого уровня безработицы и внешней трудовой миграции. Рост частных животноводческих хозяйств, увеличение количества населения, имеющего скот в личных подворьях, преимущественно стойловое содержание животных, отсутствие государственного регулирования в сфере животноводства и низкое качество профилактических мероприятий приводят к формированию эпизоотических очагов бруцеллеза и инфицированию людей в них.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агентство по статистике при президенте Республики Таджикистан. Режим доступа: <http://www.stat.tj/ru/database/socio-demographic-sector>.
2. Доклад о человеческом развитии в Центральной Азии. В будущее без барьеров. Региональное бюро ПРООН по странам Европы и Содружества Независимых Государств, 2005. Режим доступа: [http://www.un.org/ru/development/hdr/central\\_asia\\_2005.pdf](http://www.un.org/ru/development/hdr/central_asia_2005.pdf).
3. Желудков М.М. Бруцеллез в России: современная эпидемиология и лабораторная диагностика. Автореф. дис. докт. мед. наук. М., 2009.
4. Панарин С.А. Перспективы миграции коренных народов Центральной Азии в Россию: основные стимулы и ограничители. Сб. науч. трудов. Новосибирск, 2003.
5. Турдиев Ш.А. Усовершенствование мер борьбы с бруцеллезом мелкого рогатого скота в Республике Таджикистан. Автореф. дис. докт. биол. наук. Казань, 2013.
6. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. М., Медицина, 2001.
7. Corbell M.J. Brucellosis in humans and animals. WHO, FAO, OIE, 2006.
8. Mathers C., Vos Th., Lopez, A. et al. National burden of disease studies: a practical guide. WHO, 2001.
9. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N. et al. The new global map of human brucellosis. Lancet. Infectious diseases. 2006, 6: 91-99.
10. Ward D., Jackson, R., Karomatullo H. et al. Brucellosis control in Tajikistan using Rev 1 vaccine: change in seroprevalence in small ruminants from 2004 to 2009. Veterinary Record. 2012, 170 (4): 100-106.

Поступила 07.12.15

Контактная информация: Симонова Елена Геннадиевна, д.м.н., проф., 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр.2, р.т. (495)687-40-35

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*В.С.Караваяев<sup>1</sup>, Е.С.Олейникова<sup>1,2</sup>, М.Ш.Азаев<sup>2</sup>, А.Б.Беклемишев<sup>1</sup>*

#### **ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМЕРНОГО ПОЛИПЕПТИДА OspC<sub>gar+afz</sub> ИЗОЛЯТОВ BORRELIA GARINII И V.AFZELII**

<sup>1</sup> НИИ биохимии, Новосибирск; <sup>2</sup> ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область

*Цель.* Сравнительное исследование антигенных свойств рекомбинантных белков OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub> и рекомбинантного химерного полипептида OspC<sub>gar+afz</sub>, содержащего аминокислотные последовательности зрелых иммунодоминантных белков OspC западно-сибирских изолятов *Borrelia garinii* (OspC<sub>gar</sub>) и *V.afzelii* (OspC<sub>afz</sub>), и оценка возможности их использования в качестве антигенов при создании тест-систем для серодиагностики Лайм-боррелиоза (ЛБ) на территории Западной Сибири. *Материалы и методы.* Рекомбинантный химерный полипептид OspC<sub>gar+afz</sub> и рекомбинантные зрелые белки OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub>, полученные экспрессией соответствующих генов в клетках *Escherichia coli*, очищали аффинной хроматографией на колонке с Ni-NTA сепарозой CL-6B и исследовали методом ИФА на способность связывать антитела сывороток больных ЛБ. *Результаты.* Показано различие в чувствительности определения методом ИФА специфических к боррелиям IgM и IgG в сыворотке крови больных ЛБ с локализованной стадией заболевания при использовании в качестве антигенов OspC<sub>gar</sub>, OspC<sub>afz</sub> и химера OspC<sub>gar+afz</sub>.

Установлено, что химерный антиген  $OspC_{gar+afz}$  проявлял более высокую антигенную активность, чем в отдельности каждый из антигенов  $OspC_{gar}$  или  $OspC_{afz}$ . **Заключение.** Результаты исследования позволяют рассматривать рекомбинантный химерный полипептид  $OspC_{gar+afz}$  как возможный компонент при создании тест-систем для серодиагностики ЛБ на территории Западной Сибири.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 37—44

Ключевые слова: Лайм-боррелиоз, рекомбинантные белки  $OspC$ , *Borrelia burgdorferi* s.l., ИФА анализ, серодиагностика

V.S.Karavaev<sup>1</sup>, E.S.Oleinikova<sup>1,2</sup>, M.Sh.Azaev<sup>2</sup>, A.B.Beklemishev<sup>1</sup>

## IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF RECOMBINANT CHIMERIC POLYPEPTIDE $OspC_{gar+afz}$ OF *BORRELIA GARINII* AND *B. AFZELII* ISOLATES

<sup>1</sup>Research Institute of Biochemistry, Novosibirsk; <sup>2</sup>State Scientific Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

**Aim.** Comparative study of antigenic properties of recombinant proteins  $OspC_{gar}$  and  $OspC_{afz}$  and recombinant chimeric polypeptide  $OspC_{gar+afz}$ , that contains amino acid sequences of mature immune dominant  $OspC$  proteins of West-Siberian isolates of *Borrelia garinii* ( $OspC_{gar}$ ) and *B. afzelii* ( $OspC_{afz}$ ), and evaluation of possibility of their use as antigens during creation of test-systems for serodiagnostics of Lyme borreliosis (LB) on the territory of Western Siberia. **Materials and methods.** Recombinant chimeric polypeptide  $OspC_{gar+afz}$  and recombinant mature proteins  $OspC_{gar}$  and  $OspC_{afz}$ , obtained by expression of the corresponding genes in *Escherichia coli* cells, purified by affinity chromatography in Ni-NTA-sepharose CL-6B and studied by EIA method for the ability to bind antibodies from sera of LB patients. **Results.** A difference in sensitivity of determination by EIA method of specific IgM and IgG against borreliae in blood sera of LB patients with localized stage of the disease during use of  $OspC_{gar}$ ,  $OspC_{afz}$  and  $OspC_{gar+afz}$  chimeric antigens was shown. Chimeric antigen  $OspC_{gar+afz}$  was established to show higher antigenic activity compared with each of the  $OspC_{gar}$  or  $OspC_{afz}$  antigens separately. **Conclusion.** The results of the study allow to examine the recombinant chimeric polypeptide  $OspC_{gar+afz}$  as a possible component during creation of test-systems for serodiagnostics of LB on the territory of West Siberia.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 37—44

Key words: Lyme borreliosis,  $OspC$  recombinant proteins, *Borrelia burgdorferi* s.l., EIA analysis, serodiagnostics

## ВВЕДЕНИЕ

Лайм-боррелиоз (ЛБ) — наиболее распространенное зоонозное природно-очаговое заболевание в странах Европы, Азии и Северной Америки, связанное с клещами рода Ixodes. Возбудителями ЛБ у человека являются спирохеты, относящиеся к комплексу *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.). Возбудители боррелиозов неоднородны в своей генетической основе. По отличиям в нуклеотидных последовательностях ДНК боррелий выделяют 18 геновидов спирохет, входящих в состав комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l., из которых преимущественно только 3 геновида (*B. burgdorferi sensu stricto*, s.s.), *B. garinii* и *B. afzelii*) являются патогенными для человека [15]. В России ЛБ связан, в основном, с двумя геновидами боррелий — *B. garinii* и *B. afzelii*, которые являются основными сочленами боррелиозных паразитарных систем [4].

По уровню заболеваемости и тяжести клинического течения ЛБ представляет собой одну из наиболее актуальных проблем современной инфекционной пато-

логии. По данным официальной статистики, ежегодно в течение последних 10 лет количество заболевших ЛБ в России колеблется от 7 до 9 тысяч. При этом большая часть случаев данного заболевания регистрируется на основе эпидемиологического анамнеза (присасывание клеща) и наличия клинической симптоматики (мигрирующая эритема). Установление клинического диагноза представляет определенные трудности из-за полиморфизма клинических проявлений с поражением многих органов и систем и органных поражений при ЛБ [12], а также наличием сопутствующих инфекций, возбудители которых переносятся иксодовыми клещами (анеплазмоз, бабезиоз, вирусный клещевой энцефалит и другие) [18]. Диагностика ЛБ обычно основывается на клинических признаках, но часто требует обязательного подтверждения лабораторными методами. В клинической практике основным серологическим тестом на ЛБ является метод иммуноферментного анализа с использованием различных комбинаций высокоспецифичных иммунодоминантных белков боррелий или их полипептидных фрагментов, не содержащих участков аминокислотной цепи, гомологичных антигенным детерминантам других микроорганизмов [8, 18]. Серодиагностика ЛБ существенно осложняется высокой генетической гетерогенностью возбудителей и, как следствие этого, антигенными отличиями между изолятами боррелий, циркулирующими в различных географических регионах.

Известно, что диагностическая ценность препаратов во многом определяется антигенами, используемыми в качестве иммуносорбента. Многие исследователи для улучшения серодиагностики Лайм-боррелиоза предлагают использовать в составе диагностических тестов антигены, свойственные геновидам *B.burgdorferi* s.l., распространенным в конкретном регионе [3, 7, 14].

Принципиально новым подходом по повышению диагностической чувствительности и специфичности лабораторных методов (иммуноферментного анализа, вестерн-блот анализа и иммунохроматографического анализа) является получение и использование для диагностики ЛБ полипептидов, содержащих эпитопы различных гомологичных или гетерологичных иммунодоминантных белков спирохет комплекса *B.burgdorferi* s.l. [8, 9, 18].

Цель настоящей работы — исследование антигенных свойств рекомбинантного химерного полипептида  $OspC$  ( $OspC_{gar+afz}$ ), содержащего аминокислотные последовательности полноразмерных зрелых иммунодоминантных белков  $OspC$  западно-сибирских изолятов *B.garinii* ( $OspC_{gar}$ ) и *B.afzelii* ( $OspC_{afz}$ ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве антигенов для ИФА использовали рекомбинантный химерный полипептид  $OspC_{gar+afz}$ , а также рекомбинантные белки  $OspC$  геновида *B.garinii* подгруппы 20047<sup>T</sup> ( $OspC_{gar}$ ) и  $OspC$  геновида *B.afzelii* ( $OspC_{afz}$ ) с молекулярной массой 40,8; 20 и 19 кДа, соответственно. Изоляты спирохет были получены из клещей, отловленных в лесопарковой зоне Новосибирска [5]. Препараты ДНК изолятов были использованы для амплификации методом ПЦР кодирующих областей генов белков  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$ . Ампликоны генов  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  и химерный ген  $OspC_{gar+afz}$  клонировали в клетках *E.coli* штамма BL21(DE3) в составе модифицированного экспрессирующего вектора pETm, как описано ранее [1, 6]. Выделение и очистку рекомбинантных белков осуществляли с помощью аффинной хроматографии лизата клеток *E. coli* на колонке с Ni-NTA сефарозой CL-6B. Количество белка определяли методом Лоури, используя для построения калибровочной кривой бычий сывороточный альбумин и IgG собаки. Чистота рекомбинантных белков по данным SDS составляла не менее 90%. Антигены хранили в буферном растворе, содержащем 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5; 300 мМ NaCl; 20 мМ 2-меркаптоэтанол и 0,05%  $NaN_3$ .

В работе использовали панель положительных сывороток (n=48), состоящую

из сывороток крови больных ЛБ с локализованной стадией заболевания. Образцы сывороток больных ЛБ были получены из инфекционной клинической больницы №1 и областного диагностического центра Новосибирска. Диагноз ЛБ был установлен на основе анамнеза (укус клеща), наличия мигрирующей эритемы, данных клинического обследования. Диагноз ЛБ лабораторно подтвержден ИФА с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем «ЛаймБест-IgM» и «ЛаймБест-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). При комплексном исследовании сывороток больных ЛБ методом ИФА не обнаружено специфических иммуноглобулинов класса М или G к спирохетам *Treponema pallidum* и вирусу клещевого энцефалита. Образцы сывороток собраны в период с 3 по 8 неделю после начала заболевания. Для определения неспецифических перекрестных реакций использовали панель отрицательных сывороток, включающую сыворотки здоровых доноров ( $n=30$ ), больных сифилисом ( $n=20$ ) и ревматоидным артритом ( $n=12$ ). Все сыворотки до исследования хранили при температуре минус  $70^{\circ}\text{C}$ .

Для оценки антигенной активности и специфичности  $\text{OspC}_{\text{gar}+\text{afz}}$ ,  $\text{OspC}_{\text{gar}}$  и  $\text{OspC}_{\text{afz}}$  использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа. Постановку IgM-ИФА и IgG-ИФА осуществляли в оптимальных для каждого из антигенов режимах по ранее описанной методике [2]. Выбор оптимальной концентрации антигенов проводили, исследуя взаимодействия их различных разведений с полистироловым носителем, с последующей регистрацией результатов ИФА с панелью сывороток больных ЛБ (положительный контроль Р) ( $n=10$ ). В качестве отрицательного контроля (N) использовали панель сывороток здоровых доноров ( $n=10$ ). За оптимальную концентрацию для каждого антигена принимали такую, при которой наблюдалось наибольшее различие в показателях оптической плотности положительного и отрицательного контроля, что соответствовало наибольшему значению их отношения (P/N). Параметр Р определяли как среднее арифметическое для положительных сывороток, а значение N как среднее арифметическое для отрицательных сывороток. Исследуемые белки использовали в концентрации от 1 — 4 мкг/мл, достаточной для эффективной сорбции на полистироле. Для определения специфического комплекса антиген-антитело использовали пероксидазные конъюгаты на основе мышиных моноклональных антител против IgM и IgG человека. Рабочие разведения этих реагентов составили: для анти-IgM 1:3000, для анти-IgG 1:4000.

Для подсчета критической оптической плотности ( $\text{ОП}_{\text{крит}}$ ) использовали 30 отрицательных образцов сывороток здоровых доноров.  $\text{ОП}_{\text{крит}}$  устанавливали статистически как среднее значение ОП для группы здоровых доноров и 2 стандартных отклонений, что соответствовало верхней границе 95% доверительного интервала для возможных значений показателя. Исходя из критических величин ОП с каждым из антигенов проводился анализ результатов тестирования исследуемых сывороток. Образцы считали положительными, если результат превышал пороговое значение  $\text{ОП}_{\text{крит}}$  в двух из трех независимых экспериментов. Для проверки точности экстраполирования результатов ИФА все образцы сывороток были протестированы с каждым из 3 антигенов одновременно.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Excel для Windows XP. Определение величин среднеквадратической ошибки и другие определения достоверности результатов измерения проводили по критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В наших работах было детально описано получение клонов *E. coli*, продуцирующих рекомбинантные антигены  $\text{OspC}_{\text{gar}}$  и  $\text{OspC}_{\text{afz}}$  [5, 6], а также химерный полипептид  $\text{OspC}_{\text{gar}+\text{afz}}$  [1].



Антигенные свойства и специфичность  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  оценивали методом ИФА по их способности взаимодействовать с антителами сывороток крови больных ЛБ, здоровых доноров, больных сифилисом и ревматоидным артритом. Результаты ИФА образцов сывороток больных ЛБ по выявлению специфических IgM и IgG к  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$ , приведены в табл. 1.

При тестировании сывороток больных ЛБ на наличие специфических IgM и IgG к антигенам  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  положительные результаты получены с одним или несколькими антигенами. По результатам исследований в IgM ИФА и IgG ИФА сывороток больных ЛБ наивысшую антигенную активность определяли с  $OspC_{gar+afz}$  антигеном (60,4 и 66,6%, соответственно). Показано, что антигенная активность  $OspC_{gar}$  при выявлении специфических IgM и IgG была несколько выше, чем у  $OspC_{afz}$  антигена. Специфические IgM к  $OspC_{gar}$  антигену выявлены в 25 (52,1%) исследованных сыворотках и в 20 (41,7%) сыворотках к  $OspC_{afz}$  антигену. Результаты использования в ИФА рекомбинантного химерного полипептида  $OspC_{gar+afz}$  в качестве антигена позволили определить максимальное количество положительных сывороток больных ЛБ, в том числе, в сыворотках больных ЛБ, содержащих антитела к  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  антигенам на подпороговом значении ОП (в силу суммирования оптической плотности).

Специфичность  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  оценивали по результатам исследования контрольных отрицательных сывороток (здоровых доноров, больных сифилисом и ревматоидным артритом) в IgM ИФА и IgG ИФА (табл. 1). Сыворотки здоровых доноров (n=30) и больных сифилисом (n=20) были отрицательными со всеми антигенами. С антигенами  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  сыворотки больных ревматоидным артритом реагировали крайне редко.

По результатам исследования методом ИФА сывороток больных ЛБ и здоровых доноров на наличие специфических IgM и IgG к  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  антигенам была создана экспериментальная панель положительных (n=12) и отрицательных сывороток (n=12). Экспериментальная панель положительных сывороток состояла из образцов сывороток больных ЛБ, содержащих специфические IgM и IgG к исследуемым белкам. Экспериментальная панель отрицательных сывороток составлена из образцов сывороток доноров, не содержащих специфических IgM и IgG к исследуемым белкам. С использованием экспериментальной панели положительных и отрицательных сывороток для каждого антигена определены средние арифметические значения оптической плотности положительных (ОПср+) и отрицательных (ОПср-) сывороток, а также отношение средних арифметических значений оптической плотности положительных и отрицательных сывороток (ОПср+/ОПср-), что позволило оце-

Таблица 1. Данные по выявлению в сыворотках больных ЛБ и контрольных сыворотках специфических IgM и IgG к рекомбинантным белкам *B.burgdorferi* s.l. в ИФА

Антигены	Количество положительных сывороток (%)			
	IgM абс. (%)		IgG абс. (%)	
	ЛБ (n=48)	БРА (n=12)	ЛБ (n=48)	БРА (n=12)
$OspC_{gar}$	25 (52,1)	1 (8,3)	22 (45,8)	1 (8,3)
$OspC_{afz}$	20 (41,7)	1 (8,3)	18 (37,5)	1 (8,3)
$OspC_{gar+afz}$	29 (60,4)	1 (8,3)	32 (66,6)	1 (8,3)

Примечание. n — количество исследуемых образцов сывороток, ЛБ — больные Лайм-боррелиозом с мигрирующей эритемой, БРА — больные ревматоидным артритом.

Таблица 2. Показатели абсолютной чувствительности рекомбинантных белков *B.burgdorferi* s.l. в ИФА по экспериментальной панели сывороток

Оптическая плотность	Рекомбинантный белок		
	$OspC_{afz}$	$OspC_{gar}$	$OspC_{gar+afz}$
При пределении IgM	2,0±0,02	2,26±0,21	2,5±0,04
При пределении IgG	2,1±0,03	2,3±0,21	2,7±0,22

Примечание. Кл — показатель абсолютной чувствительности, равный отношению ОПср+/ОПср-.

нить степень абсолютной чувствительности антигенов. При сравнительной характеристике антигенов предпочтение отдавалось тем из них, которые давали наибольшее значение отношения ОП положительного и отрицательного контроля (табл. 2). Показано, что антиген  $OspC_{gar+afz}$  имеет самый высокий показатель отношения ОП положительного и отрицательного контроля, по сравнению с  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$ , а значит, и большую абсолютную чувствительность. Таким образом, установлено, что  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  реагируют с поликлональными IgG и IgM сывороток пациентов с заболеваниями, вызванными ЛБ. Проведен сравнительный анализ антигенных свойств рекомбинантного химерного полипептида  $OspC_{gar+afz}$  и рекомбинантных белков  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  с использованием панели сывороток больных ЛБ. На основании полученных данных можно сделать вывод о возможности использования рекомбинантного химерного полипептида  $OspC_{gar+afz}$  для серодиагностики ЛБ.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным,  $OspC$  — один из наиболее важных иммунодоминантных белков, используемых в составе тест-систем для лабораторной диагностики ИКБ [10, 18]. Белок  $OspC$  индуцирует гуморальный иммунный ответ на ранних стадиях инфекции и присутствует во всех без исключения патогенных штаммах *V. burgdorferi* s.l. [11]. Этот белок характеризуется высокой гетерогенностью аминокислотных последовательностей и, как следствие, высокой вариабельностью антигенных свойств. Различия наблюдаются не только между геновидами *V. burgdorferi* s.l. [13], но и внутри геновидов [17]. В наших работах [2, 6] показано, что при использовании в качестве антигенов рекомбинантных белков  $OspC$  геновида *V. garinii* и *V. afzelii* значительно повышается выявляемость заболеваемости ЛБ методом ИФА. Поскольку большинство диагностических иммуноферментных тест-систем основаны на композиции из трех-четырёх рекомбинантных антигенов, то в процессе сорбции антигенов между ними существует конкуренция за участки связывания с поверхностью лунок полистирольных планшет, что приводит к избытку сорбции одних и снижению доли других и, в свою очередь, негативно отражается на чувствительности и специфичности тест-систем. Одним из путей решения проблем неоднородной сорбции антигенов на твердом носителе является получение генно-инженерными методами химерных полипептидов, содержащих эпитопы 2 и более антигенов боррелий. Поэтому использование в тест-системах химерных антигенов, содержащих эпитопы нескольких гомологичных и гетерологичных видов иммунодоминантных белков, позволит существенно повысить результаты диагностики ЛБ.

Ранее нами были получены фрагменты кодирующих областей генов  $OspC$  изолятов *V. garinii* и *V. afzelii* и клонированы в клетках *E. coli* в составе вектора pETm [5, 6]. Установленные нуклеотидные последовательности фрагментов генов  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  западно-сибирских изолятов *V. burgdorferi* s.l. и кодируемые этими генами аминокислотные последовательности депонированы в GenBank под номерами  $OspC_{gar}$ -EU979626 и  $OspC_{afz}$ -EU979627, соответственно. При сравнительном структурном анализе гомология аминокислотных последовательностей двух рекомбинантных белков  $OspC$  изолятов *V. garinii* 20047<sup>T</sup> и *V. afzelii* составила 67%. Учитывая, что изоляты *V. garinii* и *V. afzelii* циркулируют на одной территории, выявленная гомология этих белков является достаточно низкой [6]. Низкая гомология аминокислотных последовательностей белков  $OspC$  боррелий является известным фактом, и по оценкам некоторых авторов достигает 60% [16]. Такие отличия в первичных структурах этих антигенов могут обуславливать наличие разных эпитопных детерминант белков и их различную иммунореактивность с сыворотками больных ЛБ.

Следует отметить, что химерный полипептид  $OspC_{gar+afz}$  и рекомбинантные белки  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$ , полученные экспрессией в клетках *E. coli* в составе модифицированного вектора pETm, не содержат протяженных чужеродных амино-

кислотных последовательностей, вследствие чего не дают неспецифических сигналов в иммуноферментных анализах. Это, в свою очередь, обеспечивает повышение специфичности диагностики ЛБ.

Проанализировав взаимодействия сывороток больных ЛБ с каждым рекомбинантным белком OspC мы обнаружили, что OspC<sub>gar</sub> выявляет антитела в сыворотках, которые не выявляются антигеном OspC<sub>afz</sub>, и наоборот. Причем, специфические IgM и IgG в части сывороток выявлялись к OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub> антигеном. Эти данные позволяют предположить, что, во-первых, несмотря на гетерогенность первичных структур рекомбинантные белки OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub> имеют общие эпитопы среди изолятов двух геновидов боррелий и, во-вторых, возможное инфицирование пациентов одновременно двумя геновидами (*B.afzelii* и *B.garinii*).

По результатам исследований отмечено, что специфические антитела к OspC<sub>gar+afz</sub>, OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub> определяются в сыворотках большинства больных ЛБ, что указывает на целесообразность их сочетанного применения в качестве иммуносорбента в иммуноферментных тест-системах. Необходимость такой комбинации объясняется антигенной мозаичностью боррелий, наличием анти-IgM и анти-IgG к OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub> при ЛБ и теми соображениями, что препараты, содержащие аналоги отдельных антигенных детерминант, не могут перекрыть весь спектр антител, вырабатываемых при ЛБ.

Следует отметить относительно высокую частоту положительных результатов при исследовании в ИФА сывороток больных ЛБ на наличие специфических IgM и IgG к OspC<sub>gar+afz</sub> антигену. Однако даже использование OspC<sub>gar+afz</sub> антигена не позволяет выявить все положительные сыворотки больных ЛБ. Иными словами, чем больше специфических антигенов будет вовлечено в исследование, тем выше будет надежность и достоверность такого анализа.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о повышенной антигенной активности рекомбинантного химерного полипептида OspC<sub>gar+afz</sub>, содержащего эпитопы западно-сибирских изолятов *B.garinii* и *B.afzelii*, и позволяют рассматривать этот полипептид в качестве перспективного компонента при создании тест-систем для серодиагностики ЛБ на территории Западной Сибири.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Беклемишев А.Б., Рябченко А.В., Караваев В.С. Патент 2514230 РФ. Рекомбинантные химерные полипептиды, несущие эпитопы различных иммунодоминантных белков спирохет комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*, и способ диагностики иксодового клещевого боррелиоза, опубликован 03.03.2014.
2. Караваев В.С., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б. Иммунохимический анализ рекомбинантных белков OspC западносибирских изолятов *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii*. Журн. микробиол. 2010, 1: 20-23.
3. Караваев В.С., Генина Е.С., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б. Значимость рекомбинантных белков западносибирских изолятов *Borrelia burgdorferi s.l.* для серодиагностики иксодового клещевого боррелиоза. Клинич. лаб. диагн. 2014, 6: 44-48.
4. Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Ковалевский Ю.В. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов в России. Паразитология. 2002, 36 (3): 177-187.
5. Рябченко А.В., Ивлева И.Н., Беклемишев А.Б. Комплексная оценка зараженности клещей *Ixodes persulcatus*, распространённых в рекреационной зоне новосибирского научного центра, спирохетами *Borrelia burgdorferi s.l.* Журн. инфекц. патол. 2004, 11 (3-4): 107-110.
6. Рябченко А.В., Караваев В.С., Беклемишев А.Б. Сравнительный структурный и иммунохимический анализ рекомбинантных антигенов OspC новосибирских изолятов спирохет *Borrelia garinii* и *B. afzelii*. Бюлл. Сибирского отделения РАМН. 2010, 2: 6-12.
7. Фоменко Н.В., Мельникова О.В., Черноусова Н.Я., Епихина Т.И. Выявление антител к боррелиям комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Бюлл. сибирской медицины. 2008, Прил. 1: 78-84.
8. Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P. Diagnosis of lyme borreliosis. Clin. Microbiol. Rev. 2005, 18 (3): 484-509.

9. Baranova E., Solov Ev P., Panfertsev E., Baranova A., Feduykina G., Kolombet L., Morshed M.G., Biketov S. Rational design of antigens to improve the serodiagnosis of tick-borne borreliosis in central regions of Russia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014, 807: 9-21.
10. Ivanova L., Christova I., Neves V. et al. Comprehensive seroprofiling of sixteen *B. burgdorferi* OspC: implications for Lyme disease diagnostics design. *Clin. Immunol.* 2009, 132 (3): 393-400.
11. Magnarelli L.A., Ijdo J.W., Padula S.J. et al. Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38 (5): 1735-1739.
12. Makhani N., Morris S.K., Page A.V. et al. A twist on Lyme: the challenge of diagnosing European Lyme neuroborreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49: 455-457.
13. Mathiesen M.J., Hansen K., Axelsen N. et al. Analysis of the human antibody response to outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, and *B. afzelii*. *Med. Microbiol. Immunol.* 1996, 85 (3): 121-129.
14. Mavin S., Evans R., Milner R.M. et al. Local *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* strains in a single mixed antigen improves western blot sensitivity. *J. Clin. Pathol.* 2009, 62: 552-554.
15. Stanek G., Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex—clinical significance of genomic species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011, 17 (4): 487-493.
16. Wang I.N., Dykhuezen D.E., Qiu W. et al. Genetic diversity of OspC in local population of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Genetics.* 1999, 151 (1): 15-30.
17. Wilske B., Jauris-Heipke S., Lobentanzer R. et al. Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33 (1): 103-109.
18. Wilske B.V., Fingerle U., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007, 49 (1): 13-21.

*Поступила 10.08.15*

Контактная информация: Караваев Виталий Семенович, к.м.н.,  
630117, Новосибирск, ул. академика Тимакова, 2, р.т. (383)332-56-58

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*А.А.Печельюк<sup>1</sup>, Ю.Н.Тараканова<sup>1</sup>, А.Д.Дмитриев<sup>1</sup>,  
Ю.С.Массино<sup>1</sup>, О.Л.Сегал<sup>1</sup>, В.Ф.Лавров<sup>1,2</sup>, Д.А.Дмитриев<sup>1</sup>*

## **АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IgY КУР В СЭНДВИЧ-МЕТОДЕ ТЕСТИРОВАНИЯ НВsAg**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Российская медицинская академия последипломного образования, Москва

*Цель.* Изучение антигенсвязывающей способности поликлональных антител (ПКА) кур по сравнению с моноклональными антителами (МКА) мышей на модели взаимодействия с НВsAg. *Материалы и методы.* Использовали мышинные МКА 18С8 и МКА F3/F4 (IgG), эффективные в иммуноферментном сэндвич-методе определения НВsAg (с минимальной детектируемой дозой 0,017 нг/мл), и аффинно-очищенные анти-НВsAg ПКА кур (IgY), полученные от двух иммунизированных птиц (ПКА №1 и ПКА №2). Способность антител связывать НВsAg оценивали по аналитической чувствительности (угловым коэффициентам кривых связывания) твердофазных иммуноферментных систем с использованием МКА мышей и ПКА кур. *Результаты.* В модельных опытах по связыванию меченого пероксидазой НВsAg ПКА № 2 обеспечивали после адсорбции на полистироловые планшеты статистически значимое 40% увеличение аналитической чувствительности, по сравнению с «эталонными» иммобилизованными МКА 18С8. Однако переход от модельных опытов к применению ПКА № 1 и ПКА № 2 в сэндвич-методе определения НВsAg вместо иммобилизованных МКА 18С8 или детектирующих МКА F3/F4 во всех случаях, напротив, приводил к снижению аналитической чувствительности. *Заключение.* Предположили, что меньшая гибкость ПКА кур может затруднять бивалентное взаимо-

действие в сэндвич-методе, приводя к образованию менее стабильных иммунных комплексов. Не отрицая ценности IgY для создания иммунохимических диагностических методов, данные факты и предположения указывают на необходимость более глубокого выяснения наилучших областей их применения.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 44—51

Ключевые слова: IgY кур, сэндвич-метод иммуноферментного анализа, аналитическая чувствительность, HBsAg

A.A.Pechelyulko<sup>1</sup>, Yu.N.Tarakanova<sup>1</sup>, A.D.Dmitriev<sup>1</sup>,  
Yu.S.Massino<sup>1</sup>, O.L.Segal<sup>1</sup>, V.F.Lavrov<sup>1,2</sup>, D.A.Dmitriev<sup>1</sup>

## ANALYSIS OF EFFECTIVENESS OF USING IgY FROM CHICKEN IN SANDWICH METHOD OF HBsAg TESTING

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Russian Medical Academy of Post-Graduate Education, Moscow, Russia

*Aim.* Study antigen-binding ability of polyclonal antibodies (PCA) of chicken compared with monoclonal antibodies (MCA) of mice in the model of interaction with HBsAg. *Materials and methods.* Mice MCA 18C8 and MKA F3/F4 (IgG) were used, effective in enzyme immunoassay sandwich method of HBsAg determination (with a minimal detection dose of 0.017 ng/ml), and affinity purified anti-HBsAg PCA of chicken (IgY), obtained from 2 immunized birds (PCA No. 1 and PCA No. 2). The ability of antibodies to bind HBsAg was evaluated by analytical sensitivity (slope of binding curve) of solid-phase enzyme immunoassay system using mice MCA and chicken PCA. *Results.* PCA No. 2 has provided a statistically significant 40% increase of analytical sensitivity, compared with «standard» immobilized MCA 18C8, in model experiments of binding of peroxidase-labeled HBsAg. However, transition from model experiments to use of PKA No. 1 and PKA No. 2 in sandwich method of determination of HBsAg instead of immobilized MCA 18C8 or detecting MCA F3/F4 in all the cases, on the contrary, resulted in a decrease of analytical sensitivity. *Conclusion.* A lower flexibility of chicken PCA was assumed to be able to impede bivalent interaction in sandwich method, resulting in formation of less stable immune complexes. Without challenging value of IgY for the creation of immunochemical diagnostic methods, these facts and assumptions indicate a necessity of a deeper elucidation of the best areas of their application.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 44—51

Key words: chicken IgY, enzyme immunoassay sandwich method, analytical sensitivity, HBsAg

## ВВЕДЕНИЕ

Использование поликлональных антител (ПКА) птиц (IgY) в иммунохимических исследованиях и при конструировании тест-систем, предназначенных для лабораторной диагностики инфекционных, в том числе, вирусных заболеваний — сравнительно новое и, как считается, перспективное направление иммунохимии, получившее название «IgY-технологии». Предполагается, что ПКА кур имеют ряд преимуществ по сравнению с антителами другой видовой специфичности. В частности, возникает возможность получения антител с эпитопной специфичностью, отличающейся от таковой у антител, получаемых у мышей, кроликов и других млекопитающих, эти антитела имеют низкую неспецифическую кроссреактивность с антигенами млекопитающих, включая человека. Кроме того, существенное значение имеет относительно невысокая стоимость метода их получения, а также биоэтические преимущества его использования — возможность получения значительного количества IgY из эмбрионов (яиц) птиц, не нанося страданий лабораторным животным [3, 8, 9]. За прошедшие годы опубликован

ряд сообщений об успешной разработке эффективных иммунохимических тест-систем для определения онкомаркеров, гормонов, бактериальных и вирусных антигенов с помощью куриных ПКА [8, 9]. Известно, что структура молекулы IgY существенно отличается от структуры IgG, в частности, антитела кур не имеют шарнирного участка, ввиду чего менее гибки, чем IgG. Можно предположить, что эти особенности строения при определенных условиях могут оказывать влияние на формирование иммунных комплексов [8]. Поэтому представляется необходимым более детальное изучение эффективности куриных ПКА в иммунохимических тестах, в частности, твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В настоящем исследовании данный вопрос анализировали с помощью сэндвич-метода определения поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). В качестве модели сравнения был выбран полученный нами ранее высокочувствительный иммуноферментный сэндвич-метод определения HBsAg с минимально детектируемой дозой антигена 0,017 нг/мл [1, 4]. В задачу работы входило выяснение вопроса о возможности замены одного из компонентов мышиных моноклональных антител (МКА) этого сэндвич-метода на ПКА кур без снижения его аналитической чувствительности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделенный из сыворотки крови HBsAg, экспрессированный в *Pichia pastoris* рекомбинантный HBsAg серотипа ауw (S-полипептид), рекомбинантный HBsAg, конъюгированный с пероксидазой хрена и раствор тетраметилбензидина (ТМБ) произведены НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород). Также использовали 96-луночные полистироловые планшеты «MaxiSorp» фирмы «Nunc» (Дания), стрептавидин-пероксидазу фирмы «Biosource» (США), LC-LC-биотин фирмы «Pierce» (США), BrCN фирмы «Fargmacia» (Швеция), другие реактивы фирмы «Sigma» (США).

Получение мышиных МКА описано нами ранее [1]. Используемые в настоящей работе МКА распознают как рекомбинантный, так и нативный HBsAg в реакции иммуноблоттинга и ИФА (формат сэндвич-метода) [1]. МКА получали из асцитной жидкости брюшной полости мышей и с помощью хроматографии на ДЕАЕ-сефарозе доводили до чистоты более 95% по описанной ранее методике [1, 5].

Для иммунизации кур использовали HBsAg, выделенный из сыворотки крови. Иммунизацию птиц проводили с интервалом 10 дней. Для первой иммунизации 0,75 мл раствора антигена (150 мкг) эмульгировали в 0,15 М NaCl с 0,75 мл полного адьюванта Фрейнда и подкожно вводили курам в 8 — 10 точек спины (75 мкг на одну птицу). В дальнейшем использовали неполный адьювант Фрейнда. Антитела выделяли из яиц, собранных после четвертого раунда иммунизации. Антитела выделяли из желтков яиц иммунизированных антигеном кур по методу Polson A. et al. [7] и затем подвергали аффинной очистке по описанной ранее методике [5] на BrCN-сефарозе, конъюгированной с рекомбинантным HBsAg в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Концентрацию ПКА кур в полученной фракции определяли спектрофотометрически. В работе использовали очищенные антитела ПКА № 1 и ПКА № 2, полученные от двух разных кур.

МКА 18C8 адсорбировали на поверхность планшетов (3 мкг/мл, 100 мкл на лунку, 16 — 20 часов при комнатной температуре) в 0,1 М глицин-HCl буфере pH 2,8. ПКА № 1 кур адсорбировали в 0,1 М глицин-HCl буфере pH 2,8 (6 мкг/мл), ПКА № 2 кур — в 0,025 М Na-фосфатный буфере, pH 7,5 (12 мкг/мл). Прочие условия были, как указаны выше. Насыщенные антителами планшеты инкубировали 120 мин при 42°C с разведениями рекомбинантного HBsAg, меченного пероксидазой хрена (1 — 64 нг/мл) в 0,025 М Na-фосфатном буфере (pH 7,5), со-

держателем 0,15 М NaCl, 0,2% БСА и 0,05% твина 20 (ELI-буфер). Иммуные комплексы, содержащие пероксидазу, регистрировали после реакции с ТМБ на планшетном сканере при 450 нм, как описано ранее [4].

Антитела адсорбировали на поверхность полистироловых планшетов, как описано выше в следующих буферах (концентрация антител составляла 10 мкг/мл): 0,1 М глицин-HCl буфер, pH 2,8; 0,025 М Na-фосфатный буфер, pH 7,5 и 0,05 М Na-гидрокарбонатный буфер pH 9,5. Затем определяли активность адсорбированных антител по связыванию с меченым пероксидазой рекомбинантным HBsAg, как описано выше.

Растворами тестируемых антител (1, 2, 3, 6, 12 и 24 мкг/мл) в буфере с оптимальным pH адсорбции насыщали полистироловые планшеты и определяли антигенсвязывающую активность, как описано выше.

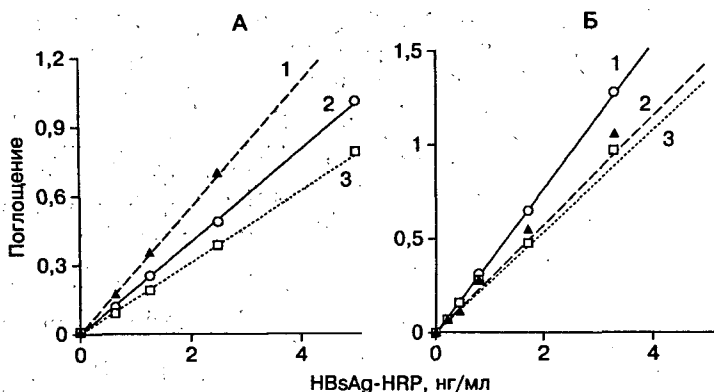
Полистироловые планшеты насыщали антителами (МКА 18С8 или ПКА кур), как описано выше. Инкубационная смесь в конечном объеме 100 мкл включала 50 мкл стандарта (рекомбинантного HBsAg), разведенного в ELI-буфере (1 — 16 нг/мл) и 50 мкл раствора биотинилированных детектирующих антител в ELI-буфере в концентрациях 50 нг/мл F3/F4; 500 нг/мл ПКА № 1; 500 нг/мл ПКА № 2. Антитела биотинилировали, следуя рекомендациям фирмы «Pierce», как описано нами ранее [4]. Планшеты инкубировали 120 мин при 42°C. После отмывки в лунки добавляли раствор (50 нг/мл) стрептавидин-пероксидазы в ELI-буфере с 1% казеина. После инкубации (30 мин, 42°C) и отмывки иммуные комплексы окрашивали тетраметилбензидином (ТМБ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящей работе проанализировали эффективность двух образцов ПКА кур (ПКА № 1 и ПКА № 2), полученных от двух иммунизированных HBsAg птиц, в сравнении с ранее описанными МКА желтой, специфичными к HBsAg [1, 4]. Концентрация специфических ПКА в желтке составила 50 мкг/мл. Сравнение МКА и ПКА кур проводили на модели определения HBsAg в твердофазном ИФА. В качестве эталона сравнения были выбраны мышинные МКА 18С4 и МКА F3/F4 и ранее сконструированный на их основе сэндвич-метод определения HBsAg с минимальной детектирующей дозой около 0,017 нг/мл HBsAg [1, 4]. В данном тесте в качестве иммобилизованных антител используются высокоэффективные МКА 18С8, а в качестве детектирующих антител — МКА F4/F3, конъюгированные с биотином. Специфичность этого сэндвич-метода была продемонстрирована нами ранее на стандартной панели HBsAg-положительных и HBsAg-отрицательных сывороток, предоставленных НПО «Диагностические системы» [1].

На первом этапе для оценки антигенсвязывающей способности ПКА кур их сравнили после адсорбции на твердую фазу с эталонными мышинными МКА 18С8, которые характеризуются высокой эффективностью в качестве иммобилизованных антител в сэндвич-методе определения HBsAg [1, 4]. В качестве параметра сравнения использовали тангенсы угла наклона линейных участков кривых связывания (обозначенных буквой  $k$ ) рекомбинантного HBsAg (меченного пероксидазой хрена) с адсорбированными на полистироловых планшетах антителами (МКА или куриными ПКА), как показано на рис., на примере одного из опытов. Этот метод (сравнение угловых коэффициентов кривых) является общепринятым способом количественной характеристики аналитической чувствительности [6]. В табл. 1 представлены сводные данные по результатам сравнения угловых коэффициентов ( $k$ ) кривых связывания меченого HBsAg с иммобилизованными МКА 18С8, ПКА № 1 и ПКА № 2. Причем важно подчеркнуть, что эти сравнения проводили при оптимальных для каждого антитела условиях пассивной адсорбции (pH адсорбционных буферов и концентрации антител), которые определялись заранее (табл. 1). Прямая адсорбция является наиболее распространенным спо-





**Связывание HBsAg с мышиными МКА 18С8 и ПКА кур в различных вариантах твердофазного ИФА.**

А. Связывание рекомбинантного HBsAg, меченного пероксидазой, с иммобилизованными (при оптимальных рН адсорбции и насыщающих концентраций Ig) МКА 18С8 и куриными ПКА № 1 и ПКА № 2. Типичные кривые связывания: (1) для ПКА № 2,  $y=0,28x$ ; (2) для МКА 18С8,  $y=0,20x$ ; (3) для ПКА № 1,  $y=0,16x$ . Б. Связывание HBsAg с иммобилизованными (при оптимальных рН адсорбции и насыщающих концентраций Ig) МКА 18С8 и куриными ПКА № 1 и ПКА № 2 в сэндвич-методе. Типичные кривые связывания: (1) для МКА 18С8,  $y=0,38x$ ; (2) для ПКА № 2,  $y=0,29x$ ; (3) для ПКА № 1,  $y=0,2$ .

собом иммобилизации антител на поверхность твердой фазы, что обусловлено простотой методики и ее невысокой стоимостью [2]. Однако известно, что до 90% МКА после адсорбции на поверхность полистироловых планшетов денатурируется, утрачивая способность связывать антиген [2, 4]. Также показано, что аналитическая чувствительность твердофазных систем во многом зависит от биологической активности иммобилизованных антител [2], а одним из важных факторов, оказывающих влияние на сохранение этой активности, является, в частности, рН адсорбционных буферов [4]. Учитывая это, важно было определить оптимальные значения рН адсорбции для каждого из антител. Ранее нами было уже установлено, что пассивная адсорбция МКА 18С8 на полистироловые планшеты при рН 2,8 приводит к значительно лучшему сохранению их активности по сравнению с иммобилизацией при рН 7,5 или 9,5 [1, 4]. Для определения оптимальных значений рН-адсорбции для ПКА кур сравнивали угловые коэффициенты ( $k$ ) кривых связывания меченного пероксидазой рекомбинантного HBsAg с антителами, иммобилизованными при различных рН (в глициновом, рН 2,8; Na-фосфатном, рН 7,5 и карбонатном, рН 9,5 адсорбционных буферах). Тестируемые антитела сорбировали в концентрации 10 мкг/мл, что для большинства антител является избыточной насыщающей концентрацией [2]. Оказалось, что для ПКА № 1 оптимальной оказалась адсорбция в глициновом буфере с рН 2,8, что обеспечивало статистически значимое (примерно на 30%) повышение аналитической чувствительности, по сравнению с адсорбцией при рН 7,5, в то время как для ПКА № 2 оптимальной была адсорбция при рН 7,5 (табл. 1). Для определения оптимальной насыщающей концентрации адсорбируемых антител также строили кривые связывания

Таблица 1. Угловые коэффициенты ( $k$ ) линейных участков кривых связывания HBsAg, меченного пероксидазой хрена, с мышиными МКА 18С8 и ПКА № 1 и ПКА № 2 кур, иммобилизованными на поверхности полистироловых планшетов при оптимальных рН адсорбции и насыщающих концентраций антител

Тестируемые антитела	Оптимальный рН адсорбции	Оптимальная концентрация сорбируемых антител (мкг/мл)	Коэффициент кривой связывания ( $k \times 10$ ) ( $n=8$ )
ПКА № 1	2,8	6	$1,62 \pm 0,13$
ПКА № 2	7,5	12	$2,83 \pm 0,08$
МКА 18С8	2,8	3	$2,07 \pm 0,07$

вания меченого HBsAg с иммобилизованными ПКА № 1 и № 2 при различных концентрациях антител в адсорбционных буферах, имеющих оптимальные для иммобилизации рН. Значения оптимальных концентраций антител в адсорбционных буферах для ПКА № 1, ПКА № 2 и МКА 18С8 составили 12, 6 и 3 мкг/мл, соответственно (табл. 1). Дальнейшее увеличение концентраций антител в буферах не улучшало связывания твердой фазы с антигеном.

Как можно видеть из табл. 1 и рис. А, максимальную активность при связывании с меченым пероксидазой HBsAg продемонстрировали куриные ПКА № 2 ( $\kappa=0,283\pm0,008$ ). При их использовании аналитическая чувствительность метода возросла примерно на 40% по сравнению с МКА 18С8 ( $\kappa=0,207\pm0,007$ ). В то же время, ПКА № 1 имели более слабую антигенсвязывающую активность, чем МКА 18С8.

На следующем этапе мы проанализировали эффективность ПКА № 1 и ПКА № 2 при их использовании в качестве иммобилизованных или детектирующих антител в сэндвич-методе определения HBsAg, по сравнению с МКА 18С8 и МКА F3/F4. Описанный подход иллюстрирует рис. Б. На нем представлены результаты одного из экспериментов, в котором МКА 18С8 и куриные ПКА адсорбировали (в оптимальных условиях) на поверхность планшетов, а в качестве детектирующих антител использовали МКА F4/F3, меченные биотином. В качестве критерия эффективности антител, как и в предыдущих опытах, использовали аналитическую чувствительность, определяемую по угловым коэффициентам кривых связывания ( $\kappa$ ). Сводные данные по аналитической чувствительности сэндвич-метода определения HBsAg с использованием различных комбинаций иммобилизованных и детектирующих антител представлены в табл. 2. Как можно видеть, замена МКА на ПКА кур ни в одном из вариантов сэндвич-метода не приводила к улучшению его аналитической чувствительности (возрастанию  $\kappa$ ). Так, если ПКА использовались в качестве иммобилизованных антител (эксперимент № 1), а детектирующими были меченные биотином МКА F3/F4, наблюдалось снижение аналитической чувствительности примерно на 30%. В эксперименте № 2 (меченные биотином ПКА кур — детектирующие, МКА 18С8 — иммобилизованные антитела) значения  $\kappa$  уменьшались в 15 — 20 раз, несмотря на — высокую концентрацию в инкубационной смеси меченых куриных ПКА (250 нг/мл).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нам удалось получить аффинно-очищенные ПКА кур, которые после адсорбции на твердую фазу показали в определенных условиях, а именно, в опытах по связыванию с меченым пероксидазой HBsAg более высокую эффективность, чем эталонные МКА мышей 18С8. С другой стороны, вопреки ожиданиям мы не обнаружили преимуществ ПКА кур по сравнению с мышинными МКА, ни в качестве иммобилизованных, ни в качестве детектирующих антител при их испытании в «полном» сэндвич-методе определения HBsAg. Причины такого несовпадения не ясны, однако можно предположить, что в определенной степени это связано с особенностями структуры молекул IgY, не имеющих шар-

Таблица 2. Эффективность мышинных моноклональных антител и поликлональных антител кур в сэндвич-методе определения HBsAg

№ эксперимента	Адсорбированные антитела	Антитела, меченные биотином (конъюгат)	Концентрация конъюгата в инкубационной смеси (нг/мл)	Коэффициент калибровочной кривой $\times 10$ (n=8)
I	МКА 18С8	МКА F4/F3	25	3,84±0,15
	IgY № 1			2,68±0,10
	IgY № 2			2,86±0,08
II	МКА 18С8	IgY № 1	250	0,23±0,06
		IgY № 2	250	0,14±0,01

нирной области и поэтому менее «гибких» по сравнению с молекулами IgG [8]. В результате при использовании ПКА кур в сэндвич-методе, возможно, возникают стерические препятствия к бивалентному взаимодействию антител с молекулами антигенов, уменьшая прочность иммунных комплексов. Известно, что в сэндвич-методе образуются комплексы с линейной и циклической структурой, причем последние, возникающие за счет бивалентного связывания, более стабильны [5].

Обращает на себя внимание также тот факт, что куриные ПКА № 1 лучше связывали HBsAg после их иммобилизации в адсорбционных растворах с pH 2,8, по сравнению с традиционными буферами, имеющими pH 7,5 и 9,5. Это несколько неожиданный факт, хотя ранее были описаны МКА млекопитающих, лучше сохраняющие свою активность при адсорбции в буферах с очень низкими или очень высокими значениями pH, чем в буферах с pH 7,5 и 9,5, чаще всего используемых в твердофазном ИФА [4]. В частности, адсорбция МКА 18С8 при pH 2,8 приводила к увеличению аналитической чувствительности сэндвич-метода определения HBsAg, сопровождавшейся снижением на порядок минимально детектируемой дозы HBsAg, по сравнению с иммобилизацией в буферах с pH 9,5 и 7,5 [1, 4]. Однако известно, что IgY птиц менее устойчивы к денатурации в кислых условиях, чем IgG млекопитающих [8, 9]. Тем не менее, полученные результаты предполагают, что куриные ПКА, также как и МКА мышей, гетерогенны в отношении чувствительности к pH адсорбции, что необходимо учитывать при их применении. Некоторые авторы также сообщали об относительной кислотоустойчивости полученных ими ПКА кур в условиях их экспериментов [3].

Получены ПКА кур, показавшие после их адсорбции на полистироловые ИФА планшеты, более высокую способность связывать меченный пероксидазой HBsAg по сравнению с эталонными мышинными МКА 18С8, эффективными в качестве иммобилизованных антител в сэндвич-методе определения HBsAg. Однако переход от сравнений в указанных модельных опытах к применению ПКА кур в сэндвич-методе определения HBsAg, в том числе, замена ими МКА 18С8, привел не к ожидаемому увеличению, а напротив, снижению аналитической чувствительности данного метода. Возможно, это связано с меньшей «гибкостью» молекул IgY, по сравнению с IgG, что затрудняет бивалентное связывание и образование высокоавидных циклических иммунных комплексов. Данные факты и предположения не могут отрицать возможности использования ПКА птиц, в частности кур, в лабораторной диагностике инфекционных, в том числе, вирусных болезней. Скорее всего, они указывают на необходимость более глубокого изучения их физико-химических свойств и определения адекватных поставленным задачам областей применения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлева Д.А., Дмитриев А.Д., Дмитриев Д.А., Массино Ю.С., Павлова Е.В., Пыренкова И.Ю., Смирнова М.Б., Сегал О.Л., Тараканова Ю.Н., Уланова Т.И., Фартушная О.Н., Шарипова И.Н., Коляскина Г.И., Лавров В.Ф. Использование pH-чувствительных иммобилизованных моноклональных антител для оптимизации иммуноферментного сэндвич-метода определения поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). Журн. микробиол. 2010, 2: 85-89.
2. Butler J.E., Ni L., Nessler R. et al. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. J. Immunol. Methods. 1992, 150: 77-90.
3. Camenisch G., Tini M., Chilov D. et al. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . FASEB J. 1999, 13: 81-88.
4. Dmitriev A.D., Tarakanova J.N., Yakovleva D.A., Dmitriev D.A., Phartooshina O.V., Kolyaskina G.I., Massino Yu.S., Borisova O.V., Segal O.L., Smirnova M.B., Ulanova T.I., Lavrov V.F. Monoclonal antibodies requiring coating buffer with low pH for efficient antigen capture in

- sandwich ELISA: the rarities or practically important phenomena? J. Immunoassay. Immunochem. 2013, 34: 414-437.
5. Nikulina V.A., Kizim E.A., Massino Y.S., Segal O.L., Smirnova M.B., Avilov V.V., Saprigin D.B., Smotrov S.P., Tichtchenko V.A., Kolyaskina G.I., Dmitriev A.D. Synergistic effects in antigen-capture ELISA using three monoclonal antibodies directed at different epitopes of the same antigen. Clin. Chim. Acta. 2000, 299: 25-44.
  6. Pardue H.L. The inseparable triad: analytical sensitivity, measurement uncertainty, and quantitative resolution. Clin. Chem. 1997, 43: 1831-1837.
  7. Polson A., von Wechmar M.B., Fazakerley G. Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. Immunol Commun. 1980, 9: 495-514.
  8. Schade R., Calzado E. G., Sarmiento R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. Altern. Lab Anim. 2005, 33: 129-154.
  9. Spillner E., Braren I., Greunke K. et al. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. Biologicals. 2012, 40: 313-22.

Поступила 20.08.15

Контактная информация: Дмитриев Дмитрий Александрович, к.б.н.,  
115088, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Е.В.Сорокина<sup>1</sup>, Н.К.Ахматова<sup>1</sup>, С.А.Сходова<sup>1</sup>, Е.Л.Чалая<sup>2</sup>, С.А.Масюкова<sup>2</sup>*

## **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ РАННЕЙ ЭРИТЕМНОЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ ЛАЙМА С УЧЕТОМ ОСОБЕННОСТЕЙ ИММУНОГЕНЕЗА**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Медицинский институт усовершенствования врачей высшего профессионального образования Московский государственный университет пищевых производств, Москва

*Цель.* Изучение врожденного и адаптивного иммунитета у больных мигрирующей эритемой, клинической эффективности комбинированной терапии с применением вакцин. Иммуновак и динамики иммунологических показателей в результате терапии. *Материалы и методы.* Обследованы 37 взрослых пациентов с мигрирующей эритемой. Больные были разделены на 2 группы: 1 гр. (14 чел.) — Иммуновак интраназально-подкожным методом на фоне базисной терапии; 2 гр. (23 чел.) — терапия доксициклином 200 мг/сут 21 день. Перед началом лечения и через 1 месяц после терапии у больных были изучены: фагоцитарная активность нейтрофилов крови; экспрессия TLRs на мононуклеарных лейкоцитах периферической крови (МЛПК) и клетках кожи в очагах методом проточной цитометрии с применением МАТ к TLR2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 с использованием проточного цитометра FC-500; субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови; уровень про-, противовоспалительных и регуляторных цитокинов в сыворотке крови методом ИФА; IgG, IgM, IgA в сыворотке крови. *Результаты.* У больных мигрирующей эритемой выявлен высокий уровень экспрессии TLR2, 4, 7, 8 на клетках кожи в очагах, TLR2, 4 — на клетках крови; низкое содержание CD95+ и CD25+, высокий уровень в сыворотке IL-1b, IL-2 и IL-4, повышение уровня общего IgE. Иммуновак способствовал повышению CD95+ и CD25+, синтезу IFN-γ, в большей степени снижал уровень общего IgE, чем базисная терапия. *Заключение.* Включение в терапию больных мигрирующей эритемой Иммуновак способствует повышению клинической эффективности и коррелирует с коррекцией иммунологических нарушений.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 51—56

Ключевые слова: мигрирующая эритема, Toll-подобные рецепторы, вакцина Иммуновак

## **EFFECTIVENESS OF APPLICATION OF COMBINED THERAPY OF EARLY ERYTHEMA STAGE OF LYME DISEASE TAKING INTO CONSIDERATION IMMUNOGENESIS FEATURES**

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Medical Institute of Doctors' Improvement of Higher Professional Education Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia

*Aim.* Study innate and adaptive immunity in patients with migrating erythema, clinical effectiveness of combined therapy using Immunovac vaccine and dynamics of immunologic parameters as a result of the therapy. *Materials and methods.* 37 adult patients with migrating erythema were examined. The patients were divided into 2 groups: 1st gr. (14 individuals) — Immunovac by intranasal-subcutaneous method against the background of basic therapy; 2nd gr. (23 individuals) — 200 mg/day doxycycline therapy for 21 days. Phagocytic activity of blood neutrophils; TLRs expression on mononuclear leukocytes of peripheral blood (PBML) and skin cells in foci by flow cytometry with mAT against TLR2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 using flow cytometer FC-500; subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes; levels of pro-, anti-inflammation and regulatory cytokines in blood sera by EIA method; IgG, IgM, IgA in blood sera were studied in patients before treatment and 1 month after therapy. *Results.* A high level of TLR2, 4, 7, 8 on skin cells in foci, TLR2, 4 — on blood cells; low content of CD95+ and CD25+, high level of serum IL-1b, IL-2 and IL-4, an increase of general IgE level was detected in patients with migrating erythema. Immunovac facilitated an increase of CD95+ and CD25+, IFN- $\gamma$  synthesis, reduced the level of general IgE in a more pronounced way than basic therapy. *Conclusion.* Inclusion of Immunovac into therapy of patients with migrating erythema facilitates increase of clinical effectiveness and correlates with correction of immunologic disorders.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 51—56

Key words: migrating erythema, Toll-like receptors, Immunovac vaccine

### **ВВЕДЕНИЕ**

В структуре эритем наиболее распространенной на сегодняшний день остается мигрирующая эритема Афцелиуса-Липшутца (МЭ), являющаяся патогномоничным признаком Лайм-боррелиоза (ЛБ) — широко распространенного трансмиссивного заболевания. В Российской Федерации ежегодно количество заболевших клещевыми боррелиозами колеблется от 7 до 9 тысяч случаев [6, 7]. В 2011 году частота заболеваемости иксодовым клещевым боррелиозом составила 7,02 на 100 тыс населения [4]. В последние десятилетия отмечается рост частоты тяжелых хронических торпидных форм болезни Лайма, склонных к рецидивированию [6, 7, 9, 11].

МЭ, как правило, регрессирует спонтанно в течение 1 — 2 месяцев, но может длительно персистировать от 6 до 12 месяцев [10]. Терапия ЛБ наиболее эффективна на ранних стадиях инфекции, благоприятный исход заболевания и выздоровление зависят от своевременности начатого этиотропного лечения. Однако, несмотря на длительную антибиотикотерапию большими разовыми дозами, хронизация инфекции наступает у 3,5 — 30% больных. При лечении хронических форм эффективность этиотропной терапии составляет 43,2 — 48,7% [2, 5]. Развитие МЭ при болезни Лайма как стадии локальной инфекции, вызванной *Borrelia burgdorferi*, происходит на фоне недостаточности клеточных или гуморальных факторов неспецифической резистентности организма [1, 3, 7, 8]. Поэтому при хроническом течении инфекции в основе патогенетической терапии лежит иммунокоррекция. Нарушения функционирования иммунной системы у больных как хронической, так и острой формой ЛБ указывают на целесообраз-

ность их коррекции с целью предотвращения развития тяжелых торпидных форм. Целью исследования явилось изучение клинической эффективности комбинированной терапии больных мигрирующей эритемой с применением Иммунавак и динамики иммунологических показателей в результате терапии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Иммунологические исследования включали изучение фагоцитарной активности нейтрофилов крови. Изучение экспрессии TLRs на МЛПК проводили методом проточной цитометрии с применением МАТ к TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 (Caltag Laboratories, США) с использованием проточного цитометра FC-500 (Beckman Coulter, США). Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови определяли методом проточной цитометрии. Определение уровня про-, противовоспалительных и регуляторных цитокинов в сыворотке крови проводили методом ИФА; исследование IgG, IgM, IgA в сыворотке крови — методом радиальной иммунодиффузии. Перед началом терапии все больные были разделены на 2 группы. Группа 1 (14 больных) получала Иммунавак на фоне базисной антибактериальной терапии. Иммунавак вводили назально-подкожным методом (3 ежедневных введения препарата и последующие 8 — 10 подкожных инъекций с интервалом 3 — 4 дня, начиная с дозы 0,05 мл на первую инъекцию, 0,1 мл — на вторую и 0,2 — 0,4 мл — при последующих введениях препарата). Иммунавак разработана в НИИВС им. И.И. Мечникова, разрешена к применению в практике здравоохранения (ЛРС-001294/10 от 24.02.2010 для подкожного введения и ЛРС-001293/10 от 24.02.2010 для интраназального введения), производится НПО «Микроген» (Уфа). Вторая группа (23 больных) получала только базисную терапию: доксициклин 200 мг в сутки в 2 приема в течение 21 дня, а также по показаниям — проведение детоксикационной терапии. Статистическую обработку результатов проводили в рамках базовой статистики с использованием t-критерия Стьюдента, U-критерия Манн-Whitney, критерия Wilcoxon, применяя стандартный пакет статистических программ Windows 7, Excel и WinMdi. Различия рассматривались как значимые при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Под нашим наблюдением находились 37 больных мигрирующей эритемой в возрасте от 21 до 65 лет с длительностью заболевания от 14 дней до 72 дней. У 81,08% (30 больных) наблюдались единичные очаги, у 18,92% (7 чел.) отмечалось развитие вторичных эритем, не связанных с местом первичного аффекта, с преимущественной локализацией их в области головы, шеи, туловища.

При определении методом ИФА антител в сыворотке крови IgM к антигенам *B. burgdorferi* (OspA, p41) были обнаружены у 64,86% (24 больных), у 37,84% (14 чел.) — к OspC. Выявление антител к OspC у пациентов с мигрирующей эритемой свидетельствует о хорошей реактивности у 37,84% больных.

В результате изучения экспрессии TLRs на МЛПК у больных хронической МЭ выявлен высокий уровень содержания клеток с экспрессией TLR2 ( $25,1 \pm 4,6\%$ ), превышающий нормальные значения в группе здоровых лиц в 4 раза. Количество TLR4 экспрессирующих клеток у больных было также выше нормальных значений в 3,5 раза ( $13,8 \pm 4,5\%$ ). Число TLR3 и TLR9 позитивных клеток также превышало нормальные значения, составляя  $59,9 \pm 5,8\%$  и  $57,1 \pm 6,7\%$  соответственно. В группе больных МЭ выявлена высокая обратная корреляционная связь между длительностью заболевания и уровнем экспрессии TLR2, 4, 3, 9, что может свидетельствовать об истощении и снижении активации врожденных механизмов при развитии воспалительного процесса.

При исследовании у 13 больных экспрессии TLRs клетками кожи наблюдали достоверные различия в экспрессии TLR2, 7, 8. Уровень экспрессии TLR2 и TLR4

в очагах с длительностью существования до 30 дней (7 больных,  $19,4 \pm 4,3$  и  $13,6 \pm 3,8\%$  соответственно) был достоверно выше, чем в более длительно существующих очагах (6 больных,  $5,8 \pm 1,6$  и  $6,8 \pm 2,5\%$  соответственно). Известно, что первый барьер при проникновении экзогенных патогенов в человеческой коже представляют кератиноциты, которые формируют резистентность к инфекции благодаря функционированию осуществляемых ими иммунных механизмов. В обследуемой группе больных МЭ выявлена высокая обратная корреляционная зависимость между длительностью существования очагов эритемы и экспрессией на клетках кожи в очагах TLR2 ( $r = -0,946$ ), TLR4 ( $r = -0,944$ ) ( $p < 0,05$ ). TLR2 и TLR4 необходимы для распознавания ЛПС; TLR2, димеризуясь с TLR1, распознает триацилированные липопротеины, такие как *B. burgdorferi* OspA. Поэтому в исследуемой группе больных МЭ выявленная гиперэкспрессия TLR2, 4 МЛПК и в коже указывает на распознавание липопротеинов боррелий и является маркером активности инфекционного процесса. Снижение экспрессии TLR2 по мере развития заболевания в длительно существующих очагах может отражать дисфункции в системе TLR, частично объясняя хронизацию и рецидивирование инфекции в результате нарушения кооперации клеток врожденного и как следствие — адаптивного иммунитета. У больных МЭ выявлена высокая прямая корреляционная связь между длительностью заболевания и экспрессией TLR7 ( $r = 0,937$ ) и TLR8 ( $r = 0,956$ ) ( $p < 0,05$ ). Поэтому гиперэкспрессия этих рецепторов может отражать развитие хронического воспаления в коже и являться прогностическим маркером хронизации болезни Лайма. Также выявлена прямая корреляционная связь между тяжестью течения эритемной формы болезни Лайма и уровнем экспрессии TLR2 ( $r = 0,587$ ), TLR4 ( $r = 0,571$ ), TLR9 ( $r = 0,680$ ) на клетках кожи ( $p < 0,05$ ).

Проведение исследования фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови показало у больных МЭ повышение цитологического показателя ( $0,35 \pm 0,06$  у.е.) по сравнению с нормальными значениями.

В результате проведения оценки содержания субпопуляций лимфоцитов периферической крови выявили снижение содержания лимфоцитов с маркерами CD95+ ( $36,8 \pm 7,4\%$ ) и CD8+ ( $21,6 \pm 2,1\%$ ) на фоне повышения относительного содержания В-лимфоцитов CD72+ ( $16,9 \pm 2,8\%$ ). Относительные значения содержания CD25+ составляли  $8,2 \pm 2,3\%$  и приближались к нижней границе нормальных значений. Уровень лимфоцитов, экспрессирующих на своей мембране молекулы антигенного представления (HLA-DR<sup>+</sup>), находился на верхней границе нормальных значений, составляя  $20,1 \pm 2,8\%$ .

При изучении цитокинового профиля у больных МЭ в сыворотке крови исходно наблюдали значительное повышение уровня провоспалительных цитокинов IL-1b, IL-2 и IL-4, их средние значения составили ( $19,6 \pm 1,9$  и  $37,2 \pm 2,7$  пг/мл на фоне повышения уровня IL-4 и IL-5 (до  $21,8 \pm 4,7$  и  $19,9 \pm 2,1$  пг/мл) и снижения регуляторного цитокина IFN- $\gamma$  ( $19,2 \pm 3,1$  пг/мл) по сравнению с группой здоровых лиц. Основными мишенями IL-4, продуцируемого Th2 клетками, являются В-лимфоциты. IL-4 служит ростовым фактором для В-лимфоцитов, может вызывать их пролиферацию без дополнительных стимулов. IL-4 является функциональным антагонистом IFN- $\gamma$  как при непосредственном действии на клетки (подавляет выработку IFN- $\gamma$  и ослабляет некоторые его эффекты), так и при индукции образования Th2 клеток. Анализ полученных данных позволяет предполагать активацию Т-лимфоцитов по Th2 пути при МЭ, поскольку происходит увеличение экспрессии IL-4 и, соответственно, снижение находящегося в конкурентных отношениях с ним IFN- $\gamma$ . В группе больных МЭ выявили высокую прямую корреляционную связь между тяжестью течения болезни Лайма и уровнем сывороточных провоспалительных цитокинов IL-4 ( $0,572$ ) и IL-5 ( $0,650$ ) ( $p < 0,05$ ), что указывает на прогностическую значимость определения данных ци-

токсинов. У больных МЭ наблюдали повышение уровня общего IgE до  $187,8 \pm 28,4$  кЕ/л, что согласуется с повышенной экспрессией IL-4.

Больные первой и второй групп терапию переносили хорошо. Изучение терапевтического эффекта начали с оценки длительности регресса очагов МЭ в ходе терапии. В группе, получавшей комбинированную терапию, средние значения длительности разрешения очагов составили  $12,17 \pm 2,51$  дней, при базисной терапии —  $16,04 \pm 2,37$  дней. При изучении динамики уровня специфических антител выявили, что в результате всех видов терапии через 6 месяцев произошла негативация антител у большинства больных. В группе 1 IgM к *B. burgdorferi* выявили у 3 чел. (OspA, p41- у 1 чел. и OspC — у 2 больных). IgG выявили у 5 чел. (VlsE — у 4 чел., p100, 39,18 — у 1 чел.). В группе 2 IgM (OspA, p41 и OspC) выявили у 3 и 3 чел. соответственно, IgG (VlsE) — у 3 больных. Таким образом, в сроки наблюдения 6 месяцев негативация титров IgM к OspA, p41, OspC *B. burgdorferi* в группе 1 отмечена у 78,6%, в группе 2 — у 74% больных. Через 12 месяцев после терапии специфические IgG к антигенам (VlsE) наблюдали только в группе 2, получавшей базисную терапию — 13%(3) больных, что потребовало проведения повторного курса лечения. Нарастание титра антител в процессе лечения в обеих группах выявлено не было.

При изучении динамики иммунологических показателей в результате терапии выявлено, что комбинированная терапия существенно не повлияла на экспрессию TLR2,4,3, в то время как уровень экспрессии TLR2 и TLR3 в группе, получавшей только базисную терапию, снизился с  $25,1 \pm 7,6$  до  $15,3 \pm 5,5$  и с  $59,9 \pm 9,8$  до  $32,7 \pm 2,1$  соответственно. Экспрессия TLR4 повышалась после лечения в группе, получавшей Иммуновак. В результате терапии происходило снижение исходно значительно повышенного уровня экспрессии TLR9 в равной степени в двух группах с  $57,1 \pm 9,7$  до  $39,8 \pm 2,6$  и  $37,4 \pm 5,3$  соответственно, что приводило к нормализации этого показателя.

В результате комбинированной терапии у больных отмечено увеличение фагоцитарной активности лейкоцитов, что нашло отражение в повышении фагоцитарного индекса с  $52,3 \pm 4,7$  до  $75,8 \pm 4,9\%$ . Анализ субпопуляций лимфоцитов в группе больных МЭ после лечения выявил последовательное достоверное повышение процентного и абсолютного содержания лимфоцитов CD8+ в группе, получавшей комбинированную терапию, с  $21,6 \pm 2,1\%$  и  $526,8 \pm 42,7$  кл/мкл до  $32,9 \pm 2,4\%$  и  $790,0 \pm 50,0$  кл/мкл. В ходе иммунотерапии в периферической крови больных на лимфоцитах отмечалась тенденция к повышению исходно очень низких значений ( $8,2 \pm 2,3\%$ ) активационных молекул CD25+ до  $11,5 \pm 1,2\%$ , повышение CD95+ с  $36,8 \pm 7,4$  до  $52,4 \pm 4,9\%$ . В группе, получавшей комбинированную терапию, отмечено увеличение содержания CD16+ до  $17,2 \pm 1,7\%$ , в то время как базисная терапия снижала этот показатель ( $10,1 \pm 3,3\%$ ). В группе, получавшей базисную терапию, отмечена тенденция к снижению содержания Т-лимфоцитов CD3+ до  $926,4 \pm 88,9$  кл/мкл, к еще большему снижению уровня CD25+ до  $7,5 \pm 1,6\%$ , Т-регуляторных клеток CD8+ ( $480,2 \pm 58,4$  кл/мкл); CD95+ до  $31,4 \pm 6,8\%$ .

Комбинированная терапия вызывала значительное повышение синтеза IFN- $\gamma$  с  $19,2 \pm 3,1$  до  $42,8 \pm 2,5\%$  ( $p < 0,05$ ). При базисной терапии уровень IFN- $\gamma$  оставался без существенной динамики. В результате терапии наблюдали снижение IL-4 до  $12,1 \pm 3,5$  пг/мл ( $p < 0,05$ ) и  $15,8 \pm 3,9$  пг/мл ( $p > 0,05$ ), тенденцию к нормализации повышенного уровня IL-1b, IL-5. Тенденция к снижению IL-2 отмечена в группе, получавшей базисную терапию ( $24,1 \pm 5,2$  пг/мл).

В группе больных МЭ в результате терапии отмечено снижение исходно высокого уровня общего IgE, в большей степени в группе, получавшей комбинированную терапию (с  $187,8 \pm 28,4$  до  $31,7 \pm 5,8$  и  $64,7 \pm 4,9$  кЕ/л). Терапия не повлияла на исходно находящиеся в пределах нормальных значений IgG, IgA, IgM.



В ходе исследования выявлены иммунологические особенности ранней эритемной стадии болезни Лайма в виде высокого уровня экспрессии TLR2,4 на клетках крови и на клетках кожи и гиперэкспрессии TLR7, TLR8 на клетках кожи в очагах; низкого содержания CD95+ и CD25+, значительного увеличения в сыроворотке уровня IL-1b, IL-2 и IL-4 и повышения уровня общего IgE.

Регресс клинических симптомов был более выражен в группе, получавшей комбинированную терапию с применением Иммуновак. Иммуновак содержит лиганды для TLR, ассоциированных с патогенезом бактериальных инфекций, поэтому иммунотерапия Иммуновак, повышая экспрессию TLR4 у больных мигрирующей эритемой, способствует активации механизмов врожденного иммунитета, в том числе против *B. burgdorferi*, и как следствие — более эффективной элиминации патогена, что находит отражение в полном регрессе клинических проявлений эритемной стадии болезни Лайма к 28 дню терапии и негативации титров специфических антиборрелиозных антител в результате терапии к 12 месяцу наблюдения. Иммунотерапия с применением Иммуновак способствовала повышению в периферической крови больных на лимфоцитах CD95+ и нормализации содержания CD25+, вызывала значительное повышение синтеза IFN- $\gamma$ , в большей степени снижала исходно высокий уровень общего IgE, чем традиционная терапия.

Таким образом, включение в терапию больных мигрирующей эритемой Иммуновак способствует повышению клинической эффективности и коррелирует с коррекцией иммунологических нарушений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бараулина А.С., Кологривова Е.Н., Пронина Н.А. и др. Признаки иммунной недостаточности у больных иксодовым клещевым боррелиозом. РАЖ. 2008, 1: 30-31.
2. Воробьева Н.Н. Клиника, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов. Метод. реком. Пермь, Урал-пресс., 1998.
3. Колчина А.С. Иммунопатогенетические основы хронизации иксодового клещевого боррелиоза. Дисс. канд мед наук. М., 2010.
4. Коренберг Э.И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегии их профилактики: изменение приоритетов. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013, 5: 7-17.
5. Лесняк О.М. Лайм-боррелиоз. Екатеринбург, Изд-во Уральской гос. мед. акад., 1999.
6. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз (иксодовые клещевые боррелиозы). СПб, Фолиант, 2000.
7. Манзенюк И.Н., Манзенюк О.Ю. Клещевые боррелиозы (болезнь Лайма). 2005.
8. Diterich I., Harter L., Hassler D. et al. Modulation of cytokine release in ex vivo-stimulated blood from borreliosis patients. Infect. Immun. 2001, 69: 687-694.
9. Ferrandiz-Pulido C., Garcia-Patos V. A review of causes of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in children. Arch. Dis. Child. 2013, 98 (12): 998-1003.
10. Mahalingam N., Bhawan J., Chomat A., Hu L. Lyme-Borreliosis. In: Wolff K., Lowell A. et al. (ed.). Fitzpatrick's Dermatology in general medicine. McGraw-Hill Companies Inc., 2008, p. 1797-1806.
11. Wei C.Y., Ko T.M., Shen C.Y., Chen Y.T. A recent update of pharmacogenomics in drug-induced severe skin reactions. Drug. Metab. Pharmacokinet. 2012, 27 (1): 132-141.

*Поступила 30.09.15*

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

А.Г.Чучалин<sup>1</sup>, Г.Г.Онищенко<sup>2</sup>, В.П.Колосов<sup>3</sup>, О.П.Курганова<sup>4</sup>,  
Н.Л.Тезиков<sup>5</sup>, Л.Г.Манакон<sup>3</sup>, Ю.М.Перельман<sup>3</sup>

## КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНАЦИИ ДЕТЕЙ ПРОТИВ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ В АМУРСКОЙ ОБЛАСТИ

<sup>1</sup>НИИ пульмонологии, <sup>2</sup>Российская Академия Наук, Москва; <sup>3</sup>Дальневосточный НИ физиологии и патологии дыхания, <sup>4</sup>Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Амурской области, <sup>5</sup>МЗ Амурской области, Благовещенск

*Цель:* Изучить эффективность антипневмококковой вакцинации детей при организации противоэпидемических мероприятий в зонах паводкового наводнения в Амурской области. *Материалы и методы.* В программу мониторинга включены 4988 детей в возрасте от 2 до 5 лет, имеющих факторы риска возникновения пневмококковой инфекции. Для иммунопрофилактики использована пневмококковая конъюгированная вакцина Превенар-13. Учету подлежали сведения о заболеваемости ребенка в течение поствакцинального периода ОРВИ, острым отитом, пневмонией, менингитом. Для оценки степени эффективности вакцинации использованы индикаторы и специальные критерии (коэффициент профилактической вакцинации и инфекционный индекс). *Результаты.* Уровень совокупной заболеваемости детей в поствакцинальном периоде уменьшился на 13,6%. Число заболеваний пневмонией, зарегистрированных в наблюдаемой популяции детей, снизилось в 2,3 раза, суммарная продолжительность болезни детей сократилась на 14,6%. Количество курсов антибактериальной терапии уменьшилось на 21,3%, количество случаев госпитализации детей — на 38,4%, количество дней временной утраты трудоспособности их родителей — на 11,1%. Установлена прямая зависимость степени эффективности вакцинации против пневмококковой инфекции от возраста детей. *Заключение.* Результаты исследования свидетельствуют, что реализация программы клинико-эпидемиологического мониторинга и профилактики внебольничных пневмоний с использованием вакцины против пневмококковой инфекции на территории Амурской области имеет высокий уровень медицинской и социально-экономической эффективности.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 57—63

Ключевые слова: пневмония, профилактика пневмококковых инфекций, пневмококковая вакцина, эффективность вакцинации

A.G.Chuchalin<sup>1</sup>, G.G.Onischenko<sup>2</sup>, V.P.Kolosov<sup>3</sup>, O.P.Kurganova<sup>4</sup>,  
N.L.Tezykov<sup>5</sup>, L.G.Manakov<sup>3</sup>, Yu.M.Perelman<sup>3</sup>

## CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS OF VACCINATION OF CHILDREN AGAINST PNEUMOCOCCAL INFECTION IN THE AMUR REGION

<sup>1</sup>Pulmonology Research Institute, <sup>2</sup>Russian Academy of Sciences, Moscow; <sup>3</sup>Far Eastern Scientific Centre of Physiology and Pathology of Respiration, <sup>4</sup>Federal Service for Surveillance on Consumer Right's Protection and Human Well-being in the Amur Region, <sup>5</sup>Healthcare Ministry of the Amur region, Blagoveschensk, Russia

*Aim.* To study the effectiveness of anti-pneumococcal vaccination of children in the organization of anti-epidemic measures in the areas of the flood in the Amur region. *Material and methods.* The monitoring program included 4988 children aged 2 to 5 years who have risk factors for pneumococcal infection. Pneumococcal conjugate vaccine Prevenar-13 was used for immunization. Data on the incidence of child with acute respiratory infection, acute otitis media, pneumonia, meningitis during the post-vaccination period were taken into account. To evaluate the effectiveness of vaccination we used indicators and specific criteria (coefficient prophylactic vaccination

and infection index). *Results.* The level of total morbidity of children in post-immunization period decreased by 13.6%; the number of cases of pneumonia in the population of observed children decreased by 2.3 times; the total duration of the illness in children decreased by 14.6%, the number of courses of antibiotic therapy was reduced by 21.3%, the number of hospital admissions of children — 38.4%, the number of days of temporary disability of parents — 11.1%. Direct dependence of the degree of effectiveness of vaccination against pneumococcal disease by the age of children is determined. *Conclusion.* The findings suggest that implementation of the program of clinical and epidemiological monitoring and prevention of community-acquired pneumonia with use of a vaccine against pneumococcal infections in the territory of the Amur Region has a high level of medical and socio-economic efficiency.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 57—63

Key words: pneumonia, prevention of pneumococcal infections, pneumococcal vaccine, effectiveness of vaccination

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время пневмококковые инфекции являются серьезной проблемой как в России, так и во всем мире. В Российской Федерации пневмонии занимают первое место среди причин смертности населения от инфекционных заболеваний и шестое — среди всех причин летальности [2, 5, 10] и обуславливают высокий уровень социально-экономических потерь для общества и государства. Пневмококковые инфекции, являясь широко распространенными заболеваниями, поражают людей любого возраста, в то время как дети, люди пожилого возраста и имеющие хронические заболевания в наибольшей степени подвержены риску заболевания [4].

Наряду с известными факторами риска (переохлаждение организма, респираторные вирусные инфекции, стрессовые ситуации, алкоголизация и табакокурение, хронические заболевания и состояния организма, сопровождающиеся иммунодефицитом) значимыми для формирования патологического состояния дыхательной системы являются климатические условия внешней среды. Статистический анализ свидетельствует о более высоком уровне распространенности болезней органов дыхания, в том числе пневмонии, и смертности от этих причин в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах [2, 6, 9], отличающихся особыми климатическими условиями среды обитания, низкой плотностью размещения населения и недостаточным уровнем доступности первичной и специализированной медицинской помощи, по сравнению с другими регионами РФ.

Особую зону и условия риска формирования респираторной патологии на территории Дальневосточного региона создало паводковое наводнение в бассейне р. Амур летом 2013 года. По данным ДВРЦ МЧС России на территории Амурской области подверглось подтоплению 22 из 28 муниципальных образований, 126 населенных пунктов, 7444 жилых дома с населением более 127 460 человек, в том числе 10 015 детей.

По оценке ВОЗ, единственный способ существенно повлиять на уровень заболеваемости пневмококковой инфекцией — это вакцинация [8, 14]. В этой связи Европейская медицинская ассоциация (ЕМА), ВОЗ, Российское респираторное общество, Центр по контролю заболеваний и профилактики в США (CDC) рекомендуют начинать вакцинацию против пневмококковой инфекции с пневмококковой конъюгированной 13-валентной вакцины [8, 11, 12, 15]. Пневмококковая вакцина Превенар-13 вызывает выработку антител к капсулярным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae*, обеспечивая высокую иммуногенность и длительную эффективную специфическую защиту от пневмококковых инфекций, вызываемых включенными в вакцину серотипами пневмококка [8, 13]. Одним из

основных преимуществ вакцины является способность формировать иммунную память и длительную защиту, а также возможность ревакцинации без риска потери напряженности иммунного ответа [11,13]. Вакцина Превенар-13, согласно проведенным на территории России исследованиям [1,7], соответствует эпидемиологической ситуации, обеспечивая охват до 64% серотипов пневмококка, вызывающих менингиты у взрослых и до 76% — у детей, до 85% тяжелых пневмоний у взрослых и до 71,4% — у детей, и показана к применению для широкой вакцинации с целью предупреждения возникновения как инвазивных пневмококковых инфекций (менингиты, бактериемия, сепсис), так и внебольничных пневмоний у детей и взрослых пациентов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на основе программы (протокола) организации мониторинга и клинико-эпидемиологической оценки эффективности вакцинации против пневмококковой инфекции населения Амурской области, пострадавшего от паводкового наводнения 2013 года (утверждена МЗ Амурской области 23 марта 2014 г.), принятой с целью профилактики пневмококковых инфекций у лиц с факторами риска их возникновения. В процессе реализации программных мероприятий проводится клинико-эпидемиологическая и социально-экономическая оценка эффективности использования пневмококковой вакцины Превенар-13 для специфической профилактики пневмококковых инфекций среди детского населения Амурской области, имеющего факторы риска их возникновения, обусловленные неблагоприятным влиянием экологических и социально-экономических условий жизнеобеспечения в период паводкового затопления территорий проживания. Для этого использованы методы клинико-эпидемиологического, социально-гигиенического, экономического и статистического анализа.

Контингент обследуемых лиц, включенных в программу мониторинга и клинико-эпидемиологической оценки эффективности вакцинации с использованием пневмококковой вакцины Превенар-13, представлен детьми в возрасте от 2 до 5 лет (4988 чел.), имеющих факторы риска возникновения пневмококковой инфекции. Вакцинация детей, включенных в программу, проведена в период марта — мая 2014 года в 17 муниципальных образованиях Амурской области. В структуре вакцинированных детей почти равные доли представлены возрастными группами от 2 до 3, от 3 до 4 и от 4 до 5 лет, 80,9% детей посещают детские дошкольные учреждения.

Основным фактором риска, предопределившим отбор пациентов на вакцинацию, явился фактор неблагоприятного воздействия на здоровье человека ситуации, вызванной наводнением и связанных с ним ухудшением социальных и экологических условий. Среди биологических факторов риска важными являются: частые респираторные инфекции и сопутствующие заболевания (хронические заболевания бронхолегочной системы, сахарный диабет, первичные иммунодефициты); среди социальных факторов риска — пребывание в организованных коллективах (детских садах), в специализированных социальных учреждениях (домах ребенка) и в особых социальных условиях (пунктах временного пребывания пострадавшего от наводнения населения).

Для иммунопрофилактики использована пневмококковая конъюгированная вакцина Превенар-13 (применяется с 2009 года и включена в Национальные календари иммунизации более 55 стран, зарегистрирована в РФ в 2012 году). Способы введения, дозировки и условия применения вакцины осуществлялись в соответствии с [3] и инструкцией по использованию вакцинного препарата.

Отбор пациентов для вакцинации, последующая вакцинация и мониторинг ее результатов осуществляется участковыми врачами-педиатрами в лечебно-профилактических учреждениях в соответствии с разработанными критериями

включения и исключения пациентов из программы наблюдения и программой клинико-эпидемиологического мониторинга.

Программа клинико-эпидемиологического мониторинга состоит из 5 визитов — до вакцинации, в момент вакцинации, через 1, 2, 3 года после вакцинации и предусматривает комплекс клинических методов обследования и наблюдения в динамике. Клиническое обследование пациентов осуществляется участковым врачом-педиатром в соответствии с действующими стандартами оказания медицинской помощи детям и соответствующей регистрацией его результатов в амбулаторной карте.

Статистический мониторинг программных мероприятий по оценке эффективности использования вакцины Превенар-13 проводится в соответствии с графиком.

Для оценки клинико-эпидемиологической эффективности проведенной вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции проанализированы анамнестические данные среди вакцинированного контингента детей, регистрируемые в течение года до вакцинации и через 1 год после вакцинации, в том числе, число эпизодов ОРВИ, острых обострений хронических заболеваний верхних дыхательных путей (фарингит, синусит и др.), внебольничных пневмоний как наиболее распространенных форм пневмококковой инфекции в соответствии с параметрами анализа и сроками их регистрации.

Для оценки степени эффективности и качества специфической профилактики использованы специальные критерии: коэффициент профилактической эффективности (КЭ) вакцинации и инфекционного индекса (ИИ). КЭ вакцинации рассчитан по формуле: (число заболеваний до вакцинации минус число заболеваний после вакцинации)  $\times 100$  и разделенное на число заболеваний до вакцинации. КЭ считается высоким, если его значения приближаются к 100%. ИИ определялся как соотношение суммы всех случаев заболеваний в течение года после вакцинации к возрасту (в норме ИИ составляет 0,2 — 0,3).

При анализе социально-гигиенической и эпидемиологической эффективности вакцинопрофилактики проводится оценка влияния пневмококковой вакцинации на уровень заболеваемости внебольничными пневмониями в целом среди совокупного населения (дети в возрасте от 0 до 14 лет) территорий Амурской области как попавших в зону паводкового затопления, так и свободных от него в динамике за ряд лет. На основе методов экономического анализа проводится оценка социально-экономической эффективности реализуемых мероприятий программы. Аналитический этап оценки эффективности программных мероприятий предполагает статистическую обработку первичных материалов с расчетом основных показателей (средних и относительных величин, коэффициентов корреляции и сопряженности признаков).

В программу статистического анализа результатов вакцинации и оценки ее эффективности через 1 год после ее проведения включены 2320 пациентов в 10 муниципальных образованиях Амурской области (репрезентативная выборка). «Копировка» соответствующих сведений для мониторинга и оценки результатов исследования осуществлялась группой исследователей-экспертов Дальневосточного НЦ физиологии и патологий дыхания из первичных медицинских документов (амбулаторная карта ребенка — ф. 112) на базе учреждений здравоохранения области. Данные вносились в формализованный бланк «Анкета по клинико-эпидемиологической оценке эффективности вакцинации детей в возрасте от 2 до 5 лет против пневмококковых инфекций». Особому учету подлежали сведения о заболеваемости ребенка в течение поствакцинального периода (1 год) ОРВИ, острым отитом, пневмонией, менингитом (количество случаев заболеваний и их продолжительность в днях, количество курсов антибактериальной терапии, количество случаев госпитализаций по поводу данных заболеваний и временной утраты трудоспособности родителей детей). На основе данных сведений сформирована статистическая база данных в формате Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из главных индикаторов эффективности профилактической вакцинации является уровень заболеваемости привитого контингента в до- и поствакцинальный периоды. Анализ результатов исследования свидетельствует, что в целом уровень совокупной заболеваемости детей данными нозологическими формами в поствакцинальном периоде уменьшился по сравнению с довакцинальным периодом на 13,6% (с 2743,5 до 2371,5‰). Снижение показателей заболеваемости произошло во всех муниципальных образованиях области. При этом наиболее высокие темпы снижения уровня заболеваемости наблюдаются в городах Белогорске и Свободном, Михайловском и Ивановском районах, достигая 20 — 23%.

Уровень совокупной заболеваемости детей определяет заболеваемость острыми респираторными вирусными инфекциями, частота распространения которых превалирует среди других нозологических форм патологии. Поэтому характеристики заболеваемости ОРВИ почти полностью совпадают с аналогичными параметрами совокупной заболеваемости. Общий темп снижения уровня заболеваемости ОРВИ в поствакцинальном периоде составил 13,5%.

Число заболеваний пневмонией, зарегистрированных в наблюдаемой популяции детей, снизилось в поствакцинальном периоде в 2,3 раза, что подтверждено результатами эпидемиологического мониторинга. При этом наиболее существенное снижение заболеваемости пневмонией в поствакцинальном периоде наблюдалось в Благовещенском (с 25,0 до 6,2‰) и Ивановском районах (с 43,4 до 10,8‰), в г. Белогорск (с 40,5 до 11,9‰).

Вместе с тем, в целом на территории области динамики заболеваемости детей острым отитом в поствакцинальном периоде не наблюдалось (42,2‰). При этом в г. Белогорск и Ивановском районе зарегистрировано снижение уровня заболеваемости детей острым отитом соответственно на 35,2 и 50,0%.

Таким образом, сравнительный анализ показателей заболеваемости детей в до- и поствакцинальный периоды свидетельствует, что если уровень заболеваемости острым отитом остался без видимой динамики, то уровень заболеваемости пневмонией после вакцинации снизился в 2,3 раза. При этом динамика показателей является различной как по вектору, так и по уровню этих изменений в различных возрастных группах детей. В частности, если в младших возрастных группах детей уровень совокупной заболеваемости в поствакцинальном периоде увеличился на 3,3% (до 2 лет) и на 1,9% (от 2 до 3 лет), то в старших возрастных группах уровень совокупной заболеваемости снижался. При этом темп снижения показателей заболеваемости с возрастом увеличивался, достигая среди детей старше 5 лет 24,6% при максимальном значении этого показателя в Тамбовском районе (-64,0%).

Уровень совокупной заболеваемости, имеющей инфекционную этиологию, является наиболее высоким в отдельных муниципальных образованиях области: городах Благовещенск (2937,6 — 3160,2‰), Белогорск (3317,4 — 2565,6‰), Свободном (2546,8 — 2036,4‰), Ивановском (4 114,1 — 3293,4‰) и Благовещенском (3068,7 — 2662,5‰) районах. При этом величина инфекционного индекса имеет сильную обратную зависимость от возраста ( $\rho = -1,0$ ) и только в старшей возрастной группе детей (старше 5 лет) соответствует нормативным значениям (0,2 — 0,3). В целом инфекционный индекс среди детей возрастной группы старше 5 лет (0,31) в 4,5 раза меньше, чем среди детей в возрастной группе менее 2 лет (1,4). В отдельных муниципальных образованиях и возрастных группах детей значения ИИ различаются в 41,3 раза.

В качестве основных индикаторов эффективности вакцинации детей против пневмококковой инфекции (кроме показателей частоты возникновения заболеваний инфекционной этиологии) определены: совокупная продолжительность болезни детей до и после вакцинации, количество курсов антибактериальной терапии, частота госпитализации заболевших детей и количество дней временной

нетрудоспособности их родителей по причине болезни детей в до- и поствакцинальные периоды. Также использованы специальные критерии и показатели оценки эффективности реализации профилактических мероприятий.

Анализ индикаторов эффективности вакцинации детей против пневмококковой инфекции свидетельствует, что в поствакцинальном периоде суммарная продолжительность болезни детей сократилась на 14,6%, количество курсов антибактериальной терапии уменьшилось на 21,3%, количество случаев госпитализации детей — на 38,4%, количество дней временной утраты трудоспособности их родителей — на 11,1% по сравнению с довакцинальным периодом. Наиболее существенное снижение показателя суммарной продолжительности болезни наблюдалось в городах Белогорске (-24,0%) и Свободном (-20,5%), Михайловском (-21,5%) и Ивановском районах (-20,8%). Позитивная динамика показателя (снижение от 19,8 до 35,6%), характеризующего частоту назначения курсов антибактериальной терапии заболевшим детям в до- и поствакцинальные периоды, также зарегистрирована в большинстве муниципальных образований области. А суммарное количество дней временной утраты трудоспособности родителей по причине болезни их детей в поствакцинальном периоде наиболее существенно (на 57,5%) снизилось в Свободненском районе.

Однако наиболее существенные позитивные изменения индикатора эффективности вакцинации наблюдаются в отношении частоты госпитализации детей. В поствакцинальном периоде в большинстве муниципальных образований количество госпитализаций детей снизилось в 2,0 — 2,5 раза (Тамбовский, Михайловский, Ивановский, Белогорский районы), в 3,0 раза (город Свободный, Константиновский район) и даже в 4,5 раза (Свободненский район).

Сравнительный статистический анализ степени эффективности вакцинации против пневмококковых инфекций с использованием вакцины Превенар-13 для профилактики различных заболеваний инфекционной этиологии у детей показал ее высокую эффективность только в отношении пневмонии. Коэффициент профилактической эффективности вакцинации детей с целью профилактики пневмонии составляет 58,1%. При этом в большинстве муниципальных образований области КЭ по индикатору заболеваемости пневмонией достигает уровня 75 — 100%. Установлено, что имеется прямая зависимость степени эффективности вакцинации против пневмококковой инфекции от возраста детей: чем больше возраст ребенка, тем выше эффективность ( $\rho=1,0$ ). Если в младшей возрастной группе детей коэффициент эффективности имеет отрицательное значение (-3,3%), то в старшей возрастной группе детей он возрастает почти до 25%.

Анализ результатов эпидемиологического мониторинга заболеваемости населения внебольничными пневмониями на территории Амурской области свидетельствует, что среди детского контингента темп снижения показателей заболеваемости за 2013 — 2014 годы значительно больше (37,1%), чем среди взрослого населения (10,9%).

В целом за 2014 год уровень заболеваемости населения внебольничной пневмонией на территории Амурской области снизился по сравнению с 2013 годом на 18,5% в 4 городских округах и 10 сельских районах области. За счет снижения заболеваемости населения внебольничной пневмонией на 1014 случаев предотвращен экономический ущерб в размере 94 млн руб.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют, что реализация программы клинико-эпидемиологического мониторинга и профилактики внебольничных пневмоний с использованием вакцины против пневмококковой инфекции на территории Амурской области имеет высокий уровень медицинской и социально-экономической эффективности. В качестве основных характеристик эффективности наблюдается снижение уровня заболеваемости пневмонией вакцинированного контингента населения, продолжительности болезни, уменьшение количества курсов антибактериальной терапии и дней временной утраты трудоспособности родителей по причине болезни их детей остры-

ми респираторными заболеваниями. При этом установлена прямая зависимость степени эффективности вакцинации против пневмококковой инфекции от возраста детей.

Результаты исследования по клинико-эпидемиологической оценке эффективности использования вакцинации против пневмококковых инфекций, проведенные в популяции детей на территории Амурской области, позволяют рекомендовать применение конъюгированной вакцины Превенар-13 как эффективного метода профилактики пневмонии и пневмококковых инфекций в комплексе противоэпидемических и профилактических мероприятий.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белошицкий Г.В., Королева И.С. Серотиповая характеристика штаммов *S. pneumoniae* в Москве. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 1 (74): 90-97.
2. Биличенко Т.Н., Чучалин А.Г., Сон И.И. Основные итоги развития специализированной медицинской помощи больным пульмонологического профиля на территории Российской Федерации за период 2004-2010 гг. Пульмонология. 2012, 3: 5-16.
3. Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции. Федеральные клинические рекомендации. М., 2015.
4. Заболеваемость всего населения России в 2002 — 2012 гг. Центральный НИИ организации и информатизации здравоохранения МЗ РФ. М., 2013; <http://www.mednet.ru/>.
5. Колосов В.П. и др. Эпидемиологические особенности внебольничных пневмоний в Амурской области: проблемы и пути решения. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2014, 53: 8-17.
6. Колосов В.П. Заболевания органов дыхания на Дальнем Востоке России: эпидемиологические и социально-гигиенические аспекты. Владивосток, Дальнаука, 2013.
7. Лобзин Ю.В., Сидоренко С.В., Харит С.М. и др. Серотипы *Streptococcus pneumoniae*, вызывающих ведущие нозологические формы пневмококковых инфекций. Инфектология. 2013, 5 (4): 35-41.
8. Резолюция Междисциплинарного совета экспертов «Современные подходы к вакцинопрофилактике пневмококковой инфекции у взрослых и пациентов групп риска». Пульмонология. 2013, 6: 139-142.
9. Тарасюк С.Д., Манаков Л.Г. Медико-социальная оценка условий оказания пульмонологической помощи и организационно-методических механизмов ее управления в системе первичной медико-санитарной помощи населению. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2014, 51: 54-61.
10. Таточенко В.К. Пневмококковая инфекция: современный взгляд на проблему и профилактику. Вопросы современной педиатрии. 2007, 5 (1): 107-112.
11. EMA Oct. 2011: European public assessment report (EPAR) for PCV13 (First published in May 2009, last updated in October 2011) EMA/562289/2011. <http://www.ema.europa.eu/home>.
12. <http://www.cdc.gov/vaccines/schedules/hcp/index.html>.
13. Paradiso Peter R. Pneumococcal conjugate vaccine for adults: A new paradigm. Vaccines CID 2012, 55 (15): 259-264.
14. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization — WHO position paper. Weekly Epidemiol. Rec. 2007, 82 (12): 93-104.
15. WHO position paper on pneumococcal vaccines. Weekly Epidemiol. Rec. 2012, 14 (6): 129-144; [www.who.int](http://www.who.int).

*Поступила 16.02.16*

Контактная информация: Колосов Виктор Павлович, д.м.н., проф.,  
675000, Благовещенск, ул. Калинина, 22, р.т. (4162)77-28-00



## СЛУЧАЙ ЗАВОЗА ВИРУСА ГЕПАТИТА Е 4 ГЕНОТИПА В РОССИЮ

<sup>1</sup>Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, Московская обл.;

<sup>2</sup>Российская медицинская академия последипломного образования, Москва

*Цель.* Описание первого документированного случая завозного гепатита Е, ассоциированного с 4 генотипом ВГЕ и импортированного с юга Франции. *Материалы и методы.* Проведен клинический, эпидемиологический и лабораторный анализ завозного случая заболевания гепатитом Е. Выполнен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей изолята ВГЕ, выделенного от пациента. *Результаты.* Эпидемиологический анализ позволил предположить завозной характер выявленного случая ВГЕ-инфекции. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей участков открытой рамки считывания 2 (300 нт) и открытой рамки считывания 1 (721 нт) генома ВГЕ, выделенного от пациента, показал идентичность данного изолята вариантам ВГЕ генотипа 4, выделенным во Франции в 2009 — 2011 гг. от пациентов с автохтонным гепатитом Е. *Заключение.* Полученные результаты подтверждают случай завоза в Россию ВГЕ 4 генотипа с юго-востока Франции (Корсика), где на протяжении последних лет наблюдается распространение данного генотипа вируса.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 64—69

Ключевые слова: гепатит Е, завозной случай, вирус гепатита Е, генотип

М.И. Mikhailov<sup>1</sup>, Е.Ю. Malinnikova<sup>1,2</sup>, К.К. Kyuregyan<sup>1</sup>, О.В. Isaeva<sup>1</sup>

## A CASE OF IMPORT OF GENOTYPE 4 HEPATITIS E VIRUS INTO RUSSIA

<sup>1</sup>Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalites, Moscow Region; <sup>2</sup>Russian Medical Academy of Post-Graduate Education, Moscow, Russia

*Aim.* Description of the first documented case of imported hepatitis E, associated with genotype 4 of HEV and introduced from southern France. *Materials and methods.* Clinical, epidemiologic and laboratory analysis of the imported case of disease of hepatitis E was carried out. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of HEV isolate, taken from the patient, was carried out. *Results.* Epidemiologic analysis allowed to assume imported character of the detected case of HEV-infection. Comparative analysis of nucleotide sequences of regions of the open reading frame 2 (300 nt) and open reading frame 1 (721 nt) of HEV genome, isolated from the patient, showed identity of this isolate with variants of genotype 4 HEV, isolated in France in 2009 — 2011 from patients with autochthonous hepatitis E. *Conclusion.* The results obtained confirm the case of import into Russia of genotype 4 HEV from south-eastern France (Corsica), where spread of this virus genotype is observed in recent years.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 64—69

Key words: hepatitis E, imported case, hepatitis E virus, genotype

## ВВЕДЕНИЕ

Гепатит Е (ГЕ) является острым вирусным заболеванием печени, вызываемым РНК-содержащим безоболочечным вирусом, передающимся преимущественно фекально-оральным путем [6]. Выделяют четыре основных генотипа вируса гепатита Е (ВГЕ), при этом генотипы 1 и 2 способны инфицировать только человека, именно с этими генотипами связана заболеваемость ГЕ в развивающихся странах тропического пояса, где данная инфекция является эндемичной. Случаи устой-

чивой циркуляции ВГЕ 1 или 2 генотипа на неэндемичных территориях не описаны. Генотипы 3 и 4 способны инфицировать, помимо человека, также некоторые виды животных (диких и домашних свиней, оленей). ВГЕ 3 и 4 генотипов выделяют у животных как на эндемичных, так и на неэндемичных по ГЕ территориях, однако именно на неэндемичных территориях, к которым относятся регионы с умеренным климатом, эти генотипы вируса вызывают заболевание человека [11]. Большинство случаев ГЕ, вызванных генотипом 4, регистрируется в Китае, при этом сообщается о более выраженной патогенности 4 генотипа по сравнению с генотипом 3 [7]. В странах умеренного климата, в том числе в России, случаи ГЕ регистрируются относительно редко, и могут быть условно разделены на две группы — завозные случаи, ассоциированные с генотипом 1 ВГЕ, и автохтонные случаи, вызванные, как правило, генотипом 3 [1]. Завозные случаи в России, как правило, связаны с поездками в Индию или страны Юго-Восточной Азии [2]. В данной работе представлено первое описание завозного случая ГЕ, ассоциированного с 4 генотипом ВГЕ и импортированного с юга Франции. Генотип вируса, как и регион (неэндемичный), откуда он был импортирован, являются нехарактерными для эпидемиологии ГЕ, и, по-видимому, описанный нами случай может являться отражением изменений в эпидемиологии ГЕ на территориях, которые традиционно считались неэндемичными по данной инфекции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Больной F., 23 лет, москвич. Заболел 25.08.2012 г., обратился к врачу 03.09.2012 г. Был заподозрен вирусный гепатит. От госпитализации отказался, поэтому клинико-эпидемиологическое расследование, мониторинг клинических и биохимических анализов крови, общего анализа мочи, определение факторов свертывания крови, УЗИ органов брюшной полости проводились амбулаторно.

У больного исследовали сыворотку крови на маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С, Е, цитомегаловирусом и вирусом Эпштейна-Барр. Определение серологических маркеров инфицирования вирусами гепатитов А (анти-ВГА IgM и IgG), Е (анти-ВГЕ IgM и IgG), В (HBsAg, HBc IgM и IgG), С (анти-ВГС IgM + IgG) проводили с помощью коммерческих диагностических тест-систем производства НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород).

Выделение нуклеиновых кислот из сыворотки крови проводили на приборе «MagNA Pure Compact» (Roche Diagnostics Ltd.) с использованием наборов для выделения «MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit 1 — Large Volume» из объема образца, равного 1 мл. Выявление РНК ВГЕ проводили методом обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с вырожденными праймерами к участку открытой рамки считывания 2 (ОРС2) ВГЕ. Использовали следующие олигонуклеотиды: внешняя пара праймеров — 5'-aaytatgcmcagtagccgggttg-3' (прямой) и 5'-cccttatcctgctgagcattctc-3' (обратный), внутренняя пара праймеров — 5'-gtyatgytytgacatacggct-3' (прямой) и 5'-agccgacgaaatyaattctgtc-3' (обратный).

Первый раунд ПЦР проводили совместно с ОТ, условия реакции были следующими: 42°C — 1 час, затем 5 мин. — 94°C (денатурация и инактивация фермента обратной транскриптазы), затем 35 циклов: 94°C — 30 сек, 45°C — 30 сек, 72°C — 45 сек, финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Условия для второго раунда ПЦР — 35 циклов: 94°C — 30 сек, 45°C — 30 сек, 72°C — 45 сек, финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Полученные продукты ПЦР, соответствующие ВГЕ, определяли в 1,5% агарозном геле в ТВЕ. Величина продукта амплификации для ВГЕ составляла 350 пар оснований.

Дополнительно амплифицировали участок открытой рамки считывания 1 генома ВГЕ. Использовали следующие олигонуклеотиды: внешняя пара прайме-

ров — 5'-actactgcyattgagcaggctgctct-3' (прямой) и 5'-amarggatggkgagccgcccagggcc-3' (обратный), внутренняя пара праймеров — 5'-aaytcygccttkgcgaatgctgtggt-3' (прямой) и 5'-gaacgagggtarggracraaggcat-3' (обратный). Условия реакции были теми же, что и для амплификации фрагмента OPC2 ВГЕ, кроме температуры отжига — для обеих пар праймеров она составляла 50°C. Амплифицированные фрагменты выделяли из агарозного геля с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (производство QIAGEN) и секвенировали на автоматическом секвенаторе CEQ8800 (Beckman Coulter) с использованием набора «GenomeLabTMMethods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing» (Beckman Coulter). Анализ нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы MEGA (версии 5.2). Филогенетические деревья строили по алгоритму объединения ближайших соседей (neighbour-joining, NJ) при помощи программы Clustal W. Для получения показателей достоверности филогенетического группирования проанализировали по 1000 случайных выборок (bootstrap pseudoreplicates). Согласно общепринятым нормам, показатели достоверности филогенетического группирования более 70% считались достоверными.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Пациент F. заболел 25.08.2012 г., когда почувствовал тошноту, плохой аппетит, зуд кожи. Рвоту, озноб, боли в животе — отрицает. Слабость почувствовал однократно, после физической нагрузки. Отмечал два эпизода жидкого стула без примесей. Температуру тела не измерял, т.к. не было ощущения подъема температуры. 28.08.2012 г. заметил насыщенный цвет мочи и осветленный стул. 03.09.2012 г. обратился к врачу. После осмотра врач заметил иктеричность склер, кожу цвета загара с желтоватым оттенком. Был заподозрен вирусный гепатит. Больной был обследован амбулаторно (см. «Материалы и методы»).

Методом ИФА сыворотка крови больного F. исследована на маркеры гепатитов А, В, С и Е. Результаты представлены в табл. Выявление анти-ВГЕ IgM позволило предположить острый гепатит Е у пациента. Подтверждением этиологической роли ВГЕ в возникновении острого гепатита у пациента F. послужило обнаружение РНК ВГЕ в образце сыворотки крови, а также появление анти-ВГЕ IgG в образце сыворотки крови, взятом через два месяца после начала заболевания.

Из эпидемиологического анамнеза известно, что перед заболеванием с июня по август 2012 г. пациент периодически жил на Корсике (по 10 — 14 дней в месяц).

**Результаты выявления маркеров вирусных гепатитов в образцах сыворотки крови пациента F.**

Маркер	Дата		
	03.09.12	17.09.12	24.10.12
HBsAg	Отр.	н.т.	Отр.
Анти-НВсоре	Отр.	н.т.	Отр.
Анти-НВs	Пол.	н.т.	Пол.
Анти-ВГС	Отр.	н.т.	Отр.
Анти-ВГА IgG	Отр.	н.т.	Отр.
Анти-ВГА IgM	Отр.	н.т.	Отр.
Анти-ВГЕ IgM	Пол.	Пол.	Пол.
Анти-ВГЕ IgG	Отр.	Отр.	Пол.
РНК ВГЕ	Пол.	Отр.	Отр.

Примечание. Н.т. — не тестировали.

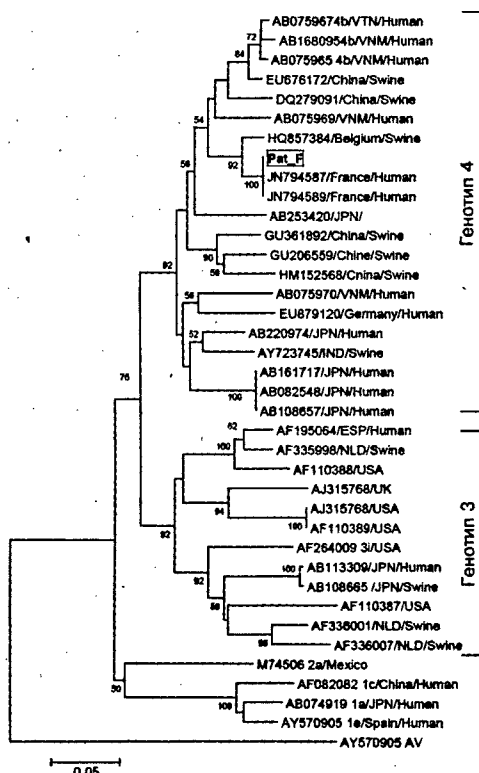
Ел разнообразную пищу, в том числе дегустировал мясные продукты (сырокопченые и кровяные колбасы) в разных деревенских частных лавках. Питался не только домашней пищей, но и в мелких ресторанах, ел плохо прожаренную говядину, морепродукты, в том числе, в виде суши и ролл. Воду пил преимущественно бутилированную. Молоко употреблял пакетированное. До июня 2012 г. из Москвы в течение года не выезжал. Операции, донорство, парентеральные манипуляции отрицает, стоматолога не посещал более 6 месяцев. Контакта с лихорадящими, желтушными больными не было. В семье все здоровы. Перенесенные заболевания — 10 лет назад госпитализирован вместе с семьей в Турции по поводу отравления. Диагноз не помнит. Мононуклеоз в 2010 году. Гепатитом, туберкулезом не болел.

Были построены филогенетические деревья для соответствующих фрагментов генома ВГЕ. Филогенетический анализ последовательностей фрагментов ORC1 (рис.) и ORC2 изолята ВГЕ показал его принадлежность к 4 генотипу. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей участка ORC2 (300 нт) и ORC1 (721 нт) с последовательностями, депонированными в базе данных NCBI, показал наибольшее сходство данного изолята с вариантами ВГЕ генотипа 4, выделенными во Франции в 2009 — 2011 гг. от пациентов с автохтонным гепатитом Е.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в Российской Федерации резко увеличилось количество людей, выезжающих на отдых в другие страны. Причем, многие из них посещают государства, эндемичные по многим инфекциям, в том числе и ГЕ. В работе представлено клиническое, эпидемиологическое и вирусологическое описание первого случая завоза ВГЕ 4 генотипа в Россию. Импортированные случаи ГЕ встречаются в течение нескольких недель после путешествия в эндемичные страны и чаще всего описаны среди иммигрантского населения. Завозные инфекции ВГЕ составляют от 10% (например, во Франции) до  $\frac{2}{3}$  всех регистрируемых случаев (например, в США) и связаны с 1 или 2 генотипом вируса [10].

Эпидемиологический анализ выявленного нами случая острого ГЕ указывает на высокую вероятность его завозного характера. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности участка ORC2 ВГЕ, выделенного от пациента, с последовательностями, депонированными в базе данных NCBI, показал наибольшее сходство данного изолята с вариантами ВГЕ генотипа 4, выделенными во Франции в 2009 — 2011 гг. от пациентов с автохтонным гепатитом Е. Степень сходства с последовательностью ВГЕ генотипа 4, выделенной от пациента с автохтонным гепатитом Е на востоке Франции в 2009 г., составила 98%, а с последовательностями ВГЕ того же генотипа, выделенными на юго-востоке Франции в 2011 г. от 5 пациентов с автохтонным гепатитом Е, составила 98 — 99%. Все эти последовательности относятся к субгенотипу 4b и рассматриваются авторами, их описавшими, как один штамм ВГЕ, циркулирующий во Франции [3]. Следует отметить, что для генотипа 4 ВГЕ характерны различия на уровне субгенотипа 12,1 — 18,0%, на уровне изолята — 5,8 — 10,2% [12]. Последовательность ВГЕ, выделенная от пациента F., на филогенетическом дереве формировала единый кластер с упо-



**Филогенетическое дерево на основании частичной последовательности генома ВГЕ открытой рамки считывания ORC1 (721 нуклеотид, позиции 131-851, нумерация по прототипному изоляту Burme — M73218).**

Pat\_F — изолят, выделенный от пациента F. Для каждого изолята указаны номер в GenBank, генотип/субгенотип, страна происхождения и организм, из которого он выделен.

минавшимися выше 6 последовательностями, выделенными во Франции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что инфекция у пациента F была вызвана тем же штаммом, что и случаи автохтонного гепатита E, ассоциированного с 4 генотипом вируса, во Франции. Наиболее близкими к данному штамму ВГЕ вариантами вируса 4 генотипа оказались последовательности, выделенные на юго-западе Китая от макаков-резус (степень сходства составила 94,2 — 94,5%), а также последовательности, выделенные в том же регионе от людей со спорадическим гепатитом E и от свиней (степень сходства 94,2% и 94,6 — 94,9% соответственно).

Поскольку количество выделенных на территории Европы последовательностей участка ORC2 ВГЕ генотипа 4 ограничено, для расширения возможностей анализа нами была определена нуклеотидная последовательность участка ORC1 (721 нт) (рис.). Филогенетический анализ последовательностей участка ORC1 ВГЕ дал результаты, сходные с полученными при анализе ORC2. Выделенная нами от пациента F последовательность оказалась идентична (степень сходства 99 — 100%) последовательностям, выделенным P. Colson et al. от пациентов на юго-востоке Франции, употреблявших в пищу сырую колбасу из свиной печени. Для троих пациентов в указанном исследовании основным предполагаемым фактором риска инфицирования является употребление в пищу данного продукта [4]. Сходство с изолятом ВГЕ 4 генотипа, выделенным в 2006 — 2007 г. в Германии от пациента с автохтонным гепатитом [13], составило всего 85%, что аналогично 86% сходства, полученным P. Colson et al. при сравнении французских последовательностей ВГЕ 4 генотипа с этим изолятом. Степень сходства между выделенной от пациента F последовательностью ORC1 и единственными последовательностями 4 генотипа ВГЕ, выделенными на территории Европы от свиней в Бельгии в 2008 г. [8], составила 95%. Сходным образом, выделенные P. Colson et al. последовательности ORC1 ВГЕ 4 генотипа имели сходство с бельгийскими свиными изолятами (96,7%) [3].

Необходимо отметить, что описанные ранее в литературе изоляты ВГЕ, выделенные из колбасы из свиной печени и от пациентов во Франции, заболевших гепатитом E в результате употребления данного продукта, относились к 3 генотипу ВГЕ [5]. Также к 3 генотипу относятся все изоляты ВГЕ, выделенные нами от свиней и от пациентов с автохтонным гепатитом E на территории Российской Федерации.

Степень сходства последовательности участка ORC2 ВГЕ, выделенного от пациента F, с последовательностями того же участка вирусного генома 3 генотипа, выделенными от пациентов с автохтонным гепатитом E, наблюдавшимися в России, составила всего 74 — 76%. Аналогичный показатель при сравнении со свиными изолятами, выделенными на территории Российской Федерации, составил 75 — 80%. Таким образом, анализируемый случай не был связан с известными вариантами ВГЕ, циркулирующими на территории России.

Учитывая практически полную идентичность последовательности участков ORC1 и ORC2 генома ВГЕ, выделенной от пациента F, с последовательностями, выделенными от французских пациентов, заразившихся ВГЕ 4 генотипа при употреблении в пищу термически необработанных продуктов из свинины, наиболее вероятным источником инфицирования ВГЕ для пациента F представляется колбаса из свиной печени, приготовленная во Франции. Необходимо отметить, что накопленные за последние годы данные по регистрации случаев GE и частоте выявления анти-ВГЕ среди населения позволяют рассматривать юго-восток Франции как регион, где данная инфекция распространена довольно широко [9].

Таким образом, это первый документированный случай завоза GE из региона,

не являющегося эндемичным по данной инфекции, и первый импортированный случай заболевания в России, вызванного 4 генотипом ВГЕ. Увеличение мобильности населения в сочетании с ростом наших знаний о циркуляции ВГЕ в регионах умеренного климата позволяет ожидать увеличение числа таких случаев и рекомендовать обследование на маркеры гепатита Е для пациентов с острым гепатитом, имеющих в эпиданамнезе поездки не только в регионы, традиционно считающиеся эндемичными по данной инфекции.

*Проект осуществлен при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0064.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Быстрова Т. Н., Полянина А. В., Княгина О. Н. Качественные и количественные параметры эпидемического процесса гепатит Е-инфекции на территории Среднеевропейского региона России. Мир вирусных гепатитов. 2010, 1: 9-13.
2. Михайлов М.И., Шахильдян И.В., Онищенко Г.Г. Энтеральные вирусные гепатиты (этиология, эпидемиология, диагностика, профилактика). М., ВУНМЦ Росздрава, 2007.
3. Colson P., Swiader L., Motte A. et al. Circulation of almost genetically identical hepatitis E virus of genotype 4 in France. J. Clin. Virol. 2012, 55 (2): 181-183.
4. Colson P., Romanet P., Moal V. et al. Autochthonous infections with hepatitis E virus genotype 4, France. Emerg. Infect. Dis. 2012, 18 (8): 1361-1364.
5. Colson P., Borentain P., Queyriaux B. et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. J. Infect. Dis. 2010, 202 (6): 825-834.
6. Emerson S.U., Purcell R.H. Hepatitis E virus. Rev. Med. Virol. 2003, 13: 145-154.
7. Geng J.B., Wang M.R., Wang L. et al. Genetic characteristics and pathogenicity of human hepatitis E virus in Nanjing, China. World J. Gastroenterol. 2012, 18: 965-970.
8. Hakze-van der Honing R.W. et al. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. PLoS One. 2011, 6 (8): e22673.
9. Izopet J., Labrique A.B., Basnyat B. et al. Hepatitis E virus seroprevalence in three hyperendemic areas: Nepal, Bangladesh and southwest France. J. Clin. Virol. 2015, 70: 39-42.
10. Khuroo M.S. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. Virus Res. 2011, 161 (1): 3-14.
11. Lewis H.C., Wichmann O., Duizer E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. Epidemiol. Infect. 2010, 138: 145-166.
12. Lu L., Li C., Hagedorn C.H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. Rev. Med. Virol. 2006, 16 (1): 5-36.
13. Wichmann O., Schimanski S., Koch J. et al. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. J. Infect. Dis. 2008, 198 (12): 1732-1741.

*Поступила 14.12.15*

Контактная информация: Исаева Ольга Владиславовна, к.б.н., 142782, Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, 27 км Киевского шоссе, р.т. (495)841-90-12

Ю.А.Панфёрова<sup>1</sup>, О.А.Фрейлихман<sup>1</sup>, Н.К.Токаревич<sup>1</sup>, С.Ф.Карпенко<sup>2</sup>, Х.М.Галимзянов<sup>2</sup>

**СРАВНЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ COXIELLA BURNETII В КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛИХОРАДКОЙ КУ НА ОСНОВЕ АМПЛИФИКАЦИИ ФРАГМЕНТОВ ГЕНА 16S рРНК (СТАНДАРТНАЯ ПЦР) И ГЕНА groEL (ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ)**

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

*Цель.* Сравнение диагностических возможностей двух вариантов ПЦР для выявления персистенции *Coxiella burnetii* в динамике инфекционного процесса у больных лихорадкой Ку. *Материалы и методы.* Было исследовано 110 проб клинического материала, полученного от больных лихорадкой Ку в эндемичном для данной инфекции регионе (Астраханская область). Пробы были исследованы в стандартной ПЦР (маркер — фрагмент гена 16S рРНК) и в ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) (маркер — фрагмент гена groEL). *Результаты.* Было установлено, что оба маркера являются перспективными для обнаружения ДНК *C. burnetii* в клиническом материале, а РВ-ПЦР выявляет положительный результат, в том числе на поздних сроках заболевания (21 — 31 день болезни). *Заключение.* Данная работа является первой российской публикацией о сравнении разных вариантов ПЦР для выявления *C. burnetii* в крови больных Ку-лихорадкой в динамике инфекционного процесса.

Журн. микробиол, 2016, № 3, С. 70—74

Ключевые слова: лихорадка Ку, *Coxiella burnetii*, ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, чувствительность, диагностическая эффективность

Yu.A.Panferova<sup>1</sup>, O.A.Freilikhman<sup>1</sup>, N.K.Tokarevich<sup>1</sup>, S.F.Karpenko<sup>2</sup>, Kh.M.Galimzyanov<sup>2</sup>

**COMPARISON OF DIAGNOSTIC EFFECTIVENESS OF METHODS OF DETECTION OF COXIELLA BURNETII IN BLOOD OF PATIENTS WITH Q FEVER BASED ON AMPLIFICATION OF 16S rRNA GENE FRAGMENTS (STANDARD PCR) AND groEL GENE (REAL-TIME PCR)**

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

*Aim.* Comparison of diagnostic capabilities of 2 variants of PCR for detection of *Coxiella burnetii* persistence in dynamics of infectious process in patients with Q fever. *Materials and methods.* 110 samples of clinical material, obtained from patients with Q fever in an endemic region for this infection (Astrakhan region), were studied. The samples were studied in a standard PCR (marker — 16S rRNA gene fragment) and in real-time PCR (RT-PCR) (marker — groEL gene fragment). *Results.* Both markers were established to be perspective for detection of *C. burnetii* DNA in clinical material, and RT-PCR detects positive result including late stages of the disease (illness day 21 — 31). *Conclusion.* This study is the first Russian publication on comparison on different PCR variants for detection of *C. burnetii* in blood of Q fever patients in dynamics of the infectious process.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 70—74

Key words: Q fever, *Coxiella burnetii*, PCR, real-time PCR, sensitivity, diagnostic effectiveness

## ВВЕДЕНИЕ

Лихорадка Ку представляет собой распространенное по всему миру зооантропонозное заболевание, вызываемое облигатным внутриклеточным патогеном *S. burnetii*. Острая форма лихорадки Ку часто проявляется в виде гриппоподобного заболевания, атипичной пневмонии, сопровождающейся головной и периорбитальной болью, и реже гепатитом [4, 12]. В зависимости от состояния пациента и его иммунного статуса, примерно у пяти процентов больных, не получающих рациональную терапию, может развиваться хроническая форма данной инфекции, сопровождающаяся эндокардитом с высокой степенью летальности в 60 — 70% случаев [8, 9].

Отсутствие патогномических симптомов у больных лихорадкой Ку не позволяет диагностировать эту инфекцию без применения лабораторных методов. Лабораторная диагностика лихорадки Ку, как правило, проводится с помощью серологических методов, таких как реакция непрямой иммунофлюоресценции и иммуноферментный анализ, направленный на выявление антител [7, 9]. Однако данные методы имеют ограниченное применение на ранних сроках заболевания, поскольку процесс образования антител, выявляемых в этих реакциях, может достигать двух недель. Столь позднее обнаружение антител связано с существенной гиподиагностикой лихорадки Ку, в ряде случаев — с нерациональным лечением больных, что может привести к хронизации инфекции. Для прямого определения ДНК *S. burnetii* в клинических образцах за рубежом успешно применяют методы детекции, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, в том числе стандартную ПЦР, гнездовую ПЦР, ПЦР в режиме реального времени и изотермическую реакцию с формированием петель (LAMP) [5, 10, 11]. Для надежного определения ДНК патогена в клиническом материале требуются высокочувствительные модификации ПЦР [8], в частности, ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), основанная на накоплении флуоресцентного сигнала в процессе анализа. Хотя для выявления ДНК *S. burnetii* у экспериментально и естественно зараженных животных успешно применялись различные модификации ПЦР [3, 5, 6], диагностика лихорадки Ку у людей методами детекции, основанными на амплификации нуклеиновых кислот, нашла применение преимущественно за рубежом [11]. Кроме того, остается не ясным, в какие сроки целесообразно применять молекулярные методы детекции и как долго можно обнаруживать ДНК патогена в крови больных, получающих антибиотики.

Астраханская область является эндемичным регионом по заболеваемости лихорадкой Ку [1, 2]. Ранее нами была разработана методика детекции ДНК коксиелл на основе амплификации фрагмента высококонсервативного гена *groEL* в стандартной ПЦР, успешно применяющаяся нами для работы с биологическим материалом (органы мелких диких млекопитающих и иксодовые клещи) [3]. Эти данные побудили нас разработать набор для выявления *S. burnetii* методом ПЦР-РВ с данным генетическим маркером. Целью настоящего исследования являлось сравнение диагностических возможностей двух вариантов ПЦР для выявления персистенции *S. burnetii* в динамике инфекционного процесса у больных лихорадкой Ку.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования были 110 образцов цельной венозной крови пациентов, больных Ку-лихорадкой, на разных сроках болезни и реконвалесценции. Пробы были получены от 97 пациентов со среднетяжелым течением Ку-лихорадки (77 мужчин, средний возраст 30,94 лет; 20 женщин, средний возраст 48,2 лет; средний возраст всех больных 35,25 лет). Все больные находились на лечении в Областной инфекционной клинической больнице им. А.М.Ничоги (ОИКБ) в городе Астрахань. Диагноз ставился на основании клинических данных, эпиде-



миологического анамнеза и результатов лабораторных исследований. Все больные получали антибиотики (доксциклин, амоксиклав, цефтриаксон либо ципрофлоксацин) по стандартной схеме.

У части больных был проведен анализ крови методом ПЦР на ранних сроках заболевания (преимущественно 4 — 10 день болезни, на высоте лихорадки) в лаборатории ОИКБ с коммерческой тест-системой «Амплисенс *Coxiella burnetii*-FL» (ЦНИИЭ, Россия) согласно инструкции. При отрицательном результате ПЦР и в случаях, когда ПЦР не проводилась, диагноз был подтвержден серологическими методами, IgM и IgG к коксиеллам определяли с использованием тест-систем для ИФА, фаза II «*Coxiella burnetii* ELISA kits IgM, IgG» (Vircell, Испания) согласно рекомендациям производителя.

Отбор больных и образцов крови проводился сотрудниками Астраханского государственного медицинского университета. Анализируемые образцы крови однократно замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$  для хранения и пересылки. Выделение ДНК из 200 мкл оттаявшей цельной крови проводили методом лизиса гуанидинизотиоционатом с последующей сорбцией на носителе с помощью набора «Diatom DNA Prep200» (Изоген лаборатория, Россия) согласно инструкции.

Стандартная ПЦР, ПЦР-РВ и секвенирование фрагмента гена 16S рРНК проводилось в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Стандартную ПЦР проводили с праймерами *gibo-F TTCTCAAGGGTAATATCCTTG* и *gibo-R CGCTACTAAGAAGTGAACCTC*, фланкирующими фрагмент гена 16S рРНК размером 403 п.н., в термоциклере «Veriti thermal cycler» (Life Technologies, США). Амплификация проводилась с использованием готовой пятикратной смеси для ПЦР «PCR ScreenMix» (Евроген, Россия) и включала следующие параметры: денатурация  $95^{\circ}\text{C}$  3 мин., 40 циклов денатурация  $95^{\circ}\text{C}$  15 сек, отжиг  $57^{\circ}\text{C}$  30 сек, элонгация  $72^{\circ}\text{C}$  40 сек. Результаты ПЦР определяли после электрофоретического разделения продукта в 1,5% агарозном геле.

ПЦР в режиме реального времени проводили с оригинальными праймерами *groEL-F STTCTACTGTATGACGCCTTCTTTGC* и *groEL-R CGCAAGTAGG CACCATTCTGTC*, фланкирующими фрагмент гена шаперонина GroEL, и зондом *groEL-Probe FAM-CACCTTTCTCCATCGCTTCCGCAATAATA-BHQ1* (патент РФ № 2525059) в термоциклере «Stratagene MX3005P» (Agilent, США) с детекцией флуоресцентной метки по каналу FAM. Для амплификации применялась пятикратная смесь «qPCR Mix HotStart» (Евроген, Россия). Программа амплификации включала следующие параметры: денатурация  $95^{\circ}\text{C}$  5 мин., 40 циклов денатурация  $95^{\circ}\text{C}$  15 сек, отжиг  $60^{\circ}\text{C}$  30 сек с детекцией флуоресцентного сигнала по конечной точке, элонгация  $72^{\circ}\text{C}$  30 сек.

Часть положительных проб, несущих фрагмент гена 16S рРНК, была секвенирована с использованием генетического анализатора «MegaBase 1000» и набора «BigDye Terminator kit» (Life Technologies, США) согласно рекомендациям производителя. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями гена 16S рРНК *S. burnetii*, депонированными в базе данных NCBI GeneBank, с помощью программы NCBI BLAST.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что применение тест-системы «Амплисенс *Coxiella burnetii*-FL» на первых днях болезни позволило выявить ДНК *S. burnetii* у большей части больных. Так, на 4 — 5 сутки болезни количество положительных проб составило 82,4%, а на 6 — 10 сутки — 75,6% соответственно. Среди проб, проанализированных на более поздних сроках, процент выявляемости ДНК коксиелл в пробах был значительно ниже (50% на 10 — 15 день и ни одной пробы на 21 — 25 день болезни).

С помощью стандартной ПЦР с фрагментом гена 16S рРНК были получены

следующие результаты: на 6 — 10 день болезни было получено 87,5% положительных образцов, на 11 — 15 — 75%, на 16 — 20 — 100%, на 21 — 25 день — 46,2%, на 26 — 31 день — 20%. Отрицательные результаты, полученные с помощью тест-системы «Амплиценс *Coxiella burnetii*-FL» и стандартной ПЦР на поздних сроках инфекции, вероятно, обусловлены недостаточной чувствительностью, не позволяющей с помощью этих методик выявлять небольшое количество коксиелл, циркулирующих в крови пациентов, получающих антибиотики. Средний процент положительных результатов ПЦР с данным маркером составил 76,4% (84 пробы из 110). Проведенный анализ методом секвенирования полученных ампликонов гена 16S рРНК выявил высокую степень гомологии (99%) амплифицированных фрагментов с опубликованными в базах данных GeneBank последовательностями данного гена *C. burnetii* и подтвердил специфическую амплификацию фрагмента гена 16S рРНК в исследованных нами в режиме стандартной ПЦР пробах.

Для ПЦР в режиме реального времени с фрагментом гена *groEL* была отмечена высокая чувствительность практически на всех сроках заболевания. Частота обнаружения ДНК коксиелл составила на 6 — 10 день болезни 97,5%, на 11 — 15 день — 100%, на 16 — 20 — 91,7%, на 21 — 25 и 25 — 31 дни болезни — по 100%. Средний процент положительных результатов ПЦР с данным генетическим маркером составил 98,2% (108 проб из 110).

Таким образом, наибольшая чувствительность среди использованных нами двух оригинальных диагностических систем отмечена для ПЦР-РВ с фрагментом гена *groEL*, в том числе на поздних сроках заболевания (21 — 31 день болезни), что позволяет проводить диагностику методом ПЦР в режиме реального времени даже в период реконвалесценции и при интенсивной антибиотикотерапии.

В ходе работы было установлено, что амплификация целевых фрагментов ДНК *C. burnetii* происходит с неодинаковой частотой для различных вариантов ПЦР. Так, стандартная ПЦР 16S рРНК была положительной в 76,4%, а ПЦР-РВ *groEL* — в 98,2% от общего числа проб.

Установлено, что амплификация таких генетических мишеней, как 16S рРНК и фрагмент гена *groEL*, является высокоэффективным методом детекции коксиелл в крови больных лихорадкой Ку на разных сроках заболевания, в том числе в ходе проведения антибиотикотерапии, когда происходит элиминация патогена из циркулирующей крови. Показана высокая чувствительность ПЦР-РВ с фрагментом гена *groEL* на разных сроках инфекционного процесса, что позволяет не только диагностировать Ку-лихорадку на ранних сроках болезни, когда применение серологических методов, как правило, неэффективно, но и проводить ретроспективный анализ с использованием этого генетического маркера для выявления коксиеллезной этиологии. Данная работа является первой российской публикацией о сравнении разных вариантов ПЦР для выявления *C. burnetii* в крови больных Ку-лихорадкой в динамике инфекционного процесса и позволяет судить об эффективности ПЦР-РВ для выявления ДНК коксиелл на разных сроках заболевания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бармин А.Н., Колчин Е.А., Шуваев Н.С., Дмитриева М.В. Анализ проявления природно-очаговых заболеваний на территории Астраханской обл. *Естес. науки.* 2012, 3 (40): 44-50.
2. Садретдинов Р.А., Галимзянов Х.М. Гемодинамические типы микроциркуляции у больных инфекционными лихорадками. *Фундамент. исслед.* 2010, 7: 63-66.
3. Фрейлихман О.А., Панфёрова Ю.А., Токаревич Н.К. Совершенствование метода детекции *Coxiella burnetii* в биологическом материале на основе амплификации гена *groEL*. *Журн. микробиол.* 2010, 4: 71-74.
4. Arricau-Bouvery N., Hauck Y., Bejaoui A. et al. Molecular characterisation of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiology.* 2006, 6 (38). doi: 10.1186/1471-2180-6-38.

5. Bielawska-Drozd A., Cieslik P., Mirski T. et al. Q fever — selected issues. *Ann. Agric. Environmental Med.* 2013, 20 (2): 222-232.
6. Freylikhman O., Tokarevich N., Suvorov A. et al. persistence in three generation of mice after application of live attenuated human M-44 vaccine against Q fever. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003, 990: 496-499.
7. Jatou K., Peter O., Raoult D. et al. Development of a high throughput PCR to detect *Coxiella burnetii* and its application in a diagnostic laboratory over a 7-year period. *New Microbes New Infect.* 2013, 1 (1): 6-12. doi: 10/1002/2052-2975.8.
8. Marrie T., Raoult D. Q fever—a review and issues for the next century. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 1997, 8 (3): 145-161. doi: 10.1016/S0924-8579(96)00369-X.
9. Maurin M., Raoult D. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 12 (4): 518-553.
10. Raele D., Garofolo G., Galante D. et al. Molecular detection of *Coxiella burnetii* using an alternative loop-mediated isothermal amplification assay. *Veterinaria Italiana.* 2015, 51 (1): 73-78. doi: 10.12834/VetIt.3041168.4.
11. Tilburg J., Melchers W., Pettersson A. et al. Interlaboratory evaluation of different extraction and real-time PCR methods for detection of *Coxiella burnetii* in serum. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48 (11): 3924-3927. doi: 10.1128/JCM.01006-10.
12. van Schaik E., Chen C., Mertens K. et al. Molecular pathogenesis of obligate intracellular bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11 (8): 561-573. doi: 10.1038/nrmicro3049.

*Поступила 04.11.15*

Контактная информация: Панфёрова Юлия Александровна,  
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812)232-21-36

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*А.Ю.Попова<sup>1,2</sup>, А.Н.Куличенко<sup>3</sup>, О.В.Малецкая<sup>3</sup>,  
В.М.Дубянский<sup>3</sup>, А.Г.Рязанова<sup>3</sup>, Д.А.Прислегина<sup>3</sup>,  
Л.И.Шапошникова<sup>3</sup>, Е.А.Манин<sup>3</sup>, Ю.В.Юничева<sup>4</sup>,  
Л.Е.Василенко<sup>4</sup>, Д.С.Агапитов<sup>3</sup>, В.Н.Савельев<sup>3</sup>, Д.Ю.Дегтярев<sup>3</sup>,  
Е.В.Герасименко<sup>3</sup>, Е.В.Лазаренко<sup>3</sup>, А.Ю.Жильцова<sup>3</sup>, А.С.Вольнкина<sup>3</sup>,  
Е.С.Котенев<sup>3</sup>, И.В.Савельева<sup>3</sup>, А.А.Хачатурова<sup>3</sup>, И.В.Кузнецова<sup>3</sup>,  
И.В.Жарникова<sup>3</sup>, Ю.М.Евченко<sup>3</sup>, А.А.Зайцев<sup>3</sup>, А.Д.Антоненко<sup>5</sup>, В.Г.Оробей<sup>5</sup>*

## **ОБЕСПЕЧЕНИЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ В РЕГИОНЕ Г.-К. СОЧИ ПО ОПАСНЫМ И ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ В 2015 ГОДУ**

<sup>1</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва; <sup>2</sup>Российская медицинская академия последипломного образования, Москва; <sup>3</sup>Ставропольский противочумный институт; <sup>4</sup>Сочинское отделение Причерноморской противочумной станции, Сочи; <sup>5</sup>Ставропольский государственный медицинский университет

*Цель.* Анализ результатов эпидемиологического мониторинга особо опасных, природно-очаговых и других инфекционных болезней, а также эпизоотологической активности природных очагов инфекций на территории г.-к. Сочи. *Материалы и методы.* Проведены лабораторные исследования ПЦР, иммуно- и бактериологическими методами 820 проб, из них 344 — клинического материала, 12 — воды открытых водоемов и 321 — полевого материала. Выполнена молекулярно-генетическая идентификация 143 штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных из открытых водоемов г.-к. Сочи. *Результаты.* Установлена циркуляция возбудителей Ку-лихорадки, туляремии и геморрагической лихорадки с почечным синдромом генотипа Добrava-Адлер, а также риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок. При исследовании проб клинического материала в этиологической структуре спорадически возникающих острых кишечных инфекций выявлено преобладание ротавирусов (70,9%). Поддержанию контаминации *V. cholerae* воды р. Агура способствовали относительно высокие значения температуры речной

воды в летние месяцы (от 18 до 30°C), выход в русло реки сульфидных минеральных вод, создающих щелочную среду, сезонное снижение дебита реки и скорости течения воды. *Заключение.* Активность природных очагов инфекционных болезней и контаминация р. Агура *V. cholerae* O1 (атоксигенный) свидетельствуют о необходимости постоянного контроля эпидемиологической обстановки по опасным и природно-очаговым инфекционным болезням на территории г.-к. Сочи, а также изучения региональных особенностей их возбудителей, в том числе с использованием генетических методов.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 74–80

**Ключевые слова:** особо опасные инфекции, природно-очаговые инфекционные болезни, эпидемиологическая обстановка, эпизоотологический мониторинг, острые кишечные инфекции, холерный вибрион, магноиммуносорбент, Ку-лихорадка, туляремия, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом

*A. Yu. Popova*<sup>1,2</sup>, *A. N. Kulichenko*<sup>3</sup>, *O. V. Maletskaya*<sup>3</sup>,  
*V. M. Dubyansky*<sup>3</sup>, *A. G. Ryazanova*<sup>3</sup>, *D. A. Prislegina*<sup>3</sup>,  
*L. I. Shaposhnikova*<sup>3</sup>, *E. A. Manin*<sup>3</sup>, *Yu. V. Yunicheva*<sup>4</sup>,  
*L. E. Vasilenko*<sup>4</sup>, *D. S. Agaptiov*<sup>3</sup>, *V. N. Saveliev*<sup>3</sup>, *D. Yu. Degtyarev*<sup>3</sup>,  
*E. V. Gerasimenko*<sup>3</sup>, *E. V. Lazarenko*<sup>3</sup>, *A. Yu. Zhiltsova*<sup>3</sup>, *A. S. Volynkina*<sup>3</sup>,  
*E. S. Kotenev*<sup>3</sup>, *I. V. Savelieva*<sup>3</sup>, *A. A. Khachaturova*<sup>3</sup>, *I. V. Kuznetsova*<sup>3</sup>,  
*I. V. Zharnikova*<sup>3</sup>, *Yu. M. Evchenko*<sup>3</sup>, *A. A. Zaitsev*<sup>3</sup>, *A. D. Antonenko*<sup>5</sup>, *V. G. Orobey*<sup>5</sup>

#### PROCUREMENT OF SANITARY AND EPIDEMIOLOGICAL WELFARE IN THE REGION OF CITY-RESORT SOCHI FOR DANGEROUS AND NATURAL-FOCI INFECTIOUS DISEASES IN 2015

<sup>1</sup>Federal Service for Surveillance on Consumer Rights' Protection and Human Well-being, Moscow; <sup>2</sup>Russian Medical Academy of Post-Graduate Education, Moscow; <sup>3</sup>Stavropol Institute for Plague Control; <sup>4</sup>Sochi Department of Black Sea Plague Station, Sochi; <sup>5</sup>Stavropol State Medical University, Russia

*Aim.* Analysis of results of epidemiologic monitoring of especially dangerous, natural-foci and other infectious diseases, as well as epizootologic activity of natural foci of infection on the territory of city-resort Sochi. *Materials and methods.* Laboratory studies of 820 samples by PCR, immune- and bacteriologic methods were carried out, among those 344 — clinical material, 12 — water from open bodies and 321 — field material. Molecular-genetic identification of 143 strains of *Vibrio cholerae*, isolated from open water bodies of city-resort Sochi, was carried out. *Results.* Circulation of causative agents of Q fever, tularemia and hemorrhagic fever with renal syndrome of Dobrava-Adler genotypes was established, as well as rickettsia of tick spotted fever group. Predomination of rotaviruses (70.9%) was detected during study of samples of clinical material in etiologic structure of sporadically emerging acute intestine infections. Relatively high temperature values of river water during summer months (from 18 to 30°C), exit of sulfide mineral waters into the riverbed, that create alkaline medium, seasonal reduction of river debit and speed of water current facilitated sustenance of contamination of water of Agura river by *V. cholerae*. *Conclusion.* Activity of natural foci of the infectious disease and contamination of Agura river by *V. cholerae* O1 (atoxigenic) gives evidence on the necessity of constant control of epidemiologic situation by dangerous and natural-foci infectious diseases on the territory of city-resort Sochi, as well as study regional features of their causative agents, including using genetic methods.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 74–80

**Key words:** especially dangerous infections, natural-foci infectious diseases, epidemiologic situation, epizootologic monitoring, acute intestine infections, cholera vibrio, magnoimmunosorbent, Q fever, tularemia, hemorrhagic fever with renal syndrome

## ВВЕДЕНИЕ

Современный Сочи — уникальный круглогодичный курорт, после Олимпийских игр получивший статус спортивного, туристического, культурного и делового центра России, который ежегодно посещают порядка 5,5 — 6 млн человек. Здесь регулярно проводятся различные массовые мероприятия, в том числе международного уровня. Так, в 2015 г. город-курорт Сочи стал местом проведения автогонок «Формула 1. Гран-при России», международного конкурса молодых исполнителей «Новая волна-2015», XIV Международного инвестиционного форума «Сочи-2015».

Как известно, кратковременное увеличение плотности населения ведет к повышению нагрузки на коммунальные системы жизнеобеспечения, объекты питания и медицинские службы, что формирует условия для возникновения эпидемиологического риска, а приток гостей из различных регионов мира способствует увеличению риска заноса инфекций с других территорий. Помимо этого, г.-к. Сочи является эндемичным по ряду природно-очаговых, в том числе трансмиссивных инфекционных болезней: клещевому боррелиозу (болезнь Лайма), геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС), кишечному иерсиниозу, псевдотуберкулезу, лептоспирозу [2, 4].

С учетом изложенного, для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия по опасным и природно-очаговым инфекционным болезням в 2015 году в г.-к. Сочи были приняты дополнительные меры противодействия биологической угрозе. На базе Сочинского отделения Причерноморской противочумной станции Роспотребнадзора (СПЧО) на функциональной основе организована индикационная референс-лаборатория (ИРЛ) Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора. ИРЛ была создана с целью выполнения задач научного обеспечения и практической поддержки мониторинга особо опасных, природно-очаговых и других инфекционных болезней в г.-к. Сочи. В период функционирования ИРЛ осуществляла: постоянный мониторинг инфекционной заболеваемости и эпизоотологического состояния территории г.-к. Сочи; изучение циркулирующих на территории региона штаммов возбудителей инфекционных болезней с учетом факторов биологического и природного характера; лабораторную диагностику проб клинического материала и объектов окружающей среды; усиление санитарно-эпидемиологического мониторинга инфекционной заболеваемости в период проведения массовых мероприятий с международным участием; обеспечение готовности к реагированию на биологическую угрозу, в том числе в случае преднамеренного использования патогенных биологических агентов.

Деятельность ИРЛ была организована с учетом опыта работы учреждений Роспотребнадзора, накопленного при проведении XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в г. Сочи [4]. Особое внимание уделялось обеспечению взаимодействия ИРЛ с Управлением Роспотребнадзора по Краснодарскому краю и его отделением в г.-к. Сочи, Центром гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае и его Сочинским филиалом, а также с лечебно-профилактическими организациями Министерства здравоохранения Краснодарского края в г.-к. Сочи.

В данной работе приводится анализ результатов эпидемиологического мониторинга заболеваемости особо опасными, природно-очаговыми и другими инфекционными болезнями, а также эпизоотологической активности природных очагов инфекций на территории г.-к. Сочи.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мониторинговые и диагностические исследования на особо опасные и природно-очаговые инфекционные болезни осуществляла ИРЛ. Лабораторная диагностика проводилась с использованием испытательного и вспомогательного оборудования Ставропольского противочумного института и СПЧО. Для непрерывного и эффективного функционирования ИРЛ была оснащена пополняемым запасом ПЦР, ИФА тест-систем, питательных сред и бактериологических диагностикумов для выявления широкого спектра возбудителей особо опасных, природно-очаговых и других инфекционных болезней, а также расходными материалами, дезинфектантами, средствами индивидуальной защиты.

Работа ИРЛ проводилась во взаимодействии с Центральным НИИ эпидемиологии, куда направлялись данные по секвенированию *Rickettsiae* spp. и *Hantavirus* для дальнейшего филогенетического анализа.

Для оптимизации схем движения и исследования клинического материала был разработан и утвержден порядок взаимодействия ИРЛ Ставропольского противочумного института и Инфекционной больницы № 2 МЗ Краснодарского края (КК). По такой же схеме направление клинического материала осуществлялось из других лечебно-профилактических организаций инфекционного профиля: Краевая больница № 4 МЗ КК (Адлерский р-н) и Городская больница № 9 (Центральный р-н).

За период работы ИРЛ было проведено исследование 820 проб, из них 344 — клинического материала, 12 — воды открытых водоемов и 321 — полевого материала, а также молекулярно-генетическая идентификация 143 изолятов *Vibrio cholerae*, выделенных из открытых водоемов г.-к. Сочи специалистами СПЧО. Общее количество выполненных исследований составило 3114.

Пробы воды открытых водоемов для индикации возбудителей холеры отбирались как общепринятым методом [5], так и с применением ловушек на основе магнитоиммосорбентов (МИСЛ), разработанных в Ставропольском противочумном институте [1, 8].

В ходе эпизоотологического обследования, проводившегося в весенне-летний и осенний периоды на территории Центрального, Лазаревского, Хостинского, Адлерского внутригородских районов, а также в окрестностях поселка Красная поляна, было выставлено 7070 ловушко-ночей и добыто 809 мелких млекопитающих разных видов.

Сбор иксодовых клещей в природных биотопах и на млекопитающих осуществляли при благоприятных метеоусловиях по общепринятым методикам [3, 6, 7]. Всего при осуществлении учета численности кровососущих членистоногих на сельскохозяйственных животных, на флаг и учетчика собрано 6650 клещей.

Полевой материал (пробы головного мозга, легких, печени, селезенки, крови мелких млекопитающих и суспензии клещей) исследовали методом ПЦР на наличие генетических маркеров возбудителей Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ), лихорадки Западного Нила (ЛЗН), Ку-лихорадки, клещевого вирусного энцефалита (КВЭ), иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ), риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ), гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), туляремии и лептоспироза.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным эпизоотологического мониторинга, в качестве носителей возбудителей природно-очаговых инфекций в 2015 г. на территории г.-к. Сочи были выявлены 6 видов мелких млекопитающих. В весенне-летний период распреде-

ление по индексам доминирования было следующим: мышь малая — 46,5%, мышь кавказская — 36%, полевка кустарниковая — 8,9%, белозубка длиннохвостая — 4,3%, мышь полевая — 3,9%, мышь домовая — 0,4%.

Средняя численность носителей природно-очаговых инфекций по всем городским районам составила 7,05%, при этом наибольшие показатели отмечены в Адлерском районе г.-к. Сочи (7,71% попадания).

В осенний период преобладающим видом среди мелких млекопитающих по-прежнему оставалась мышь малая (индекс доминирования — 56%). Доля других многочисленных видов — кустарниковой полевки и кавказской мыши составили 13,7 и 11,3% соответственно. Самые низкие показатели численности установлены у белозубки длиннохвостой — 2,06%. Наиболее высокая численность мелких грызунов также отмечена в Адлерском районе г.-к. Сочи (12,1% попадания).

В ходе эпизоотологического обследования территории г.-к. Сочи проводился сбор и учет иксодовых клещей на прокормителях и в природных биотопах с последующим исследованием их суспензий на наличие возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней. Всего на наличие иксодовых клещей был осмотрен 181 биологический объект, в том числе: крупный рогатый скот — 157 голов, мелкий рогатый скот — 8 голов, домашние плотоядные — 16 голов. Пройдено 2,1 флаго/км, затрачено 4,2 флаго/часов учета на маршрутах. Был определен видовой состав 1934 экземпляров клещей. По результатам исследований, фауна иксодовых клещей территории г.-к. Сочи в весенний и осенний периоды 2015 г. была представлена семью видами: *Boophilus annulatus*, *Haemaphysalis concinna*, *Haemaphysalis inermis*, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma marginatum*.

В сборах с крупного рогатого скота доминирующим видом был клещ *B. annulatus* — 59%. Клещи *H. concinna* и *I. ricinus* в сборах составили 23 и 11,8% соответственно, *H. inermis* составили 0,12% и *D. marginatus* — 0,06%.

Клещ *H. marginatum* в период обследования в сборах с животных составлял 6,4% от общего числа иксодид. Следует отметить, что активизация его и пик паразитирования на прокормителях в соответствии с фенологией клеща приходятся на период, предшествующий времени обследования. Так, активизация его происходит в ранний весенний период, а пик паразитирования на прокормителях — в первой декаде мая.

При осмотре домашних плотоядных выявлено паразитирование трех видов иксодид: *R. sanguineus* (89%), *I. ricinus* (6,3%), *H. concinna* (4,7%). На мелком рогатом скоте в сборах присутствовали *H. concinna* (89%), *I. ricinus* (11%).

В природных биотопах при учете иксодовых клещей на флаг обнаружено три вида иксодид: *H. concinna* — 63%, *I. ricinus* — 21%, *H. inermis* — 16%.

Лабораторное исследование 185 пулов иксодовых клещей (1214 особей) проводили методом ПЦР на наличие ДНК/РНК возбудителей КГЛ, ЛЗН, Ку-лихорадки, КВЭ, ИКБ, группы КПЛ, ГАЧ, МЭЧ, туляремии, маркеры ряда из которых были выявлены в г.-к. Сочи ранее [2].

В Хостинском и Адлерском районах г.-к. Сочи при исследовании суспензий клещей *H. marginatum*, *I. ricinus*, *H. concinna* обнаружена циркуляция возбудителя Ку-лихорадки (2 положительные пробы), риккетсий группы КПЛ (10 положительных проб) и туляремии (2 положительные пробы).

Методом ПЦР на наличие возбудителя ГЛПС исследовано 291 суспензия легких диких мелких млекопитающих. РНК возбудителя обнаружена в 3 пробах. Проведена молекулярно-генетическая идентификация положительных образцов методом секвенирования, установлена циркуляция генотипа Добрава-Адлер.

В результате проведенной работы были получены данные, свидетельствующие, что численность носителей указанных возбудителей природно-очаговых инфекций — мелких млекопитающих и переносчиков указанных возбудителей — иксо-

довых клещей как на прокормителях, так и в природных биотопах соответствовала их среднему многолетнему уровню данного климатического пояса и периода обследования. В природных очагах инфекционных болезней выявлена циркуляция возбудителей Ку-лихорадки, туляремии и ГЛПС генотипа Добrava-Адлер, а также риккетсий группы КПЛ.

При исследовании суспензий фекалий от больных острыми кишечными инфекциями (ОКИ) методом ПЦР в 275 пробах определены этиологические агенты, из которых 70,9 % составили возбудители рода Rotavirus (группы А), 17,5 % — Norovirus 2 генотипа, 5,1 % — Astrovirus, 2,2 % — Adenovirus, 1,8 % — Salmonella spp., 1,1 % — Shigella spp./EIEC, 1,1 % — Campylobacter spp. и 0,3 % — Enterovirus. Бактериологическим методом из суспензий фекалий выделены и идентифицированы 4 штамма возбудителей сальмонеллеза: *S. london* O 3-10 H11, v H2 1,6 (1 штамм), *S. enteritidis* O-9 O-12 H1gm (1 штамм), *Salmonella* spp. (2 штамма).

Образцы сывороток крови больных с лихорадками неясного генеза исследовали методами ПЦР и ИФА на наличие маркеров возбудителей КВЭ, ИКБ, ГЛПС, ГАЧ, МЭЧ, КГЛ, ЛЗН, Ку-лихорадки, энтеровирусной инфекции, риккетсиозов группы КПЛ, лептоспироза. Всего исследовано 49 проб, в 5 образцах обнаружены РНК *Leptospira*, в 3 — антитела классов М и G к антигенам *Leptospira*.

Результаты проведенных лабораторно-диагностических исследований свидетельствовали о подавляющем преимуществе в нозологической структуре острых кишечных инфекций на территории г.-к. Сочи в летний период 2015 г. ротавирусной инфекции (70,9%). Также были распространены инфекционные болезни, обусловленные норо- и астровирусами (17,5 и 5,1% соответственно).

В течение июля—августа 2015 г. из воды реки Агура Хостинского района регулярно выделяли штаммы *Vibrio cholerae* eltor O1 Inaba (атоксигенный). Молекулярно-генетический анализ позволил идентифицировать 111 изолированных штаммов холерных вибрионов как *V. cholerae* O1 атоксигенный (ctx-, tcp-) и 20 штаммов — как *V. cholerae* non O1 non O139 (ctx-, tcp-), 12 штаммов не являлись штаммами *V. cholerae*.

Для определения зоны загрязнения реки использовали МИСЛ, которые были расставлены в семи точках вверх по течению от устья реки до минеральных источников на отрезке, характеризующимся высокой нагрузкой в рекреационном отношении. Одновременно отбор воды осуществляли обычным способом [5]. В результате выявлена контаминация воды всех проб, отобранных с помощью МИСЛ. После проведенных исследований 10 штаммов холерных вибрионов идентифицированы как *V. cholerae* O1 атоксигенный (ctx-, tcp), 2 штамма — как *V. cholerae* non O1 non O139 (ctx-, tcp-).

Установлен ряд природных факторов, способствующих контаминации *V. cholerae* O1 (атоксигенный) воды р. Агура: относительно высокие значения температуры речной воды в летние месяцы (от 18 до 30°C), выход в русло реки сульфидных минеральных вод, создающих щелочную среду, сезонное снижение дебита реки и скорости течения воды.

Таким образом, в результате проведенных исследований обнаружена контаминация воды р. Агура в зоне активного рекреационного использования, также продемонстрированы высокая эффективность и удобство использования МИСЛ при проведении микробиологического мониторинга воды открытых водоемов. Принимая во внимание полученные результаты, был сформулирован ряд предложений по введению дополнительных точек отбора проб воды как наиболее значимых в эпидемиологическом отношении.

В заключение следует отметить, что эпидемиологическая ситуация по инфекционным болезням в г.-к. Сочи в 2015 г. в целом оставалась стабильной. Полученные результаты лабораторного мониторинга позволили установить в этиологической структуре спорадически возникающих острых кишечных инфекций



преобладающую роль ротавирусов. Особую настороженность вызывает обнаружение в суспензии клещей генетических маркеров возбудителей Ку-лихорадки, туляремии и ГЛПС генотипа Добрава-Адлер, а также риккетсиозов группы КПЛ, обладающих большим эпидемическим потенциалом, что требует обратить особое внимание при планировании мероприятий по профилактике инфекционной заболеваемости в данном регионе. Учитывая выявленную контаминацию воды р. Агура Хостинского района *V. cholerae* eltor O1 Inaba (атоксигенный), необходимы организация и систематическое проведение мониторинговых исследований речной воды с целью прогнозирования возможного ухудшения эпидемиологической обстановки и своевременного принятия профилактических мер.

Результаты работы ИРЛ по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия по опасным и природно-очаговым инфекционным болезням в г.-к. Сочи в 2015 г. свидетельствуют о необходимости при организации эпиднадзора использования опыта работы учреждений Роспотребнадзора, накопленного при проведении Олимпийских игр в г.-к. Сочи 2014 года, и о целесообразности временного привлечения специалистов противочумных учреждений для участия в мониторинговых и других мероприятиях по противодействию биологической угрозе в этом стратегически важном регионе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Башкот Е.Н., Геогджаян А.С., Жарникова И.В., Солодовников Б.В., Михайлова М.Е. Экологический мониторинг бактериальной загрязненности некоторых водоемов Ставропольского края. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010, 12, 1 (14): 917-920.
2. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Таран Т.В., Грижебовский Г.М., Зуенко А.А., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Тешева С.Ч., Оробей В.Г., Мишина Л.И., Пархоменко В.В., Рафеенко Г.К., Беланова Е.А. Мониторинг эпидемиологической обстановки в Сочи в предолимпийский, олимпийский и постолимпийский периоды. Здравоохранение Российской Федерации. 2015, 3: 19-22.
3. Организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий против Крымской геморрагической лихорадки. Методические указания. МУ 3.1.1.2488-09.
4. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н. (ред.). XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры 2014 года в г. Сочи. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Тверь, Триада-Х, 2015.
5. Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры. Методические указания. МУ 3.1.1.2232-07.
6. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней. Методические указания. МУ 3.1.3012-12.
7. Тохов Ю. М., Луцук С.Н., Дьяченко Ю.В. Фенология иксодовых клещей рода *Dermacentor* в Центральном Предкавказье. Паразитология. 2013, 47 (6): 437-447.
8. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Савельева И.В., Жарникова И.В., Жданова Е.В., Курчева С.А., Старцева О.Л., Куличенко А.Н. Разработка тест-систем магнитоиммунсорбентных для выявления холерного вибриона в объектах окружающей среды. Здоровье населения и среда обитания. 2014, 4 (253): 17-19.

*Поступила 08.12.15*

Контактная информация: Малецкая Ольга Викторовна, д.м.н., проф.,  
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-83

*А.Г.Софронов<sup>1</sup>, Л.П.Зуева<sup>1</sup>, Б.И.Асланов<sup>1</sup>, И.В.Дардынская<sup>2</sup>,  
S.Weine<sup>2</sup>, А.Е.Добровольская<sup>1</sup>, М.В.Чащин<sup>1</sup>, О.А.Дардынский<sup>2</sup>, В.П.Чащин<sup>1</sup>*

## **МНОГОУРОВНЕВАЯ ОЦЕНКА БИОСОЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ РИСКА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ СРЕДИ ТРУДОВЫХ МИГРАНТОВ**

<sup>1</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Иллинойский университет, Высшая школа глобального здоровья, Чикаго, США

*Цель.* Многоуровневая оценка методом случай-контроль социальных, социокультурных и поведенческих факторов риска распространения ВИЧ-инфекции среди трудовых мигрантов мужского пола, прибывающих из стран ближнего зарубежья в Россию. *Материалы и методы.* Для выявления факторов риска проводилось интервьюирование мигрантов, обратившихся за медицинским освидетельствованием для получения разрешения на работу. Проанализированы результаты интервьюирования 191 мигранта с ВИЧ-инфекцией (группа случаев) и 190 мигрантов без ВИЧ-инфекции (контрольная группа). Для анализа использованы методы описательной статистики и логистической регрессии. *Результаты.* Ведущими в развитии ВИЧ-инфекции оказались факторы, связанные с рискованным сексуальным поведением. Кроме того, ВИЧ-инфицированные мигранты имели худшие условия работы и проживания, меньшую оплату труда, низкую субъективную оценку здоровья, чаще становились объектами ксенофобии и имели большее число предыдущих поездок в принимающую страну. Выделены факторы, уменьшающие риск заражения и распространения ВИЧ инфекции: информированность о ВИЧ-инфекции, приверженность религии и правовым требованиям принимающей страны. Обсуждаются преимущества и недостатки анкетирования в выявлении факторов риска ВИЧ-инфекции. *Заключение.* В популяции трудовых мигрантов значимыми являются те же факторы риска распространения ВИЧ-инфекции, что и у коренного населения. Также установлены специфические для мигрантов факторы, способствующие распространению инфекции. Система профилактики ВИЧ среди мигрантов должна базироваться на предупреждении и коррекции выявленных в исследовании факторов риска и усилении факторов, оказывающие превентивное действие.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 81—87

Ключевые слова: рискованное поведение, факторы риска распространения ВИЧ-инфекции, трудовые мигранты

*A.G.Sofronov<sup>1</sup>, L.P.Zueva<sup>1</sup>, B.I.Aslanov<sup>1</sup>, I.V.Dardynskaya<sup>2</sup>,  
S.Weine<sup>2</sup>, A.E.Dobrovolskaya<sup>1</sup>, M.V.Chaschin<sup>1</sup>, O.A.Dardynsky<sup>2</sup>, V.P.Chaschin<sup>1</sup>*

## **MULTI-LEVEL EVALUATION OF BIOSOCIAL RISK FACTORS OF HIV-INFECTION AMONG MIGRANT WORKERS**

<sup>1</sup>Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Illinois University, Graduate School of Global Health, Chicago, USA

*Aim.* Multi-level evaluation by case-control method of social, sociocultural and behavioural risk factors of HIV-infection spread among male migrant workers arriving to Russia from near abroad countries. *Materials and methods.* Interviews of migrants, that had appealed for medical examination for work permit, were carried out for detection of risk factors. Results of interviewing of 191 migrants with HIV-infection (case group) and 190 migrants without HIV-infection (control group) were analyzed. Methods of descriptive statistics and logistical regression were used for the analysis. *Results.* Factors, related to dangerous sexual behavior, were leading in development of HIV-infection. Furthermore, HIV-infected migrants had inferior work and accommodation conditions, lower salary, lower subjective health evaluation, became object of xenophobia more frequently and had more previous travels into the receiving country. Factors, that reduce risk of infection and spread of HIV-infection, were detected: HIV-infection awareness, adherence to

religion and legal requirements of the receiving country. Advantages and disadvantages of surveying during detection of HIV-infection risk factors are discussed. *Conclusion.* The same risk factors of HIV-infection spread are significant in the population of migrant workers as in the indigenous population. Factors specific for migrants, that facilitate infection spread, were also established. HIV prophylaxis system among migrants should be based on prevention and correction of risk factors detected in the study and enhancement of factors, that cause preventive effect.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 81—87

**Key words:** risk behavior; HIV-infection spread risk factors; migrant workers

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время изучению биосоциальных факторов риска распространения ВИЧ-инфекции посвящено множество исследований, проводимых в России и за рубежом. В качестве факторов риска широко рассматриваются различные отклонения от общепризнанных норм социального поведения, в первую очередь, злоупотребление инъекционными наркотиками, беспорядочные половые связи, в том числе и однополые [2]. Наряду с поведенческими описываются так называемые «предиспозиционные» факторы, которые тесно сопряжены с рискованным поведением и, соответственно, способны увеличивать риск первичного ВИЧ-инфицирования [5]. Так, известно, что различные формы психической дезадаптации лежат в основе процессов формирования и течения химической зависимости, которая, в свою очередь, сопровождается рискованным сексуальным поведением [13]. При этом психическая патология рассматривается как самостоятельный фактор риска инфицирования ВИЧ с иными механизмами реализации, например, через потерю способности критически оценивать свое поведение и, соответственно, следовать социальным нормам [11]. В качестве социальных факторов рассматриваются условия микро- и макросреды, социально-демографические характеристики [9]. Известно, что низкий уровень информированности о путях распространения ВИЧ повышает риск первичного инфицирования. Однако достаточная осведомленность по этому вопросу не меняет опасное поведение [10]. Более того, многие ВИЧ-инфицированные, зная о своем статусе, продолжают вступать в незащищенные контакты [1]. О тесной взаимосвязи рискованного поведения и других биосоциальных факторов свидетельствует тот факт, что ВИЧ-инфекция стремительно распространяется среди потребителей инъекционных наркотиков и злоупотребляющих алкоголем. Таким образом, между различными формами рискованного поведения и другими биосоциальными факторами распространения ВИЧ-инфекции существует тесная взаимосвязь. Очевидно, что существуют и определенные «иерархические» связи между факторами, изучение которых позволяет провести многоуровневую оценку их роли, как в частном случае инфицирования ВИЧ, так и в определенных социальных группах.

Трудовая миграция является одной из самых актуальных проблем современного общества. Исследования показывают, что мигранты вносят существенный негативный вклад в эпидемиологическую ситуацию принимающих государств [4]. Применительно к распространению ВИЧ-инфекции, мигранты могут отличаться низким уровнем знаний о ВИЧ-инфекции, половыми связями с секс-работниками на родине и в принимающем государстве, неиспользованием презерватива, злоупотреблением алкоголем и другими психоактивными веществами [3, 8]. Кроме того, мигранты создают другие специфические проблемы. Психической дезадаптации мигранта, а следовательно, и формированию рискованного поведения, способствуют слабое образование, низкий экономический уровень существования, разделение с семьей, отсутствие квалифицированной специальности, пребывание

в чужой культурной среде, незнание языка, вероятность стать объектом ксенофобии или жертвой расизма [12]. Соответственно, изучение механизмов распространения ВИЧ-инфекции требует многоуровневой оценки биосоциальных факторов риска ВИЧ-инфекции среди трудовых мигрантов с учетом медицинских, социокультуральных и политических детерминант [3]. Соответственно, многоуровневый подход в перспективе должен стать основой профилактики распространения социально-значимых заболеваний среди мигрантов.

Целью настоящего исследования является многоуровневая оценка различных факторов, способных оказать влияние на риск ВИЧ-инфекции среди трудовых мигрантов-мужчин.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Целевая группа для расширенного исследования случай-контроль состояла из 381 чел., мигранты из разных стран: 191 мигрант с ВИЧ-инфекцией (группа случаев) и 190 мигрантов без ВИЧ-инфекции (контрольная группа), имевших сходные характеристики, в частности, идентичные возрастные (средний возраст в группах 28,79 и 28,01 лет при  $p > 0,005$ ) и этнические особенности (табл.).

В качестве основного инструмента для получения информации о перечисленных факторах риска было использовано анкетирование исследуемых трудовых мигрантов (структурированное интервью и формализованная карта), посещающих медицинские учреждения для тестирования на ВИЧ. Вопросы и шкала оценок, вошедшие в анкету (разработана совместно со специалистами Иллинойского Университета, Чикаго, США), были сформулированы с учетом предыдущих исследований, использовавших подобный подход. В анкету входил 201 пункт в виде вопросов, сгруппированных в модули, с ответом по принципу да/нет, а также в виде оценочной шкалы. Анкета состояла из разделов, рассчитанных на получение информации об изучаемых факторах риска. Вопросы были сформулированы таким образом, что могли показать негативное или превентивное действие того или иного фактора, согласно исходной гипотезе исследователей. Модули отражали социальные факторы риска (социально-экономическое положение субъекта исследования, длительность пребывания за пределами родины, тяжелые и опасные условия труда, неблагоприятные условия жизни, потенциальная опасность стать жертвой ксенофобии); социокультурные факторы (различия культурных норм, оторванность от семьи, ограниченная социальная поддержка, отношение к религии); факторы, связанные с состоянием здоровья, поведенческие факторы (количественная характеристика половых связей вне брака, ограниченное использование презервативов, пользование сексуальными услугами, недостаток знаний о ВИЧ-инфекции, злоупотребление алкоголем, употребление психоактивных веществ и уклонение от тестирования на ВИЧ-инфекцию). Влияние данных факто-

Распределение участников исследования по странам и группам

Страна	Кол-во мигрантов (чел.)	ВИЧ статус (чел.)	
		Положительный	Отрицательный
Таджикистан	83	45	38
Кыргызстан	13	5	8
Узбекистан	126	58	68
Украина	128	71	57
Молдова	21	8	13
Другие страны	10	4	6
Всего	381	191	190

ров было изучено с дифференцировкой по следующим критериям: воздействие факторов в родной стране, в ходе нынешнего визита в Россию, во время предыдущего визита в Россию. Часть вопросов была сформулирована в проективной плоскости, другими словами, вопрос касался не самого испытуемого, а его знакомых.

При анализе данных в качестве результирующего признака (исхода) принимали дихотомическую переменную — наличие или отсутствие ВИЧ-инфекции у мигранта. В качестве предикторов было использовано множество факторов риска или превентивных факторов, выявленных

у участников исследования при их анкетировании. Первоначально для отбора значимых факторов оценивались попарные связи между каждой переменной-предиктором и исходом. Для сравнения количественных данных, подчиняющихся закону нормального распределения, использовались приемы описательные статистики для сравнения средних значений с определением уровня значимости. Для оценки связи между предикторами с дихотомическим распределением и исходом рассчитывался показатель отношения шансов (Odds Ratio, OR) с 95% доверительным интервалом. В результате попарной оценки взаимосвязи между факторами и исходом были отобраны значимые предикторы-переменные, которые были использованы затем в регрессионном анализе, позволившем определить представленный в результатах исследования набор факторов риска и превентивных факторов.

Каждый участник участвовал в исследовании добровольно на анонимной основе с подписанием информированного согласия, одобренного локальным этическим комитетом. Респондентам было разъяснено, что исследование имеет исключительно научные цели и не будет использоваться при принятии решения о выдаче разрешения на работу в принимающей стране.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного исследования были получены следующие данные. ВИЧ-инфицированные мигранты имели более худшие условия работы, проживания и меньшее вознаграждение за труд, чем ВИЧ-негативные, но имели больший опыт предыдущих поездок в принимающую страну.

В числе факторов риска, связанных с условиями проживания и работы, значимыми оказались следующие: нехватка пищи или воды у самих участников исследования:  $OR^*=4.2$  (1.5 — 11.8); осведомленность о том, что другие мигранты испытывают нехватку пищи или воды:  $OR=1.9$  (1.4 — 2.6); поездка с целью работы в другую страну (в том числе в Россию) перед нынешним визитом в Россию:  $OR=1.8$  (1.2 — 2.8); большее количество рабочих часов в неделю, по сравнению с ВИЧ-негативными мигрантами ( $p<0.05$ ); меньший средний заработок в месяц во время предыдущего визита в Россию, по сравнению с ВИЧ-негативными мигрантами ( $p<0.05$ ); меньшее количество денег, отправляемых на родину во время предыдущего визита в Россию, по сравнению с ВИЧ-негативными мигрантами ( $p<0.05$ ).

Среди ВИЧ-инфицированных мигрантов достоверно чаще регистрировались положительные ответы в связи с плохим здоровьем, смертью близких, преследованием со стороны националистов, стрессовым переживаниями. Значимыми в развитии ВИЧ-инфекции факторами риска из этой группы детерминантов оказались следующие: плохое здоровье и невозможность обращения за медицинской помощью:  $OR=2.9$  (1.0 — 8.3); самостоятельное приобретение лекарственных препаратов в аптеке во время предыдущего посещения России:  $OR=2.2$  (1.1 — 4.6); использование самолечения на дому по своему усмотрению без обращения за медицинской помощью во время нынешнего визита в Россию:  $OR=1.8$  (1.2 — 2.9); осведомленность о том, что другие мигранты пережили неестественную смерть семьи или друзей:  $OR=1.96$  (1.2 — 3.2); осведомленность о том, что другие мигранты испытали побои от националистов:  $OR=1.5$  (1.1 — 2.1); столкновение с негативными факторами в последние месяцы, которые явились причиной ночных кошмаров или постоянного обдумывания:  $OR=2.0$  (1.4 — 2.9); столкновение с негативными факторами в последние месяцы, которые явились причиной настороженности, бдительности или испуга:  $OR=1.9$  (1.2 — 3.1).

ВИЧ-инфицированные мигранты имели более широкий круг контактов и

\*OR — отношение шансов с 95% доверительным интервалом.

развлечений. Так, они статистически чаще посещали знакомых из родного города (деревни) во время предыдущего приезда в Россию, по сравнению с ВИЧ-негативными мигрантами ( $p < 0.05$ ). Другим значимым фактором явилось посещение вечеринок во время нынешнего приезда в Россию ( $p < 0.05$ ).

Достоверными оказались различия в группах факторов, связанных с сексуальным поведением. Эти факторы, согласно полученным данным, являются ведущими в реализации риска ВИЧ-инфицирования. Выявлены следующие факторы, связанные с рискованным сексуальным поведением, имеющие значение в развитии ВИЧ-инфекции у трудовых мигрантов: наличие в анамнезе заболеваний, передающихся половым путем:  $OR=17.9$  (7.6 — 42.6); наличие выделений или болей в области гениталий за последние 12 месяцев:  $OR=23.5$  (3.1 — 176.5); использование услуг секс-работников в родной стране:  $OR=6.8$  (3.9 — 11.9); более частое использование услуг секс-работников в родной стране, по сравнению с ВИЧ-негативными мигрантами ( $p < 0.05$ ); большее количество женщин, по сравнению с ВИЧ-негативными мигрантами ( $p < 0.05$ ); наличие гомосексуальных контактов:  $OR=15.6$  (3.7 — 66.2); вагинальный секс в родной стране за последние три месяца:  $OR=1.7$  (1.1 — 2.6); занятие сексом в состоянии алкогольного опьянения за последние три месяца и неиспользование презерватива вследствие этого ( $p < 0.05$ ); вагинальный секс во время нынешнего пребывания в России:  $OR=2.1$  (1.3 — 3.4); использование услуг секс-работников во время нынешнего пребывания в России:  $OR=6.4$  (3.4 — 11.9); большее количество женщин, кроме постоянного партнера в России, с которыми был вагинальный секс во время нынешнего визита в Россию, по сравнению с ВИЧ-негативными мигрантами ( $p < 0.05$ ); большее количество эпизодов анального секса за последний месяц пребывания в России, по сравнению с ВИЧ-негативными мигрантами ( $p < 0.05$ ); более частое употребление алкоголя во время совершения полового акта с секс-работниками за последний месяц в России, по сравнению с ВИЧ-негативными мигрантами ( $p < 0.05$ ); использование услуг секс-работников во время предыдущего визита в Россию:  $OR=6.6$  (3.0 — 14.3); большее количество женщин, кроме постоянного партнера, с которыми был вагинальный секс во время предыдущего визита в Россию, по сравнению с ВИЧ-негативными мигрантами ( $p < 0.05$ ); большее количество эпизодов анального секса с мужчинами и женщинами, кроме постоянного партнера, во время предыдущего визита в Россию, по сравнению с ВИЧ-негативными мигрантами ( $p < 0.05$ ).

Помимо факторов риска в ходе анализа полученных в исследовании результатов были определены факторы, уменьшающие риск заражения и распространения ВИЧ-инфекции среди мигрантов (превентивные факторы).

Были выявлены следующие факторы, оказывающие превентивное действие: тестирование на ВИЧ в анамнезе:  $OR=0.03$  (0.01 — 0.08); тестирование на ВИЧ в анамнезе у жены:  $OR=0.3$  (0.1 — 0.6); информированность о том, где можно при необходимости пройти тест на ВИЧ:  $OR=0.5$  (0.3 — 0.8); информированность о СПИД (слышали информацию о СПИД):  $OR=0.3$  (0.15 — 0.6); получение информации о методах профилактики ВИЧ-инфекции:  $OR=0.7$  (0.5 — 0.9); получение информации о ВИЧ/СПИД от сотрудников здравоохранения в родной стране:  $OR=0.4$  (0.2 — 0.6); получение информации о ВИЧ/СПИД из телевидения, интернета, радио, газет в родной стране:  $OR=0.5$  (0.3 — 0.8); получение информации о ВИЧ/СПИД от сотрудников здравоохранения во время нынешнего визита в Россию:  $OR=0.4$  (0.3 — 0.7); получение информации о ВИЧ/СПИД от сотрудников здравоохранения во время предыдущего визита в Россию:  $OR=0.2$  (0.1 — 0.4); получение информации о ВИЧ/СПИД от СПИД-центров во время предыдущего визита в Россию:  $OR=0.4$  (0.2 — 0.8); обсуждение проблемы ВИЧ/СПИД с друзьями:  $OR=0.4$  (0.3 — 0.6); посещение мечети или церкви за последние две недели:

OR=0.5 (0.3 — 0.8); посещение мечети или церкви во время предыдущего визита в Россию: OR=0.3 (0.1 — 0.5); наличие родственников в России: OR=0.5 (0.3 — 0.8); проживание с родственниками во время предыдущего визита в Россию: OR=0.3 (0.1 — 0.9); наличие официального разрешения на работу во время предыдущего визита в Россию: OR=0.4 (0.2 — 0.7).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование показало, что популяция трудовых мигрантов является неоднородной по ряду значимых признаков. Среди них существуют подгруппы, существенно отличающиеся по социально-экономическим характеристикам, отношению к культурным и религиозным ценностям, состоянию здоровья, характеристикам микросоциальной среды, особенностям сексуального поведения, степени информированности о ВИЧ-инфекции и др. В целом, для мигрантов значимыми оказались те же факторы риска распространения ВИЧ-инфекции, что и у коренного населения. Однако были установлены и специфические для мигрантов факторы, способствующие распространению инфекции.

ВИЧ-инфицированные мигранты составили вполне «очерченную» группу, в которую вошли мигранты с рискованным сексуальным поведением, лица с более низким социально-экономическим уровнем и образованием, имеющие проблемы с физическим и психическим здоровьем, низкой приверженностью к правовым требованиям и религии. Соответственно, эта группа оказалась более уязвимой к действию отдельных внешних факторов, например, ксенофобии или отсутствию работы. В результате налицо порочный круг, в котором слабая исходная способность адаптироваться сменяется психической дезадаптацией в период миграции, сопровождающейся усилением или формированием рискованного поведения.

Потенциально многие негативные факторы могут предупреждаться или корректироваться, а факторы, оказывающие превентивное действие — усиливаться. Создание государством дополнительных барьеров, повышающих требования к мигрантам, опосредованно должно положительно повлиять на качественные характеристики мигрантов и, соответственно, снизить распространение ВИЧ-инфекции и других социально-значимых заболеваний. Трудовым мигрантам, по мнению ряда исследователей, должен быть предоставлен в принимающей стране доступ к медицинским ресурсам, доступным для коренного населения. Другой подход предусматривает создание для мигрантов специальных медицинских, образовательных и других социальных программ [3, 6, 14]. Вне зависимости от модели помощи мигрантам, необходимо действенное мониторинговое наблюдение их здоровья и социального функционирования [3].

Анкетирование как метод изучения факторов риска ВИЧ-инфекции у мигрантов имеет преимущества и недостатки. К преимуществам следует отнести возможность многоуровневой оценки факторов риска с последующим определением направления для медицинской и социальной интервенции в частных случаях и в популяции мигрантов в целом. Анкетирование представляется эффективным и недорогим инструментом мониторинга в фокусных группах мигрантов [7].

Недостатком метода является трудность его применения при массовых обследованиях из-за большого количества вопросов и обязательной специальной подготовки интервьюера. Кроме того, анкета содержит вопросы на тему сексуального поведения и употребления психоактивных веществ. Темы являются табуированными, особенно для выходцев из стран Средней Азии и Кавказа. Получить достоверные ответы представляется сложнейшей задачей, даже в анонимном исследовании, из-за очевидной установки мигрантов соответствовать традициям и требованиям принимающей стороны. Решение этой задачи в перспективе может быть достигнуто через изменение процедуры анкетирования: часть

вопросов анкеты должно заполняться респондентом самостоятельно [3]. Необходимо также учитывать национальные особенности менталитета мигрантов и языковой барьер, а также то, что некоторые методики анкетирования заимствованы из зарубежных исследовательских протоколов и переведены на русский язык без специальной проверки понятийного аппарата. Поэтому в дальнейшем при планировании аналогичных исследований следует оценивать валидность всех новых методик анкетирования и при необходимости дополнительно их адаптировать.

*Исследование проводилось в рамках проекта Российского фонда фундаментальных исследований № 13-04-91456 «Изучение биосоциальных факторов риска ВИЧ-инфекции среди трудовых мигрантов с применением многоуровневых методов оценки, включая метод случай-контроль, и ее профилактика». Проект выполнялся Северо-Западным государственным медицинским университетом им. И.И. Мечникова (С.-Петербург) и Высшей школой глобального здоровья Иллинойского Университета (Чикаго, США) и финансировался Российским фондом фундаментальных исследований и Национальным институтом здоровья США.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Башкина Ю.Д. Личностный смысл чувства риска: на примере подростков с разным рискованным поведением: Дисс. канд. психол. наук. СПб, 2007.
2. Беляков Н.А., Виноградова Т.Н. Половой путь передачи ВИЧ в развитии эпидемии. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2011, 3 (4): 7-19.
3. Бобрик А.В., Ерошина К.М., Михель Е.А. Организация комплексной профилактики ВИЧ-инфекции, ИППП и вирусных гепатитов среди трудовых мигрантов. М., 2009.
4. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году». [http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT\\_ID=1984/Дата обращения 08.10.2015](http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=1984/Дата обращения 08.10.2015).
5. Гречаный С. В., Егоров А.Ю. Поведенческие аспекты ВИЧ-инфицирования у пациентов с зависимостью от психоактивных веществ. Неврологический вестник. 2013, XLV (4): 53-61.
6. Онищенко Г.Г., Симкалова Л.М. Совершенствование Федерального эпидемиологического надзора, обеспечение биологической безопасности населения Российской Федерации. Журн. микробиол. 2013, 5: 27-35.
7. Софронов А.Г., Добровольская А.Е., Чашин В.П., Чашин М.В., Зуева Л.П., Асланов Б.И., Гончаров А.Е., Соменков А.Е. Оценка метода анкетирования для изучения рискованного поведения для заражения ВИЧ-инфекцией трудовых мигрантов. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2015, 7 (1): 108-111.
8. Яковлев А.А., Котлярова С.И., Мусатов В.Б. и др. Инфекционная заболеваемость мигрантов и туристов в Санкт-Петербурге. Журнал инфектологии. 2011, 3 (4): 49-54.
9. Collins P.Y., Holman A.R., Freeman M.C. et al. What is the relevance of mental health to HIV/AIDS care and treatment programs in developing countries? A systematic review. AIDS. 2006, 20 (12): 1571-1582.
10. Joska J.A., Kaliski S., Benatar S.R. Patients with severe mental illness: A new approach to testing for HIV. South African Med. J. 2005, 95 (3): 630-634.
11. Longshore D., Hsieh S. Drug abuse treatment and risky sex: evidence for a cumulative treatment effect? Am. J. Drug Alcohol Abuse. 1998, 24 (3): 439-451.
12. Migration and Mental Health. D. Bhugra, S. Gupta (ed.). New York, Cambridge University Press, 2011.
13. Palepu A., Raj A., Horton N.J. et al. Substance abuse treatment and risk behaviors among HIV-infected persons with alcohol problems. J. Subst. Abuse Treat. 2005, 28: 3-9.
14. Seybolt L., Barnett E., Stauffer W. US medical screening for immigrants and refugees: clinical issues. In: Walker P., Barnett E.D. (ed.). Immigrant medicine. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2007, p. 135-150.

Поступила 29.10.15

Контактная информация: Софронов Александр Генрихович,  
191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41, р.т. (812)303-50-00



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*С.В.Титова, Л.П.Алексеева, И.Т.Андрусенко*

### **РОЛЬ БИОПЛЕНОК В ВЫЖИВАЕМОСТИ И СОХРАНЕНИИ ВИРУЛЕНТНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ И ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА**

Ростовский-на-Дону противочумный институт

Представлены материалы относительно биопленок холерных вибрионов. Показано, что формирование биопленок является существенным фактором патогенности и одной из основных стратегий, повышающих выживание холерных вибрионов в организме человека и в окружающей среде.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 88—97

Ключевые слова: холерные вибрионы, биопленка, окружающая среда, кишечник человека, факторы патогенности

*S.V.Titova, L.P.Alekseeva, I.T.Andrusenko*

### **ROLE OF BIOFILMS IN SURVIVAL AND PRESERVATION OF VIRULENCE OF CHOLERA VIBRIOS IN THE ENVIRONMENT AND HUMAN ORGANISM**

Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Russia

Materials regarding biofilms of cholera vibrios are presented. Formation of biofilms is shown to be a significant pathogenicity factor and one of the main strategies, increasing survival of cholera vibrios in human organism and the environment.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 88—97

Key words: cholera vibrios, biofilm, environment, human intestine, pathogenicity factors

Холера — тяжелая диарейная болезнь, вызываемая токсигенными штаммами *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп, которой ежегодно заболевают миллионы людей во всем мире. Для существования в организме человека и объектах окружающей среды холерные вибрионы формируют биопленки, играющие важную роль в патогенезе, передаче инфекции, а также в выживаемости холерных вибрионов в организме человека и в водной среде. При благоприятных условиях биопленки, содержащие высоковирулентные бактерии, могут быть перенесены на большие расстояния и стать источником новых вспышек холеры.

Холерные эпидемии распространяются в результате контаминации воды фекалиями людей, зараженными токсигенными бактериями *V. cholerae*.

Данные, представленные в обзоре [17], свидетельствуют о том, что на очаговых территориях, т.е. там, где регистрируются эпидемии, вспышки и спорадические случаи заболеваний холерой, в водных объектах окружающей среды присутствуют как токсигенные, так и атоксигенные штаммы, причем часть токсигенных штаммов, попадая в окружающую среду, возможно, утрачивают гены вирулентности, а сама среда становится резервуаром данных генов. Кроме того, обсуждается гипотеза о том, что в случае задействования водного фактора передачи при зараже-

нии человека атоксигенным штаммом последний приобретает СТХ<sub>φ</sub> фаг и ген *tsc* в макроорганизме с развитием инфекционного процесса и последующим выделением уже холерогенного штамма в окружающую среду. Вместе с тем, на внеочаговых территориях (где не регистрируются больные и носители) в воде открытых водоемов преобладают атоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 [16]. Помимо планктонных (свободноживущих) особей холерные вибрионы существуют в водных экосистемах в виде некультивируемых клеток. Эти некультивируемые, но жизнеспособные клетки, по мнению ряда исследователей, играют важную роль в эпидемиологии холеры [Титова С.В. и др., 2004].

Часть холерных вибрионов, попадая от больных людей в водоемы, погибает, частично поедаясь хищниками. Другая часть в виде свободноживущих особей, благодаря хемотаксису, прикрепляется к абиотическим субстратам, одним из основных компонентов которых являются отрицательно заряженные силикаты, фрагменты полиэтилена, пластикового мусора [40], а также к биотической поверхности зоо- и фитопланктона и формирует биопленку [24]. Впервые особенности биопленочного фенотипа четко определили Costerton J.W. et al., обсуждая различия между планктонными культурами, колониями микроорганизмов и биопленками [15]. В водоемах биопленки могут располагаться на поверхности живых и погибших водорослей и зоопланктоне: на цианобактериях — *Anabana* sp., в организме амебы *Acanthamoeba castellanii*, в кишечнике детритофагов, усоногих рачков, членистоногих, на хитине и щитках креветок, в крабах, рыбах, насекомых и других обитателях водной среды [24]. Purdy A.E. и Watnick P.I. показали, что биопленки являются резервуаром *V. cholerae* в природной среде и что зависимость от полисахарида биопленка холерных вибрионов приобретает высокий уровень активности после их проникновения в кишечник членистоногих [31].

Предложена общая для большинства микроорганизмов, в том числе и холерных вибрионов, модель формирования биопленки, состоящая из нескольких стадий: стадия планктонных клеток, монослой, собственно биопленки. На стадии планктонных клеток холерные вибрионы включают уникальные механизмы транскрипции. В стадии, когда микробные клетки образуют монослой, разрушаются полисахаридные полимеры, тем самым создается богатыми углеводами среда, далее через систему кворум-сенсинг *V. cholerae* начинают формировать биопленку. Эта фаза характеризуется снижением экспрессии жгутиковых генов и повышением их транскрипции, что необходимо для межклеточной адгезии и продукции EPS [39]. Формирование биопленки бактериями является постепенно развивающимся процессом. Прикрепившись к питательным поверхностям, типичные холерные вибрионы могут образовывать ружозные, или морщинистые, колонии. Формирование ружозного фенотипа за счет продукции экзополисахарида обеспечивает устойчивость к неблагоприятным условиям [4]. В работе [32] показано на примере *Vibrio fisheri*, что появление морщинистых колоний является индикатором образования биопленок. Штаммы с дефектом формирования биопленок *in vitro* характеризуются также дефектом колонизации, а у штаммов с повышенной способностью к формированию биопленок — повышенный уровень колонизации. Moorthy S. и Watnic P.I. показали, что планктонные клетки прикрепляются к поверхности, образуя монослой, затем кластеры клеток, размножаясь, образуют биопленку [27]. Berk V. et al. наблюдали три различные стадии образования пространственной организации биопленок холерных вибрионов: клетки, кластеры клеток и объединения кластеров [11]. В процессе перехода от свободного плавания к состоянию неподвижного клеточного существования в биопленке бактерии продуцируют и секретируют внеклеточный матрикс, состоящий из нуклеиновых кислот, экзополисахарида и белков адгезии. Матрикс содержит три основных белка — RbmA, RbmC и VarP [20]. Установлены комплексы

тарные роли четырех важных компонентов матрикса в архитектуре биопленок: структурный белок RbmA обеспечивая межклеточную адгезию на раннем этапе формирования биопленки и локализован во всех местах межклеточных контактов, RbmC и Var1 формировали динамичные, гибкие и упорядоченные оболочки, в которые были заключены кластеры клеток [26]. В процессе формирования биопленки холерные вибрионы синтезируют поверхностные структуры, включающие полисахариды: липополисахарид, гликопротеины, протеогликаны и экзополисахарид, благодаря чему формируется сложная трехмерная структура биопленки с каналами, через которые питательные вещества поступают к бактериям и вымываются продукты их жизнедеятельности.

В некоторых случаях вещества, секретируемые зоо- и фитопланктоном, привлекают холерные вибрионы и активируют образование ими биопленок. В частности, метанол, основной продукт фотосинтеза, защищающий водоросли от осмотического стресса, активизирует образование биопленки и транскрипцию *vps*-генов синтеза экзополисахаридного матрикса биопленки на поверхности водорослей [22]. В то же время, некоторые актиномицеты продуцируют вещества, ингибирующие образование биопленок холерными вибрионами на своей поверхности [10].

Холерные вибрионы прикрепляются к аттрактантам жгутиками, при помощи которых колонизируют хитин и целлюлозу, используя их в качестве питательных поверхностей, на которых бактериальные клетки формируют колонии, а впоследствии и биопленки, это позволяет клеткам защищать себя от хищников. Хитин и целлюлоза обеспечивают холерным вибрионам питание, толерантность к стрессам, таким как воздействие высокой температуры, низких значений pH, обезвоживания, а также защиту от хищников и тем самым создают условия, способствующие выживанию возбудителя, сохранению его вирулентности в окружающей среде, а биопленки, в свою очередь, являются резервуаром холерных вибрионов между эпидемиями [14]. Отмечена уникальная способность хитина индуцировать программу развития естественной компетентности у некоторых видов вибрионов. Поскольку хитиновая поверхность может являться единственным источником углерода, была изучена связь между репрессией катаболитов углерода и индуцируемой хитином естественной компетентностью для трансформации. Установлено, что 3'5'-циклический АМФ (цАМФ) и белок — регулятор CRP необходимы для осуществления программы индуцируемой хитином естественной компетентности бактерий. Таким образом, цАМФ необходим для успешной колонизации хитиновых поверхностей, способствует деградации и утилизации хитина и совместно с белком рецептором цАМФ CRP играет роль в повышении экспрессии генов компетентности [12]. В биопленках существуют условия для обмена генетической информацией: переноса генов, кодирующих холерный токсин (СТХ профар), геном филаментозного фага, и островка патогенности VPI, в том числе генов *tcr*, возможности сероконверсии, передачи плазмид антибиотикоустойчивости и др. Горизонтальный обмен генетической информацией происходит между близкородственными видами микроорганизмов, и природные популяции холерных вибрионов принято считать в последнее время резервуарами генов, что может способствовать формированию высоковирулентных клонов. Встраивание чужеродных генов происходит путем замены фрагмента собственной ДНК на похожий фрагмент. По мнению Basler M. et al. (2012) холерные вибрионы при помощи системы секреции шестого типа (Т6SS) впрыскивают свою ДНК через оболочку чужой бактериальной клетки. Методом сканирующей электронной микроскопии для визуализации этапов формирования биопленок штаммом дикого типа и мутантом по TCR на хитиновых поверхностях головоногих моллюсков было обнаружено, что TCR способствует бактериальным взаимодействиям, необходимым

для дифференциации биопленок на хитиновых поверхностях. По мнению Nalin D.R. et al. (1979), в эндемичных районах хитин с адгезированными холерными вибрионами может обеспечить их защиту от воздействия соляной кислоты в желудке человека при инфицировании. Факторы колонизации кишечника (TCP и MSHP) вовлечены в связывание хитина и образование биопленки на хитиновых поверхностях. Эти данные позволяют предположить, что клоны *V. cholerae*, способные колонизировать желудочно-кишечный тракт, вероятно, в окружающей среде будут персистировать в биопленке.

Сигналы из внешней среды активизируют транскрипционные гены, участвующие в формировании биопленки (*vps*, *msh*, *hap*, *nsr*), которые регулируются активаторами транскрипции *vpsR* и *vpsT*. Выработка экзополисахарида на молекулярно-генетическом уровне регулируется генами *vpsR* и *mshA* (маннозо-чувствительного гемагглютинина), способствующего колонизации холерными вибрионами абиотических поверхностей, а также генами *mbaA1* и *mbaA2*, ответственными за формирование биопленки [24].

Холерные вибрионы во внеклеточном матриксе биопленки помимо экзополисахарида содержат внеклеточную ДНК, моделируемую и регулирующую внеклеточными нуклеазами *Dns* и *Xds*, роль которых очень значительна, поскольку они определяют структуру биопленки, приобретение питательных веществ, отделение клеток от биопленки, способность комочков биопленки колонизировать тонкий кишечник и обеспечивают защиту бактериального сообщества [33].

Формирование биопленки холерных вибрионов также частично регулируется норспермидином-полиамином, синтезируемым ферментом карбоксинорспермидиндекарбоксилазой (*NspC*). Его отсутствие в клетках приводит к снижению ими способности образовывать биопленки. Установлено также, что при гиперэкспрессии гена *nspC* значительно повышается образование биопленок холерными вибрионами, а при экспрессии *vps* генов достоверно снижается подвижность вибрионов, что свидетельствует о роли указанных генов в регуляции формирования биопленок [30].

У *V. cholerae* ц-ди-ГМФ (циклический димерный гуанозинмонофосфат) положительно регулирует образование биопленки и отрицательно влияет на подвижность и вирулентность. Экспрессия биопленки индуцируется ц-ди-ГМФ путем индукция генов *vps*, при этом ц-ди-ГМФ репрессирует экспрессию генов биосинтеза жгутика. Транскрипция генов вирулентности также репрессируется ц-ди-ГМФ. В связи с этим, была предложена модель, согласно которой высокий уровень содержания ц-ди-ГМФ отмечен у биопленочных холерных вибрионов при персистенции в природных условиях и его образование репрессируется после инфицирования человека [13, 36].

Биопленки, являясь существенным фактором патогенности и одной из основных стратегий, повышающих выживание бактерий в организме человека и в окружающей среде, способствуют также обмену генетической информацией между бактериями. Это осуществляют целенаправленные лиганды за счет одного и того же специфического связывания. Такие молекулы, осуществляющие связь между двумя способами жизни холерных вибрионов, получили название «факторы колонизации с двойной ролью». Вибрионы, находящиеся в составе биопленок, более устойчивы к действию антибиотиков и других антибактериальных препаратов, к дезинфицирующим средствам, а также к воздействиям неблагоприятных факторов окружающей среды. Существование холерных вибрионов в биопленке дает бактериям ряд существенных преимуществ, в том числе наилучший доступ к питательным веществам, преимущества при размножении и сопротивление стрессовым факторам окружающей среды. Ю.В.Сизовой и др. обнаружено интенсивное образование биопленки эпидемически значимыми штаммами холерных

вibriонов, культивируемых в экспериментах с речной водой при температуре 22°C, но уже при 4°C они утрачивают эту способность и в большинстве своем погибают. В то же время, атоксигенные штаммы холерных вибрионов при температуре 4°C в семь раз интенсивнее образуют биопленку, чем при 22°C [8].

Авторы, изучавшие систему регуляции генов компетентности у холерных вибрионов Эль Тор, выяснили, что несколько генов, необходимых для поглощения чужеродной ДНК, включаются в ответ на комбинацию двух стимулов. Первый стимул — хитин, в присутствии которого вибрионы начинают производить регуляторный белок. Вторым сигналом является кратность популяции, которую холерные вибрионы оценивают по концентрации выделенных ими веществ (аутоиндукторов) при помощи системы QS [35].

Регулятором транскрипции для холерного токсина (ХТ) и токсин-регулируемых пилей (TCP) является *ToxR*, моделирующий экспрессию белков внешней мембраны *OmpU* и *OmpT*. В работе [38] отмечена роль свободноживущей амобы *Acanthamoeba castellanii* в выживаемости диких штаммов холерных вибрионов в отличие от мутантов по гену *ToxR* при температуре 37°C. Авторы предполагают, что *ToxR* играет регуляторную роль в переключении экспрессии *OmpT/OmpU*, изменениях в биопленке, ругозном фенотипе и выживании в ассоциации с *A. castellanii*.

Биопленки, образованные холерными вибрионами, представляют собой инфекционную форму этого патогенного микроорганизма. Экспериментально подтверждено, что колонизировавшие тело дафний холерные вибрионы выживали дольше, чем в среде культивирования. Концентрация  $10^5$  КОЕ/мл холерных вибрионов Эль Тор в теле циклопов, дафний, мойн была достаточной, чтобы вызвать инфекционный процесс у чувствительного организма (кролик). Колонизированный копепоид может содержать до  $10^4$  клеток холерных вибрионов, следовательно, биопленка на планктоне обеспечивает необходимую инфекционную дозу для «клинической» холеры [2].

Клетки холерных вибрионов, выделенные из биопленок, обладают гораздо более высоким уровнем инфекционности, чем планктонные клетки. Выявлены факторы, которые способствуют индукции биопленкой гиперинфекционности. Биопленки обогащены белком *PstS2* — периплазматическим компонентом системы поглощения фосфата *Pst2*, регулируемым геном *pst2*. Предполагается, что клетки *V. cholerae* в биопленках активизируют систему *Pst2* и за счет этого приобретают преимущество после проникновения в организм хозяина [28, 37].

Патогенные штаммы *V. cholerae* в составе биопленки, защищающей их от действия желудочного сока, проникают в кишечник человека [17]. Установлено, что вибрионы, находящиеся в биопленке, более эффективно, чем планктонные клетки, колонизируют кишечник [37]. Холерным вибрионам для достижения места колонизации — эпителия тонкого отдела кишечника — необходимо преодолеть ряд препятствий, в том числе перистальтику кишечника, вымывание жидкостью, вязкость слоя мукуса и pH. Известно, что, попав в организм человека, большая часть вибрионов погибает под действием кислой среды желудка. Лишь небольшая часть достигает тонкой кишки. Факторы патогенности обеспечивают колонизацию: жгутики обуславливают подвижность, муциназа разжижает слизь и облегчает достижения поверхности эпителия и нейроминидаза обеспечивает взаимодействие с микроворсинками [13]. В ответ на проникновение бактерий эпителиальные клетки выделяют щелочной секрет, насыщенный желчью — идеальная среда для размножения возбудителя. Биопленка способствует преодолению этих естественных барьеров и облегчает проникновение вибрионов в кишечник. В тонком кишечнике происходит отделение бактерий от биопленки, и высвободившиеся отдельные вибрионы начинают размножаться. Но прежде хо-

лерные вибрионы проходят через слой слизи на эпителии тонкого кишечника, состоящей из сахаридов муцина и гликокаликса, которые являются источниками углерода и азота, ферментов для утилизации сиаловых кислот, затем обнаруживают место своего прикрепления через восприятие полочки собственного жгутика [34].

Пробиотические бактерии, составляющие нормальную микрофлору, проходя желудок, могут находиться как на поверхности слизистой оболочки тонкого и толстого кишечника, будучи интимно с ней связанными (индигенная, мукозная или М-флора), так и в просвете кишки (просветная, полостная или П-флора), обеспечивая колонизационную резистентность. Представители М-флоры фиксируются к строго определенным рецепторам эпителиальных клеток. Штаммы, не являющиеся представителями нормальной флоры, должны проходить транзитом через желудок и тонкий кишечник. Механизмы, отвечающие за процесс специфической адгезии индигенных микроорганизмов, в последние годы интенсивно исследуются. Установлено, что одним из элементов, ответственных за нее, являются поверхностные структуры бактерий, содержащие адгезины, которые комплементарны соответствующим рецепторам, расположенным на мембранах эпителиоцитов. Адгезия бактерий может осуществляться и к рецепторам, локализованным в муциновом слое прикрытых другими микроорганизмами (опосредованная адгезия) [3].

Микробные клетки, окруженные полисахаридной капсулой, в слоях муциновой слизи равномерно распределены на расстоянии порядка размера микробной клетки друг от друга. Такое расположение обеспечивает контакт с диффундирующим в муцин химусом и клетками между собой для быстрого обмена продуктами метаболизма. Муцин состоит из пептидогликанов, продуцируемых бокаловидными клетками эпителия слизистой оболочки. Выявлены кишечные бактерии-комменсалы, которые могут ограничивать колонизацию кишечника возбудителем холеры. Такое антагонистическое взаимодействие может обуславливаться кворум-сенсингом. Авторы предполагают, что взаимоотношения между микроорганизмами способны оказывать помощь в предотвращении инфекционных болезней [35]. Участие генов *LuxS* в формировании биопленок указывает на кворум-зависимую природу этого процесса и у лактобацилл (состоят из клеточного муцина, фибропектина и бактериального экзополисахарида) — физическая защита соматических клеток кишечного эпителия от адгезии патогенных бактерий. Бифидобактерии представляются в виде очаговых пленок, а лактобациллы — в виде вкраплений в массе бифидобактерий [3].

По данным [9] для колонизации и сохранения/выживания у холерных вибрионов обнаружены ферменты, роль некоторых из них в биопленке еще предстоит выяснить, однако к настоящему времени обнаружена и изучена нейраминидаза, которая способна усиливать связывание энтеротоксина с эпителием клеток тонкого кишечника путем превращения поверхностных полисиалоганглиозидов в моносиалоганглиозид GM1, являющийся рецептором холерного токсина.

Показано также, что вибрионы обладают системой активации плазминогена в плазмин, которая включает как минимум  $\alpha$ -енолазу и мембранный белок OmpT, активность которого может играть существенную роль в патогенезе инфекции. Белок OmpT (сериновая протеаза) кроме защиты от антимикробных белков и активации плазминогена обеспечивает преимущество вибрионам в условиях кишечника чувствительного хозяина. Увеличение синтеза OmpT в присутствии высоких концентраций NaCl, пониженной (28°C) температуры и в минимальных средах позволило предположить его вклад в выживаемость во внешней среде [5, 7]. Проведено изучение хитиноподобного комплекса холерного вибриона.

Исследования позволили дополнить хитинолитический комплекс N-ацетил-β-D-глюкозаминидазой, ферментом, играющим важную роль, как и хитиназа, в выживаемости/сохраняемости холерных вибрионов в условиях контакта с хитинсодержащими объектами [6]. Выявленная антибактериальная способность у очищенного фермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы из *V. cholerae* [Дуванова О.В., 2015] представляется интересной, так как она перекликается с предположением Kaplan J. V. et al. о возможном участии аналогичного фермента из *Actinobacillus* spp. (в качестве фактора колонизации) в явлении устранения биопленок других бактерий с целью освобождения поверхностей для собственного укоренения в конкретной экологической нише [25].

Синтез биологически активных веществ остается одним из актуальных моментов взаимодействия холерных вибрионов с макроорганизмом. Одним из факторов, возможно, дающим холерным вибрионам селективное преимущество в микробных ассоциациях, является гемолизин, представляющий собой токсичное соединение как по отношению к клеткам эукариот, так и к клеткам прокариот. Его активность выявляется как на модели эритроцитов в пробе Грейга, так и на культурах клеток первичных и перевиваемых монослойных линий CHO, Hela, Vero и др., а также на модели инфузорий *Paramecium caudatum*. О важности гемолизина для жизнедеятельности холерных вибрионов говорит тот факт, что все холерные вибрионы в геноме имеют ген *hly*, кодирующий синтез гемолизина [Goldberg S.L. et al., 1985].

Для холерных вибрионов характерной особенностью является смена экологических ниш (макроорганизм и окружающая среда). Изменение условий существования является стрессом и ведет к синтезу биологически активных веществ, позволяющих вибрионам адаптироваться в новых экосистемах. Одним из таких адаптационных механизмов у холерных вибрионов является бактериоциногенез. Продукция бактериоцина — вибриоцина обеспечивает холерному вибриону селективное преимущество в условиях конкуренции во внешней среде. Холерные вибрионы продуцируют вибриоцины, проявляющие антагонистическую активность по отношению к энтеробактериям и отдельным штаммам холерных вибрионов. Вибриоцины схожи с другими известными бактериоцинами. Известно широкое распространение вибриоциногенеза у холерных вибрионов, выделенных из различных экосистем, и установлено, что спектр вибриоциногенной активности холерных вибрионов O1 и не O1 групп коррелирует с их вирулентностью. Вирулентные штаммы чаще, чем авирулентные, продуцируют вибриоцины с широким и умеренным спектрами активности. Бактериоцины холерных вибрионов действуют на микрофлору кишечника, создавая вибрионам селективные преимущества и дисбиоз как одно из проявлений патогенетического потенциала [1]. Существует мнение, что бактериоцины имеют узкий спектр действия, так как активны против бактерий того же или филогенетически близкородственных микроорганизмов, но как показывают новейшие исследования, спектр ингибирующего действия многих бактериоцинов фактически распространяется на представителей таксономических неродственных бактерий [21]. Преимущественная привязка бактериоцинов к плазмидам широко известна. Особенно интересно, что на одном внехромосомном генетическом элементе могут одновременно располагаться гены бактериоциногенности, токсигенности и других факторов патогенности [19].

В процессе конкуренции за колонизационную нишу холерный вибрион может вести себя и как хищник, лизируя другие бактерии. При этом он получает и энергетические преимущества, используя продукты лизиса в качестве источника питательных веществ. Для эффективного хищничества нужны механизмы, позволяющие отличить своих от чужих, как, например, у колициногенной *Escherichia*

coli. Можно предположить и участие некоторых ферментов, обладающих литическими свойствами, подобно N-ацетил-β-D-глюкозаминидазе холерного вибриона [Дуванова О.В., 2015]. Для реализации хищничества холерные вибрионы могут использовать и систему T6SS, о которой говорилось выше.

Важная роль в процессе колонизации кишечника и формирования биопленок принадлежит факторам адгезии токсин-регулируемым пилиям, за образование которых ответствен кластер генов, входящий в состав острова патогенности VP1. Пили служат в качестве рецептора фага CTXφ, секретируют фактор колонизации, участвуют в формировании микроколоний, а также осуществляют защиту бактериальных клеток от антимикробных агентов. В процессе принимает участие пилин Сер, ген которого входит в состав профагов CTX и пре-CTX, белки наружной мембраны Omp и маннозочувствительные пили MSHA, а также повышающие адгезивную активность силидазы (Nah) и порообразователь (H) [29]. Актиномодуляторами кроме MARTX являются Zot, NAP, VopF (эффектор T3SS), VgrG1 (эффектор T6SS), но их роль в адгезии неясна.

В верхнем отделе кишечника человека после достижения размножающимися вибрионами четко определенного уровня плотности в процесс включается кворум сенсинг. Размножение бактерий и формирование биопленок прекращаются, активизируется продукция гемагглютинин-протеазы (HapA-), которая «вырезает» клетки из биопленок для дальнейшего удаления из кишечника. Вибрионы покидают кишечник в составе комочков биопленки, в которых они находятся в состоянии временной гиперинфекциозности [18, 23]. Транзитная гиперинфекциозность увеличивает вирулентность возбудителя в 1000 раз, что является необходимым при дальнейшем инфицировании человека. Помимо этого, из кишечника человека с последующим попаданием в окружающую среду наряду с высоковирулентными штаммами выделяются измененные штаммы, утратившие под влиянием иммунного статуса организма или неадекватного приема противомикробных препаратов ряд свойств, в том числе и вирулентность.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Блинкова Л.П. Перспективы использования бактериоцинов для профилактики и терапии инфекций. Журн. микробиол. 1984, 5: 10-15.
2. Голубев Б.П. Экологические аспекты распространения вибрионов Эльтор в объектах окружающей среды. Автореф. дис. канд. мед. наук. Саратов, 1993.
3. Лахтин В.М., Алешкин В.А., Лахтин М.В. и др. Лектины, адгезины и лектиновые вещества лактобацилл и бифидобактерий. Вестник РАМН. 2006, 1: 28-34.
4. Маркина О.В., Шелухович А.И., Терентьев А.Н. и др. Стабилизированные фазовые варианты *Vibrio cholerae* El Tor P-18895: *V. Cholera* и патоген. для человека вибрионы. Ростов-на-Дону, Дониздат, 2014, 27: 112-114.
5. Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Романова Л.В. и др. Мембранный белок OmpT холерного вибриона как возможный представитель омптинов семейства *Vibrionaceae*. Проблемы особо опасных инфекций. 2014, 3: 52-56.
6. Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Водопьянов С.О. и др. Изучение хитиноподобного комплекса холерного вибриона сероварианта O139. Биотехнология. 2010, 1: 32-40.
7. Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Шипко Е.С. и др. Система активации плазминогена у *Vibrio cholerae*. Журн. микробиол. 2013, 5: 13-20.
8. Сизова Ю.В., Черепахина И.Я., Балахнова В.В. и др. Вариабельность свойств, характеризующих способность к выживанию холерных вибрионов в биопленочных сообществах. Пробл. особо опасных инф. 2012, 3 (113): 54-57.
9. Шиманюк Н.Я., Дуванова, О.В., Сучков И.Ю. и др. Нейраминидаза *Vibrio cholerae* O139 «Бенгал»: обнаружение, очистка и некоторые свойства. Биотехнология, 1999, 3: 56-62.
10. Augustine N., Peter A.W., Kerkar S., Thomas S. Arctic actinomycetes as potential inhibitors of *Vibrio cholerae* biofilm. Curr. Microbiol. 2012, 64 (4): 338-342.



11. Berk V., Fong J.C., Dempsey G.T. et al. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science*. 2012, 337 (6091): 236-239.
12. Blokesch M. Chitin colonization, chitin degradation and chitin-induced natural competence of *Vibrio cholerae* are subject to catabolite repression. *Environ. Microbiol.* 2012, 14 (8): 1898-1912.
13. Boyhan S., Beyhan S., Tischler A.D. et al. Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *J. Bacteriol.* 2006, 188 (10): 3600-3613.
14. Castro-Rosas J., Escartin, E.F. Increased tolerance of *Vibrio cholerae* O1 to temperature, pH, or drying associated with colonization of shrimp carapaces. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, 102: 195-201.
15. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999, 284: 1318-1322.
16. Emch M., Feldacker C., Yunus M. et al. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008, 78: 823-832.
17. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholera*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 62 (4): 1301-1314.
18. Faruque S.M., Biswas K., Udden S.M. et al. Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2006, 103 (16): 6350-6355.
19. Franklin A., Soderlind O., Mollby R. Plasmids coding for enterotoxins, K88 antigen and colicins in porcine *Escherichia coli* strains of O-group 149. *Med. Microbiol. Immunol.* 1981, 170: 63-72.
20. Giglio K.M., Fong J.C., Yildiz F.H., Sondermann H. Structural basis for biofilm formation via the *Vibrio cholerae* matrix protein RbmA. *J. Bacteriol.* 2013, 195 (14): 3277-3286.
21. Gillor O., Kirkur B.C., Riley M.A. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv. Appl. Microbiol.* 2004, 54: 129-146.
22. Gopalakrishnan S., Durai M., Kitchens K. et al. Larazotide acetate regulates epithelial tight junctions in vitro and in vivo. *Peptides*. 2012, 35 (1): 86-94.
23. Hartley D.M., Morris J.M., Smith D.L. Hyperinfectivity: a critical element in the ability of *V. cholerae* to cause epidemics? *PLoS. Med.* 2006, 3 (1): e7.
24. Islam M.S., Drasar B.S., Bradley D.J. Survival of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 with a common duckweed, *Lemna minor*, in artificial aquatic ecosystems. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990, 84 (3): 422-424.
25. Kaplan J.B., Raganath C., Ramasubbu N., Fine D.H. Detachment of *Actinobacillus actinomycescomitans* biofilm cells by an endogenous  $\beta$ -hexosaminidase activity. *J. Bacteriol.* 2003, 185 (16): 4693-4698.
26. Maestre-Reyna M., Wu W.J., Wang A.H. Structural insights into RbmA, a biofilm scaffolding protein of *V. cholerae*. *PLoS One*. 2013, 8 (12): e82458.
27. Moorthy S., Watnic P.I. Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol. Microbiol.* 2004, 52 (2): 573-587.
28. Mudrak B., Tamayo R. The *Vibrio cholerae* Pst2 phosphate transport system is upregulated in biofilms and contributes to biofilm-induced hyperinfectivity. *Infect. Immun.* 2012, 80 (5): 1794-1802.
29. Olivier V., Queen J., Satchell K.J.F. Successful small intestine colonization of adult mice by *Vibrio cholerae* requires ketamine anesthesia and accessory toxins. *PLoS One*. 2009, 4 (10): e7352.
30. Parker Z.M., Pendergraft S.S., Sobieraj J. et al. Elevated levels of the norspermidine synthesis enzyme NspC enhance *Vibrio cholerae* biofilm formation without affecting intracellular norspermidine concentrations. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012, 6 (1): 17-23.
31. Purdy A.E., Watnick P.I. Spatially selective colonization of the arthropod intestine through activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2011, 108 (49): 19737-19742.
32. Ray V.A., Morris A.R., Visick K.L. A semi-quantitative approach to assess biofilm formation using wrinkled colony development. *J. Vis. Exp.* 2012, 64: pii-4035.
33. Seper A., Fengler V.H., Roier S. et al. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 2011, 82 (4): 1015-1037.

34. Spagnuolo M.A., Dirita V., Kirschner D. A model for *Vibrio cholerae* colonization of the human intestine. *J. Theor. Biol.* 2011, 289: 247-258.
35. Suckow G., Seitz P., Blokesch M. Quorum sensing contributes to natural transformation of *Vibrio cholerae* in a species-specific manner. *J. Bacteriol.* 2011, 193 (18): 4914-4924.
36. Tamayo R., Pratt J.T., Camilli A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annual Rev. Microbiol.* 2007, 61: 131-148.
37. Tamayo R., Patimalla B., Camilli A. Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2010, 78 (8): 3560-3569.
38. Valeru S.P., Wai S.N., Saeed A. et al. ToxR of *Vibrio cholerae* affects biofilm, rugosity and survival with *Acanthamoeba castellanii*. *BMC Res. Notes.* 2012, 5 (1): 33.
39. Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999, 34: 586-595.
40. Zettler Erik R., Tracy J. Mincer, Linda A. Amaral-Zettler. Life in the «Plastisphere»: Microbial communities on plastic marine debris. *Envir. Sci. Technol.* 2013, 47 (13): 7137-7146.

*Поступила 15.01.16*

Контактная информация: Алексеева Людмила Павловна, д.б.н.,  
344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (862)240-27-03

© Г.Г.ХАРСЕЕВА, Н.А.ВОРОНИНА, 2016

*Г.Г.Харсеева, Н.А.Воронина*

## **ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ *CORYNEBACTERIUM NON DIPHThERIAE***

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

В обзоре рассмотрены факторы патогенности *Corynebacterium non diphtheriae* — пили, микрокапсула, клеточная стенка, ферменты патогенности, токсины, которые обуславливают способность микроорганизмов последовательно взаимодействовать с эпителием входных ворот организма, размножаться *in vivo*, преодолевать клеточные и гуморальные механизмы защиты. Отдельное внимание в статье уделено видам недифтерийных коринебактерий, патогенных для человека и способных продуцировать токсины — *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Описаны механизмы регуляции экспрессии PLD-экзотоксина, его взаимодействие с клетками иммунной системы.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 97—104

Ключевые слова: *Corynebacterium non diphtheriae*, PLD-экзотоксин, ферменты патогенности, пили (фимбрии), *Corynebacterium pseudotuberculosis*

*G.G.Kharseeva, N.A.Voronina*

## **PATHOGENICITY FACTORS OF *CORYNEBACTERIUM NON DIPHThERIAE***

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

Pathogenicity factors of *Corynebacterium non diphtheriae* — pili, microcapsule, cell wall, pathogenicity enzymes, toxins, that determine the ability of microorganisms to consequentially interact with epithelium of entry gates of the organism, replicate *in vivo*, overcome cell and humoral mechanisms of protection, are examined in the review. Particular attention in the paper is given to species of non-diphtheria corynebacteria, that are pathogenic for human and able to produce toxins — *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Mechanisms of expression regulation of PLD-exotoxins, its interaction with immune system cells are described.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 97—104

Key words: *Corynebacterium non diphtheriae*, PLD-exotoxin, pathogenicity enzymes, pili (fimbriae), *Corynebacterium pseudotuberculosis*

В настоящее время известно 88 видов *Corynebacterium non diphtheriae*, 67 из которых имеют медицинское значение [8, 12]. Большинство видов коринебактерий (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium riegelsii*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium amycolatum* и др.), являясь условно патогенными, колонизируют кожу и слизистые оболочки человека. При определенных условиях они способны вызывать, особенно у лиц с вторичными иммунодефицитными состояниями, менингиты, абсцессы мозга, перитониты, инфекции верхних и нижних дыхательных путей, поражения кожи и др. [14, 17, 36]. *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis* циркулируют среди животных (крупный рогатый скот, овцы, козы) и являются патогенными для человека и животных [4, 11, 42]. Они могут явиться причиной не только дифтериеподобных заболеваний, но и фарингитов, отитов, лимфаденитов, кожных язв и др. [4, 15].

Реализация патогенных свойств *C. non diphtheriae* осуществляется за счет факторов патогенности (пили, микрокапсула, клеточная стенка, ферменты патогенности, токсины), позволяющих коринебактериям последовательно взаимодействовать с эпителием входных ворот организма, размножаться *in vivo*, преодолевать клеточные и гуморальные механизмы защиты.

Пили (фимбрии) — фактор адгезии, инициирующий взаимодействие возбудителя с клетками хозяина, необходимое для последующей колонизации [1, 2, 7, 27, 30]. Кластеры генов фимбрий найдены как у патогенных, так и непатогенных коринебактерий, включая *C. accolens*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. glucuronolyticum*, *C. jeikeium*, *C. pseudogenitalium*, *C. striatum*, *C. tuberculostearicum* и *C. urealyticum* [37]. Каждый тип пилей (*SpaA*, *SpaD* и *SpaH*) реагирует с соответствующими структурами (рецепторами) эпителиальных клеток [21], что позволяет коринебактериям колонизировать различные виды слизистых оболочек. Наличие пилей различных типов у одного микроорганизма обуславливает их избирательную функциональную активность, тропность к определенным клеткам и тканям. При отсутствии *SpaA*-субъединицы и соответственно нитевидных выростов *SpaA*-типа коринебактерии остаются способными адсорбироваться на фарингеальных клетках, а в отсутствие малых субъединиц *SpaB* и *SpaC* типа — нет. Это объясняется тем, что большие субъединицы являются структурными компонентами пилей, а малые — функциональными компонентами, играющими ключевую роль в адгезии [1, 12, 22]. Малые субъединицы фимбриальных протеинов (*SpaB*, *C*, *E*, *F*, *G*, *I*) могут быть связаны не только с большими фимбриальными субъединицами (*SpaA*, *D*, *H*), но и непосредственно с клеточной стенкой [22, 23], которая также обладает способностью к адгезии [21]. Формирование пилей и скорость адгезии — не связанные процессы. Штаммы, их не имеющие, также могут прикрепляться к клеткам хозяина [33], что указывает на наличие иных, помимо пилей, факторов адгезии. Попадая в кровяное русло, коринебактерии связываются с фибриногеном и трансформируют его в фибрин, который, формируя слой на поверхности бактериальной клетки, защищает их от фагоцитоза [12]. Как токсигенные, так и нетоксигенные штаммы коринебактерий способны адгезироваться на поверхности макрофагов и вызывать их гибель. У патогенных коринебактерий (*C. diphtheriae* и *C. jeikeium*), имеющих совершенную систему поглощения ионов калия, устойчивость к фагоцитозу более выражена, чем у непатогенных (*C. glutamicum*) [12].

Кроме пилей существуют и другие неполимерные адгезины (гемагглютинин,

ферменты с транссиалидазной активностью), которые распознают различные структурные элементы поверхности клеток хозяина, в том числе, компоненты внеклеточного матрикса — коллаген, эластин, протеогликаны, гиалуроновую кислоту.

Нейраминидаза (сиалидаза) и N-ацетилнейраминидаза обеспечивают разрушение сиаловых/нейраминовых кислот и других моносахаридов, входящих в состав гликопротеидов на поверхности клетки хозяина и, как следствие, нарушают структуру и функции ЦПМ, повышая ее проницаемость. Освобождают клеточную поверхность и интенсифицируют межклеточное взаимодействие [1, 12] с токсинопродуцирующими штаммами, подготавливая рецепторы эпителия для прикрепления токсина.

Гиалуронидаза разрушает гиалуроновую кислоту, являющуюся основным межклеточным веществом соединительной ткани, способствует проникновению микробов вглубь тканей организма, является фактором инвазивности.

Уреаза расщепляет мочевины с образованием аммиака и углекислоты. Аммиак, вызывая защелачивание среды, подавляет клеточное дыхание и обеспечивает прямой токсический эффект на органы центральной нервной системы. Уреаза отсутствует у *C. diphtheriae*; однако обнаружена у *C. riegelii*, *C. urealyticum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. ulcerans* и реже *C. amycolatum*. Наиболее высокой ее активностью обладают *C. riegelii* и *C. urealyticum*, у которых данный фермент рассматривается как фактор патогенности [16].

Микрокапсула защищает коринебактерии от фагоцитоза, действия факторов внешней среды, обеспечивает способность к колонизации. Поверхностные белки, входящие в состав верхнего слоя коринебактерий, обнаружены у *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. glutamicum*, *C. jeikeium* и *C. pseudotuberculosis*. Одни из них имеют функции поглощения питательных веществ и роста, другие принимают участие в процессах адгезии [12]. Поверхностно-связанный белок DIP1281, выявленный у *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. glutamicum* и *C. jeikeium* [35], рассматривается как фактор инвазивности [3, 40]. Поверхностные липиды считают одним из главных факторов патогенности у *C. pseudotuberculosis*, индуцирующим геморрагический некроз после внутрикожной инъекции морской свинке и развитие хронического абсцесса у мышей [13], [Dorella F.A. et al., 2006]. Липиды внешней оболочки *C. pseudotuberculosis* (*C. ovis*) оказывают цитопатическое воздействие на макрофаги коз и мышей, повреждая целостность их оболочки. При заражении макрофагов факультативным внутриклеточным паразитом *C. pseudotuberculosis* происходит поглощение бактерий и образование фаголизосомы, причем макрофаги погибают, а бактерии выживают, ускользая от иммунного ответа хозяина [26].

Коринебактериальные порины образуют каналы во внешней бактериальной мембране, способствуя транспорту питательных веществ в клетку. Обнаружены у *C. glutamicum*, *C. amycolatum*, *C. efficiens*, *C. callunae* и *C. diphtheriae* [1]. Известно несколько различных каналобразующих белков — PorA, PorB, PorC и PorH, основными из которых являются PorA и PorH. У штаммов *C. glutamicum* выявлена чрезвычайно высокая изменчивость PorA и PorH. Сравнительные исследования двух штаммов *C. glutamicum* — дикого и мутантного, лишённого PorA, показали значительное снижение чувствительности последнего к ампициллину, канамицину, стрептомицину, тетрациклину и гентамицину. Мутации в генах поринов могут приводить к появлению устойчивости бактерий к антибиотикам, кроме того, порины увеличивают вирулентность коринебактерий посредством подавления фагоцитоза.

Клеточная стенка ограничивает микробную клетку снаружи, обеспечивая стабильность размеров и формы коринебактерий, ее механическую, осмотическую

и химическую защиту. Корд-фактор выполняет роль барьера проницаемости; вызывает разрушение митохондрий и угнетение дыхания; ингибирует процессы фосфорилирования; обуславливает незавершенность процессов фагоцитоза, препятствуя образованию фаголизосомы и приводя к гибели клеток [12]. Составные элементы слоя миколовых кислот, входящих в состав корд-фактора, могут активировать систему врожденного иммунитета, способствуя экспрессии TLR, и ингибировать функцию макрофагов [18]. Липидоманнан и липоарабиноманнан клеточной стенки способствуют связыванию коринебактерий с эпителиальными клетками хозяина. У *S. glutamicum* липоарабиноманнан и его производные способны инициировать иммунный ответ, взаимодействуя с TLR2, активируя дендритные клетки и Т-хелперы [12, 28, 34].

Некоторые виды *S. non diphtheriae* помимо указанных факторов патогенности обладают способностью продуцировать токсины. Так, PLD-ген, кодирующий выработку PLD-экзотоксина (фосфолипаза D, гемолитический токсин или «*ovis toxin*») с м.м. 31,4 кДа, обнаружен у *S. pseudotuberculosis* и *S. ulcerans* [19, 31]. PLD-экзотоксин катализирует диссоциацию сфингомиелина, увеличивает проницаемость сосудов и обладает гемолитической активностью [31], обуславливая распространение *S. pseudotuberculosis* и *S. ulcerans* в организме (проникновение в фагоциты, транспорт в регионарные лимфатические узлы, выживание внутри клеток) [5]. PLD-экзотоксин вызывает поражения кожи и в более высоких дозах является смертельным для лабораторных и домашних животных [Dorella F.A. et al., 2006]. Регуляция активности PLD-экзотоксина — сложный процесс, играющий важную роль в адаптации *S. pseudotuberculosis* к изменяющимся условиям среды обитания в организме хозяина на разных этапах инфекционного процесса. Установлено, что температурное воздействие (+43°C) в течение 20 мин. приводит к снижению экспрессии PLD вследствие уменьшения содержания м-РНК, кодирующей синтез PLD. Однако многие детерминанты вирулентности бактерий регулируются более чем одним фактором окружающей среды (температура, фазы роста, наличие питательных веществ, pH, осмотическое давление). Для *S. pseudotuberculosis* установлена прямая зависимость экспрессии PLD от густоты микробной взвеси в среде и обратная — от воздействия температуры. При этом действие температуры (+43°C) снижает уровень экспрессии PLD независимо от базального уровня густоты микробной взвеси. Механизмы контроля и регуляции гена-промотора PLD остаются пока невыясненными. Процессы регуляции PLD обусловлены многофакторным воздействием (колебания температуры, истощение питательной среды, изменение скорости роста микробной популяции) и могут включать в себя такие механизмы, как связывание репрессоров или активаторов, изменение структуры ДНК *S. pseudotuberculosis* под действием температуры. Высокий уровень экспрессии PLD выявлен у *S. pseudotuberculosis* внутри макрофагов при их экспериментальном заражении. Рассматривается несколько механизмов снижения жизнеспособности макрофагов, пораженных *S. pseudotuberculosis*. Во-первых, этот эффект может быть связан с нарушением целостности плазматической мембраны макрофагов под действием сфингомиелиназной активности PLD. Во-вторых, после гибели макрофагов клеточное содержимое с PLD выходит в среду, в результате чего происходит повреждение сфингомиелина наружной мембраны еще жизнеспособных макрофагов. Снижение жизнеспособности макрофагов под действием PLD может быть обусловлено и нарушением целостности зон цитоплазматических мембранных внутриклеточных структур макрофагов, внутри которых расположены *S. pseudotuberculosis*, что приводит к выходу бактерий из этой ограниченной области. Третий механизм действия PLD внутри макрофагов может быть связан с нарушением главной каскадной системы

регуляции (сигнальных путей) у млекопитающих. PLD в естественных условиях (*in vivo*) приводит к увеличению проницаемости сосудов, в результате чего бактерии распространяются от места внедрения инфекции к лимфатическим узлам, где образуются абсцессы. Экспрессируемый внутриклеточными бактериями PLD имеет прямое влияние на жизнеспособность макрофагов и формирование абсцесса. При экспериментальном заражении овец *S. pseudotuberculosis* наблюдали кратковременное повышение температуры тела животных в первый день после инфицирования. Вероятно, на ранних стадиях инфекционного процесса *S. pseudotuberculosis* размножается внеклеточно. При этом экспрессии PLD не происходит из-за подавляющего воздействия высокой температуры (теплового шока) животного и небольшого количества внеклеточно расположенных бактерий. Затем, по всей видимости, происходит повторное заражение клеток [25].

Процесс инфицирования макроорганизма *S. pseudotuberculosis* состоит из нескольких этапов [25]. Вначале бактерии должны преодолеть кожный барьер, как правило, через раневую поверхность или любые повреждения кожных покровов, а затем попасть в лимфатические узлы. Это происходит как до, так и после интернализации бактерий внутрь фагоцитирующих клеток. В лимфатических узлах бактерии должны пройти циклы репликации, фагоцитоза и повторного заражения новых фагоцитов. Затем происходит выход бактерий из лимфатического узла с последующим повторением всего цикла. Внешняя среда, кровь, лимфатические узлы и внутриклеточная среда макрофагов обуславливают адаптацию коринебактерий для их дальнейшего выживания и потребления питательных веществ, необходимых для жизнедеятельности и репликации. Экспрессия PLD *S. pseudotuberculosis* осуществляется в ответ на воздействие факторов внешней среды, что приводит к развитию инфекционного процесса в макроорганизме [25].

Наиболее выраженными токсигенными свойствами обладают S-формы *S. pseudotuberculosis*, R-формы менее токсигенны. Установлено, что понижение температуры культивирования на МПА до +2-4°C приводит к повышению токсинообразования всех форм культур. Заражение белых мышей фильтратом культур вызывало в 65% случаев гибель на 3 — 8 сутки. При патолого-анатомическом вскрытии у мышей обнаруживали отеки, кровоизлияния в брюшной и грудной полости.

Другими важными факторами вирулентности *S. pseudotuberculosis* являются интегральный мембранный белок (FagA), энтеробактин (FagB), АТФ-связывающий цитоплазматический мембранный белок (FagC), железо-связывающий белок сидерофора (FagD). Их синтез связан с опероном, отвечающим за поглощение железа, что обеспечивает выживание *S. pseudotuberculosis* в организме животных. Этот оперон локализован рядом с геном PLD [9]. Нахождение семи предполагаемых «островов» патогенности у *S. pseudotuberculosis*, содержащих классические элементы вирулентности, в том числе, генов поглощения железа, фимбриальных субъединиц, инсерционных элементов и секретируемых токсинов, вероятно, приобретены, главным образом, в результате горизонтального переноса [38].

Способность к токсинообразованию среди *S. non diphtheriae*, помимо *S. pseudotuberculosis*, имеют и *S. ulcerans*, имеющие тесные филогенетические связи с *S. diphtheriae*, обладая дифтерийным тох-геном [24]. Токсигенность коринебактерий связана с лизогенностью (наличием у токсигенных штаммов умеренных фагов/профагов, несущих тох-ген) [24]. Горизонтальный перенос генов является одним из основных механизмов приобретения бактериями новых свойств. Показано, что перенесенные по горизонтали гены токсигенности часто отключаются и становятся псевдогенами, не производящими токсинов [10, 41]. Тох-

псевдогены *C. diphtheriae* схожи с тох-генами *C. ulcerans*, что является подтверждением горизонтального переноса генов между штаммами коринебактерий. Однако тох-ген *C. ulcerans* не идентичен таковому у *C. diphtheriae* вследствие большой неоднородности генетической последовательности в отличие от высоко консервативного генома *C. diphtheriae*. В то же время, обнаружено сходство в последовательностях геномов *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* и их четкое отличие от генома *C. diphtheriae* [39].

Одной из причин проявления патогенных свойств *C. non diphtheriae* является липофильность и гидрофобность некоторых видов, среди которых лидируют *C. jeikeium*, вызывающие сепсис и другие инфекции у хирургических больных. *C. jeikeium* относятся к CDC группе G2 — второй по частоте встречаемости среди коринебактерий, вызывающих тяжелые инфекции. У этиологически значимых штаммов обнаружена мультирезистентность к антибиотикам. Среди коринеформных бактерий поверхности кожи человека почти 85% из них являются липофильными. Гидрофобность играет большую роль в бактериальной адгезии, обеспечивает формирование биопленки и облегчает распространение в организме внутри фагоцитов. Усиление гидрофобности способствует более интенсивному образованию биопленки, особенно в условиях развития инфекции при дефиците железа [6, 29, 32]. Причина гидрофобности заключена в особом строении различных видов длинноцепочечных коринемиколовых кислот, длина цепей от 22 до 35 атомов углерода (специфично для всего рода *Corynebacterium*). Липиды, ответственные за барьерную функцию, могут быть прекрасной базой для присоединения гидрофобных бактерий. Липидный слой — это ключ к колонизации кожи этими бактериями, которым необходимы липиды для роста. Наиболее гидрофобными и активными в образовании биопленки бактериями являются *C. jeikeium* (CDC группа G2). Липофильные коринебактерии остаются в динамическом равновесии с коагулазонегативными стафилококками. Смешанная популяция коринебактерий и стафилококков способствует формированию взаимно поддерживающегося симбиоза, который может эффективно противостоять иммунной системе и действию антибиотиков [20]. Инвазивная способность нетоксигенных коринебактерий, по-видимому, обусловлена поверхностными белками и липидами, *сogD*-фактором, нейраминидазой гиалуронидазой, сфингомиелиназой, патогенетическое значение которых пока недостаточно известно.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Харсеева Г.Г., Алиева А.А. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль поверхностных структур и механизм формирования. Журн. микробиол. 2014, 4: 109-117.
2. Alteri C.J., Xicohtencatl-Cortes J., Hess S. et al. Mycobacterium tuberculosis produces pili during human infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007, 104: 5145-5150.
3. Anantharaman V., Aravind L. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. Genome Biology. 2003, 4 (2): 2-6.
4. Aquino de Sa Mda C., Gouveia G.V., Krewer Cda C. et al. Distribution of PLD and Fag A, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseous lymphadenitis. Genet Mol. Biol. 2013, 36 (2): 265-268.
5. Baird G.J., Fontaine M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. J. Comp. Pathol. 2007, 137: 179-210.
6. Baldsari L., Bertuccini M.G., Ammendolia C.R. et al. Effect of iron limitation on slime production by *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. 2001, 20: 343-345.
7. Barocchi M.A., Ries J., Zogaj X. et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. 2006, 10 (3): 2857-2862.
8. Bernard K.A. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. J. Clin. Microbiol. 2012, 50 (10): 3152-3158.

9. Billington J.S., Esmay P.A., Songer J.G. et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002, 208: 41-45.
10. Bonmarin I., Guiso N., Grimont P.A.D. Diphtheriae: a zoonotic disease in France? *Vaccine.* 2009, 27 (31): 4196-4200.
11. Bregenzer T., Frei R., Ohnacker H. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in a butcher. *Clin. Microbiol. Infect.* 1997, 3 (6): 696-698.
12. Burkovski A. Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. Hindawi Publishing Corporation ISRN Microbiology, 2013.
13. Carne H.R., Kater J.K., Wickham N. A toxic lipid from the surface of *Corynebacterium ovis*. *Nature.* 1956, 178:701-702.
14. Cazanave C., Kerry E. et al. *Corynebacterium* prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50 (5): 1518-1523.
15. Connor K.M., Quirie M.M., Baird G. et al. Characterization of united kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38: 2633-2637.
16. Funke G., Lawson P.A., Collins M.D. *Corynebacterium riegliei* sp. nov., an unusual species isolated from female patients with urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36 (3): 624-627.
17. Funke G., Von Graevenitz A., Clarridge J.E. et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997, 10 (1): 125-159.
18. Hansmeier N., Chao T.C., Kalinowski J. et al. Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. *Proteomics.* 2006, 6: 2465-2476.
19. Hodgson A.L.M., Carter K., Tachedjian M. et al. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine.* 1999, 17: 802-808.
20. Kwaszewska A.K., Brewczynska A., Szewczyk E.M. Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin *Corynebacteria*. *Polish. J. Microbiol.* 2006, 55(3): 189-193.
21. Mandlik A., Swierczynski A., Das A. et al. *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 2007, 64: 111-124.
22. Mandlik A., Swierczynski A., Das A. et al. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.* 2008, 16 (1): 33-40.
23. Marchand C. H., Salmeron C., Raad R.B. Biochemical disclosure of the mycolate outer membrane of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 2012, 194 (3): 587-597.
24. Maximescu P., Oprisan A., Pop A. et al. Further studies on *Corynebacterium* species capable of producing diphtheria toxin (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. ovis*). *Microbiology.* 1974, 82 (1): 49-56.
25. McKean S., Davies J., Moore R. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology.* 2007, 153 (7): 2203-2211.
26. McKean S., Davies J., Moore R. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes Infect.* 2005, 7: 1352-1363.
27. Mishra A.K., Das A., Cisar J.O. Sortase catalyzed assembly of distinct heteromeric fimbriae in *Actinomyces naeslundii*. *J. Bacteriol.* 2007, 189: 3156-3165.
28. Mishra A.K., Krumbach K., Rittmann D. et al. Deletion of man C in *Corynebacterium glutamicum* results in a phospho-myo-inositol mannoside- and lipoglycan-deficient mutant. *Microbiology.* 2012, 158 (7): 1908-1917.
29. Moreira L.D.O., Andrade A.F.B., Vale M.D. et al. Effect of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69: 5907-5913.
30. Nelson A., Ries J., Bagnoli F. Rrg A is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 2007, 66: 329-340.
31. Oliveira M., Barroco C., Mottola C. et al. First report of *Corynebacterium pseudotuberculosis*



- sis from caseous lymphadenitis lesions in Black Alentejano pig (*Sus scrofa domesticus*). *BMC Vet. Res.* 2014, 10: 218.
32. Olson M.E., Ceri H., Morck D.G. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 2002, 66:86-92.
  33. Ott L., Höller M., Gerlach R. et al. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC Microbiology.* 2010, 10: 2.
  34. Puech V., Chami M., Lemassu A. et al. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology.* 2001, 147 (5): 1365-1382.
  35. Puliti M., Von Hunolstein C., Marangi M. Experimental model of infection with non-toxicogenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* and development of septic arthritis. *J. Med. Microbiol.* 2006, 55: 229-235.
  36. Reddy B.S., Chaudhury A., Kalawat U. et al. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). *Indian J. Med. Microbiology.* 2012, 30 (1): 52-57.
  37. Rogers E.A., Das A., Ton-That H. Adhesion by pathogenic corynebacteria. *Adv. Exper. Med. Biol.* 2011, 715: 91-103.
  38. Ruiz J.C., D'Afonseca V., Silva A. et al. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One.* 2011, 6: 8551.
  39. Sekizuka T., Yamamoto A., Komiya T. et al. *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage. *BMC Microbiology.* 2012, 12: 72 doi: 10.1186/1471-2180-12-72.
  40. Tsuge Y., Ogino H., Teramoto H. et al. Deletion of *cgR\_1596* and *cgR\_2070*, encoding NlpC/P60 proteins, causes a defect in cell separation in *Corynebacterium glutamicum* R. *J. Bacteriol.* 2008, 190: 8204-8214.
  41. Wagner J., Ignatius R., Voss S. et al. Infection of the skin caused by *Corynebacterium ulcerans* and mimicking classical cutaneous diphtheria. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 33 (9): 1598-1600.
  42. Yeruham L., Elad D., Friedman S. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli dairy cattle. *J. Epidemiol. Infect.* 2003, 131 (2): 947-955.

*Поступила 15.09.15*

Контактная информация: Харсеева Галина Георгиевна, д.м.н., проф., 344022, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29, р.т. (632) 250-41-09

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*В.И.Тынянова, В.П.Зюзина, Г.В.Демидова, Е.П.Соколова*

## **СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЭНДОТОКСИНА *YERSINIA PESTIS***

Ростовский-на-Дону противочумный институт

Проанализированы собственные и данные литературны о механизмах реализации токсического потенциала липополисахарида (ЛПС) *Yersinia pestis* в условиях макроорганизма. Рассматриваются две формы модификации ЛПС — температурозависимые изменения химической структуры полимеров и изменение их конформации под влиянием факторов микро- и макроорганизмов. Особое внимание уделено сравнительному изучению токсических и иммуномодулирующих свойств указанных форм ЛПС. Сделан вывод, что обе формы ЛПС активируют рецептор TLR4/MD2, индуцируя синтез цитокинов двух типов — провоспалительных и интерферонов. Однако доминантность их сигнальных путей и кросс-регуляция проводимого сигнала зеркально противоположны, в результате чего исходная форма ЛПС инициирует синтез интерферонов, а конформационно измененная — провоспалительных цитокинов. Результаты экспериментов обобщены в виде

схем передачи сигнала рецептором TLR4/MD2 под воздействием двух форм ЛПС *Y. pestis*. Вариации цитокининдуцирующих свойств исходной и конформационно измененной формы ЛПС *Y. pestis* соответствуют иммунному ответу организма на каждой стадии инфекционного процесса: поздний воспалительный ответ по интерфероновому типу характерен для внутриклеточного цикла развития чумы, а гиперпродукция воспалительных цитокинов наблюдается на терминальной стадии инфекционно-токсического шока.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 104—112

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, липополисахарид, модифицированные формы ЛПС, цитокины

*V.I.Tunyanova, V.P.Zyuzina, G.V.Demidova, E.P.Sokolova*

## SPECIFICITY OF IMMUNE MODULATING EFFECT OF *YERSINIA PESTIS* ENDOTOXIN

Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Russia

Literature and own data on mechanisms of realization of lipopolysaccharide (LPS) toxic potential of *Yersinia pestis* in the conditions of a macroorganism are analyzed. 2 modifications of LPS are examined — temperature dependent changes of chemical structure of polymers and a change in their conformation under the effect of micro- and macroorganism factors. A special attention is paid to comparative study of toxic and immune modulating properties of the specified LPS forms. Both LPS forms are concluded to activate TLR4/MD2 receptor, inducing synthesis of 2 types of cytokines — pro-inflammatory and interferons. However, dominance of their signal pathways and cross-regulation of the transduced signal are mirrored, and as a result the initial form of LPS initiates interferon synthesis, and conformationally changed — pro-inflammatory cytokines. Results of the experiments are summarized in 2 schemes of signal transfer by TLR4/MD2 receptor under the effect of 2 forms of *Y. pestis* LPS. Variations of cytokine-inducing properties of the initial and conformationally-altered forms of *Y. pestis* LPS corresponds to the immune response of the organism at each stage of the infectious process: late inflammatory response by interferon type is characteristic for intra-cellular cycle of plague development, and pro-inflammatory cytokine hyper-production is observed at the terminal stage of infection-toxic shock.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 104—112

Key words: *Yersinia pestis*, lipopolysaccharide, modified LPS forms, cytokines

По мнению специалистов основным патогенетическим фактором *Yersinia pestis* является эндотоксин — липополисахарид (ЛПС) — клеточной стенки бактерий. Действие эндотоксина проявляется при любой форме чумы на терминальной стадии инфекции и приводит к развитию септического шока [11 — 13]. Однако механизм реализации токсического потенциала ЛПС до настоящего времени не имеет научного объяснения.

Как известно, ЛПС *Y. pestis* отличается рядом биологических особенностей: он относится к R-хемотипу, химическое строение его весьма вариабельно, а синтез регулируется температурой. При низких температурах выращивания клеток (26 — 28°C) состав липида А гетерогенен и представлен смесью три-, тетра-, пента- и гексаацильных форм с количественным преобладанием последних [11, 12]. Препараты ЛПС28 обладают средней степенью токсичности для биопробных животных и цитокин-индуцирующей способностью [5]. В то же время, ЛПС, выделенный из клеток, выращенных при температуре тела млекопитающего (37°C), отличается от ЛПС28 по химическому составу сахаров и жирных кислот. Липид А ЛПС37 более гомогенен и содержит преимущественно три- и тетраацильные

молекулы. Модификация, которую претерпевает ЛПС37 (гипоацилированный липид А), приводит к изменению его биологических свойств: препарат малотоксичен или вообще нетоксичен для биопробных животных, является слабым индуктором провоспалительных цитокинов и по данным последних лет оказывает супрессирующее действие на сигнальные пути синтеза провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 [5, 14, 15, 20]. По мнению большинства исследователей факт низкой иммуностимулирующей активности ЛПС37 *Y. pestis* биологически целесообразен, поскольку позволяет патогену избегать губительного действия антибактериальных факторов врожденного иммунитета. Тем не менее, три- и тетраацилированные формы липида А, свойственные ЛПС37, являются обязательным условием для проявления вирулентных свойств возбудителя чумы в условиях *in vivo* [11, 12, 15, 19].

По мнению Smith H. et al., высказанному в 1972 г., «*Y. pestis* относится к числу патогенов, токсический компонент которых реализуется непосредственно в организме инфицированного животного», что предполагает переход малотоксичного ЛПС37 в высокотоксичную форму под влиянием факторов макро- и/или микроорганизма.

Сформулированная нами гипотеза заключается в том, что процесс модификации ЛПС *Y. pestis* многоступенчатый и не ограничивается только температурозависимыми изменениями структуры ЛПС. В соответствии со стадиями развития инфекции (внутриклеточная, внеклеточная) ЛПС *Y. pestis*, видимо, может также претерпевать две фазы модификации — на уровне химической структуры ЛПС и на уровне изменения его конформации. При смене хозяев (блоха/теплокровный организм) на этапе внутриклеточного развития решающим фактором модификации ЛПС является температура тела хозяина. По мере развития инфекционного процесса на стадии внеклеточного размножения возбудителя чумы под влиянием факторов макро- и микроорганизмов ЛПС *Y. pestis* вторично модифицируется без изменения химической структуры, а только на уровне конформации молекул. На этом этапе, как мы предполагаем, биологически инертный ЛПС37 *Y. pestis* трансформируется в токсически активную форму и реализует функции, присущие эндотоксину возбудителя чумы.

Модуляторы конформационных изменений бактериальных ЛПС хорошо известны. К ним относятся липополисахарид-ассоциированные протеины микроорганизмов, которые образуют специфический комплекс с ЛПС, изменяют конформацию и усиливают его действие [17]. В условиях макроорганизма подобную функцию выполняют белки и липопротеиды высокой и низкой плотности. Одни из них способствуют формированию токсически активной конформации ЛПС, другие же, напротив, блокируют его активность [8].

Экспериментальной основой сформулированной нами гипотезы послужил феномен, открытый А.Н.Кравцовым и др. в 1993 г. [3], которые установили, что вирулентные свойства бактерий чумы могут быть усилены в условиях *in vitro* под влиянием биологически активного вещества (БАВ), присутствующего в эритроцитах крови и тканях паренхиматозных органов млекопитающих. При этом отмечены два важных момента: для проявления феномена необходима предварительная инкубация клеток при температуре 37°C, а усиление вирулентных свойств имеет фенотипический характер.

В дальнейшем результаты исследования этого феномена были изложены в ряде научных публикаций [4, 9]. Установлено, что биологически активное вещество представляет собой низкомолекулярное соединение с выраженными полярными свойствами и относится к классу гликолипидов. Повышение вирулентности *Y. pestis* связано с активацией токсических субстанций, присутствующих в кап-

сильном веществе возбудителя чумы. Выяснили, что под воздействием БАВ изменяется молекулярная организация капсульного вещества бактерий, меняется конформация молекул ЛПС и усиливается их токсичность. Установили также, что в этих условиях ЛПС и специфический белок *Y. pestis* «мышинный» токсин (МТ) могут взаимодействовать между собой с образованием высокотоксичного комплекса ЛПС-МТ. При этом количество МТ и ЛПС, которые по отдельности не токсичны для мышей и морских свинок, в комплексе проявляют высокую токсичность для обоих видов животных. Доказано, что образование физико-химических связей между ними имеет специфический характер и сопровождается изменением конформации молекул ЛПС.

Изменение токсичности ЛПС а priori предполагает различное воздействие исходных и конформационно измененных форм ЛПС на рецепторы TLR4/MD2 фагоцитарных клеток макроорганизма. В настоящей работе обобщены результаты изучения иммуномодулирующих свойств двух форм ЛПС *Y. pestis* [5 — 7].

Объектом исследований служили препараты ЛПС37, выделенные из 37°C культур типичного полноценного высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 (pFra<sup>+</sup>, pCad<sup>+</sup>, pPst<sup>+</sup>, LD<sub>50</sub>=3÷20 м. к./мышь). Специфика иммуномодулирующего действия ЛПС этого штамма в полной мере адекватна действию эндотоксина *Y. pestis*. Модификацию ЛПС проводили указанными выше двумя методами. Выяснили, что исходный вариант ЛПС37 проявляет достаточно высокую степень токсичности и вызывает гибель животных в дозах 340÷500 мкг (LD<sub>50</sub>) на мышь. Модификация ЛПС37 «мышинным» токсином или же БАВ усиливает токсические свойства препаратов приблизительно в 2 — 3 раза, при этом значения LD<sub>50</sub> ЛПС37-МТ и LD<sub>50</sub> ЛПС37-БАВ достоверно не отличаются друг от друга и составляют 110÷250 мкг на мышь [5].

При сравнительном изучении иммуномодулирующих свойств исходных и конформационно измененных форм ЛПС37 экспериментально установлено, что наиболее полную информацию о специфичности действия изучаемых форм ЛПС позволяет получить комплексный подход, состоящий из трех способов: одновременный количественный учет синтеза цитокинов двух типов — провоспалительных (TNF-α) и интерферонов (IFN-γ) в различные промежутки времени (изучение в динамике); определение профиля цитокинового ответа TNF-α и IFN-γ при рестимуляции TLR4 исследуемыми препаратами ЛПС на фоне первичной активации рецептора S-формами или R-формами ЛПС *Escherichia coli*; оценка эффекта эндотоксиновой толерантности к сочетанному действию S- и R- форм ЛПС *E. coli* и исследуемых ЛПС на модели мышей, сенсибилизированных D-галактозаминном.

Все три способа отражают особенности структурно-функциональной организации рецептора TLR4/MD2. Уникальность этого рецептора заключается в том, что он способен активировать две системы передачи сигнала, одна из которых направлена на активацию фактора ядерной транскрипции синтеза провоспалительных цитокинов (NF-κB), а вторая активирует фактор ядерной транскрипции интерферонов (IRF3). Оба пути взаимосвязаны через молекулу бифункционального действия — TRAF6, которая способна переключать сигнал в обоих направлениях [21]. Кроме того, TLR4 относится к рецепторам синергического действия, т. е. его активация сопровождается возбуждением иных Toll-рецепторов и, в частности, TLR2, с которым TLR4 находится в тесной регуляторной взаимосвязи [16]. Таким образом, синтез цитокинов представляет собой суммарный эффект сложного взаимодействия проводящих и регуляторных систем TLR4 и связанных с ним рецепторов.

Эксперименты *in vitro* выполнены на клетках моноцитов человека линии

U-937. Полученные результаты свидетельствовали о количественных, качественных и временных различиях синтеза TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  под влиянием ЛПС и ЛПС-МТ. Выяснили, что динамика синтеза цитокинов соответствует ответу синергизированного TLR4 с выраженным агонистическим/антагонистическим эффектом. Пик совместного функционирования Toll-рецепторов максимален в пределах 4 часов, затем их действие уменьшается. Активация сигнальных путей TLR4 под влиянием ЛПС и ЛПС-МТ существенно отличается. Синтез IFN- $\gamma$  под влиянием ЛПС37 происходит приблизительно с одинаковой скоростью и достигает максимального значения через 20 часов. ЛПС37-МТ, напротив, индуцирует синтез IFN- $\gamma$  в максимальном количестве в течение первых 60 минут, затем экспрессия генов уменьшается, и через 20 часов синтез IFN- $\gamma$  отсутствует. Профиль цитокинового ответа MyD88-зависимого пути для ЛПС37 и ЛПС37-МТ идентичен, однако интенсивность синтеза TNF- $\alpha$  под влиянием ЛПС37-МТ в два раза больше по сравнению с исходной формой ЛПС37. Следовательно, конформационно измененная форма ЛПС37 супрессирует TRIF-путь передачи сигнала и усиливает активность фактора ядерной транскрипции провоспалительных цитокинов [5, 7].

В качестве контроля в опытах использовали препараты ЛПС *E. coli* S- и R-хемотипов, характер цитокинового ответа которых известен: для S-ЛПС типично доминирование MyD88-зависимого пути передачи сигнала над TRIF-зависимым. ЛПС R-хемотипа активирует одновременно оба пути при незначительном сдвиге в сторону MyD88-зависимого [21]. В условиях наших экспериментов количество синтезированных TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  под влиянием ЛПС37 и R-ЛПС *E. coli* одинаково, а ЛПС37-МТ, как и S-ЛПС *E. coli* индуцируют преимущественно синтез только одного класса цитокинов — TNF- $\alpha$ .

Сходство профилей цитокиновых ответов (ЛПС37 с R-ЛПС *E. coli*, а ЛПС37-МТ с S-ЛПС *E. coli*) позволило предположить, что передача сигнала TLR4 от ЛПС37 и ЛПС37-МТ идет разными путями, подобно тому, как этот процесс происходит у S- и R-форм ЛПС *E. coli* [10, 21]. В пользу высказанного предположения свидетельствуют результаты опытов по рестимуляции TLR4 моноцитов человека.

Процесс рестимуляции заключается в повторном воздействии ЛПС на известный рецептор, предварительно активированный специфическим для него лигандом. В зависимости от степени идентичности химической структуры лигандов, используемых для первичной и повторной активации Toll-рецепторов, цитокиновый ответ клетки может быть супрессирован или, напротив, усилен. В опытах по рестимуляции первичную активацию моноцитов проводили R- или S-ЛПС *E. coli*. Результаты экспериментов показали, что характер цитокинового ответа моноцитов при воздействии ЛПС37 и ЛПС37-МТ различен и существенно зависит от того, какая из форм ЛПС *E. coli* (R или S) была использована для первичной активации TLR4.

Полученные результаты четко демонстрируют два известных эффекта, наблюдаемых при рестимуляции TLR4 гомологичным или же гетерологичным ЛПС — супрессию MyD88-зависимого пути гомологичным лигандом и down-/up-регуляцию сигнальных путей под влиянием ЛПС с иной химической структурой. При этом первичный сигнал MyD88-зависимого пути, вызванный R-ЛПС *E. coli*, супрессируется ЛПС37 *Y. pestis* 231, а первичный ответ S-ЛПС *E. coli* подавляется ЛПС37-МТ *Y. pestis* 231. Примечательно то, что регуляторные действия ЛПС37 и ЛПС37-МТ противоположно направлены: ЛПС37 переключает сигнал на TRIF-путь (синтез IFN- $\gamma$ ), в то время как ЛПС37-МТ переключает сигнал на MyD88-зависимое направление (синтез TNF- $\alpha$ ) [5].

Результаты экспериментов, полученные при прямой и повторной активации моноцитов, свидетельствуют о том, что ЛПС37 исходной и конформационно измененной формы ЛПС37-МТ *Y. pestis* 231 дифференцированно активируют сигнальные пути TLR4 и имеют различный механизм их регуляции.

Модельные эксперименты по рестимуляции в условиях *in vitro* лишь отчасти воспроизводят эффект иммунологического взаимодействия многофакторной системы макроорганизма в целом. Наиболее близким аналогом процесса рестимуляции *in vivo* является феномен эндотоксинальной толерантности, который заключается в подавлении воспалительного ответа на сигнал ЛПС при повторной активации иммунных клеток эндотоксином.

В клинической практике это явление известно как иммуносупрессия, наблюдаемая на поздних стадиях сепсиса при токсикоинфекциях. В опытах на волонтерах и лабораторных животных выяснено, что воспроизведение данного феномена существенно зависит от ряда факторов: химической структуры ЛПС, используемых в работе; доз препаратов ЛПС, вводимых при первичной и повторной активации иммунных клеток; последовательности введения ЛПС и от промежутка времени между инъекциями. С целью повышения чувствительности животных к действию ЛПС повторную обработку животных обычно проводят препаратами ЛПС, соединенными с D-галактозамином, увеличивающим их токсичность в сотни раз [18].

Сведения о толерантности биопробных животных к ЛПС *Y. pestis* в литературе отсутствовали. Поэтому для воспроизведения этого феномена все вышеуказанные параметры были подобраны экспериментально. Показателем корректности подобранных условий постановки опытов являлось отсутствие гибели животных в случае, когда для первичной и повторной активации использовались препараты ЛПС одинакового химического строения (гомоторантность).

Эффект эндотоксинальной толерантности оценивали для ЛПС37, ЛПС37-МТ *Y. pestis* 231 и R- и S-форм ЛПС *E. coli*. Экспериментальная сетка включала 16 вариантов постановки опытов с учетом всех возможных сочетаний четырех препаратов ЛПС при первичной и повторной активации. Такие перекрестные сочетания позволяли судить о степени идентичности молекулярных механизмов действия исследуемых ЛПС в условиях *in vivo*.

В этих опытах выяснено, что толерантность мышей к действию ЛПС37 и комплекса ЛПС37-МТ вирулентного штамма *Y. pestis* 231 различна. При сочетании ЛПС37 *Y. pestis* с гетерологичными S- и R-формами ЛПС *E. coli* или ЛПС37-МТ *Y. pestis* воспалительный ответ организма варьирует от полной или частичной толерантности до ее отсутствия. Для комплекса ЛПС37-МТ принципиальным является исключительно последовательность введения препаратов ЛПС биопробным животным. В случае, когда первичная активация проводится ЛПС37-МТ, а повторная — ЛПС37 *Y. pestis* или S- и R- формами ЛПС *E. coli*, эффект толерантности отсутствует. Напротив, если ЛПС37-МТ используется для повторной активации на фоне всех иных форм ЛПС включая ЛПС37 *Y. pestis* 231, воспалительный ответ полностью подавлен, то есть ЛПС-МТ в условиях макроорганизма проявляет свойства универсального иммуносупрессора [1, 2].

Установленный факт согласуется с результатами экспериментов по цитокининдуцирующей активности двух форм ЛПС, а также позволяет объяснить влияние последовательности введения ЛПС на характер иммунного ответа организма. Полагаем, что в случае, когда первая обработка животных проводится комплексом ЛПС37-МТ, для которого TRIF-зависимый путь является доминантным, негативный контроль регуляции ингибирует именно эту систему передачи сигнала. При этом MyD88-зависимый путь не блокируется и при повторном воздействии ЛПС

сигнал беспрепятственно проводится MyD88-зависимой системой, активирует NF- $\kappa$ B и индуцирует синтез провоспалительных цитокинов.

Напротив, если первичная активация иммунных клеток макроорганизма вызывается препаратами ЛПС, для которых MyD88-зависимое направление является доминантным, на этапе торможения ингибируется передача сигнала этого пути. В этом случае повторная обработка животных ЛПС37-МТ *a priori* предполагает эффект толерантности, так как для реализации воспалительного ответа на действие ЛПС37-МТ необходимо переключение сигнала от TRIF- к MyD88-зависимому пути, активность которого блокирована.

Таким образом, иммуномодулирующие свойства ЛПС37-МТ, выявленные нами в опытах *in vitro*, валидны результатам, полученным в условиях *in vivo*. Опыты по толерантности подтверждают различия иммуномодулирующих свойств ЛПС37 и комплекса ЛПС37-МТ *Y. pestis* 231 в условиях макроорганизма и указывают на особый механизм контроля воспалительного ответа.

Анализ полученных нами экспериментальных данных позволил составить общую схему передачи сигнала TLR4/MD2 моноцитов человека под воздействием ЛПС37 и ЛПС37-МТ *Y. pestis* 231 (рис. 1, 2). Приведенные схемы наглядно демонстрируют принципиальные различия иммуномодулирующих свойств между исходными и конформационно измененными формами ЛПС.

Установлено, что обе формы ЛПС активируют TLR4 моноцитов человека, индуцируя одновременный синтез цитокинов двух типов — TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . Профиль цитокинового ответа соответствует совместному действию TLR4 — TLR2. При этом TLR2 играет основную регуляторную роль в проведении сигналов как по MyD88-зависимому, так и по TRIF-пути. Активация TLR4 исходной формой ЛПС характеризуется слабо выраженной активностью обеих сигнальных систем с незначительным доминированием MyD88-зависимого пути. По мере активации TLR2 увеличивается синтез TNF- $\alpha$  и наблюдается переключение сигнала от MyD88-зависимой к TRIF-проводящей системе. Затем, когда возбуждение TLR2

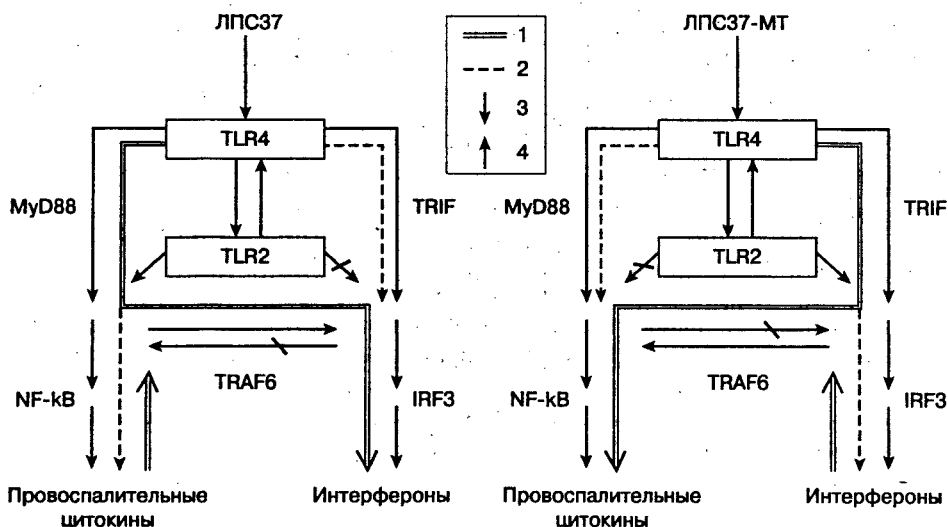


Рис. 1 (слева). Схема передачи сигнала TLR4/MD2 под воздействием ЛПС37 *Yersinia pestis* 231.

Здесь и на рис. 2: 1 — доминантный путь передачи сигнала; 2 — дополнительный путь передачи сигнала; 3 — позитивная регуляция передаваемого сигнала; 4 — негативная регуляция передаваемого сигнала.

Рис. 2 (справа). Схема передачи сигнала TLR4 / MD2 под воздействием ЛПС37-МТ *Yersinia pestis* 231.

проходит, синтез TNF- $\alpha$  снижается до первоначального уровня, в то время как синтез IFN- $\gamma$  продолжает увеличиваться под контролем TLR4. Для ЛПС-МТ характерна иная закономерность. Возбуждение TLR4 сопровождается быстрой и сильной активацией TRIF-сигнального пути на фоне незначительной активности MyD88-зависимой. Возбуждение TLR2 приводит к полной ингибции активности TRIF-пути с одновременным переключением сигнала на MyD88-зависимое направление и резким увеличением синтеза TNF- $\alpha$ . Таким образом, для обеих форм ЛПС характерна кросс-регуляция передаваемого сигнала. При этом переключение сигнала между MyD88-зависимым и TRIF-путями противоположно направлено: для исходной формы ЛПС доминантная активность MyD88-зависимого пути реализуется повышенным синтезом IFN- $\gamma$ , в то время как для ЛПС-МТ доминантность TRIF-пути приводит к увеличению синтеза TNF- $\alpha$ . Различия позитивного/негативного контроля активности TLR4 под влиянием исходной и конформационно измененной форм ЛПС подтверждены в опытах по эндотоксиновой толерантности на животных.

Обращает на себя внимание тот факт, что доминантность сигнальных путей и их кросс-регуляция под воздействием изучаемых форм ЛПС зеркально противоположны, поэтому ЛПС37 и ЛПС37-МТ инициируют синтез цитокинов различных типов — исходная форма ЛПС активирует фактор ядерной транскрипции синтеза интерферонов, а конформационно измененная форма ЛПС активирует фактор ядерной транскрипции провоспалительных цитокинов.

Различия в цитокининдуцирующей активности и путях передачи сигнала исходных и конформационно модифицированных форм ЛПС *Y. pestis* 231 соответствуют иммунному ответу организма на каждой стадии инфекционного процесса: поздний воспалительный ответ по интерфероновому типу характерен для внутриклеточного цикла развития чумы, а на стадии септического шока при массивном размножении бактерий в тканях паренхиматозных органов макроорганизма наблюдается гиперпродукция воспалительных цитокинов. Две ступени модификации ЛПС — температурозависимое изменение химической структуры ЛПС с последующим изменением конформации молекул ЛПС под воздействием факторов макро- и микроорганизмов — отражают специфику и, возможно, уникальность действия эндотоксина возбудителя чумы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Демидова Г. В., Зюзина В. П., Соколова Е. П., Пасюкова Н. И., Беспалова И. А., Бородина Т. Н., Тынянова В. И. Эндотоксиновая толерантность к липополисахаридам вакцинного и вирулентного штаммов *Yersinia pestis* в условиях *in vivo*. Проблемы ООИ. 2012, 3 (313): 61-63.
2. Зюзина В. П., Демидова Г. В., Соколова Е. П., Пасюкова Н. И., Беспалова И. А., Бородина Т. Н., Тынянова В. И. Эндотоксиновая толерантность белых мышей к действию липополисахарида и комплекса липополисахарид-«мышинный» токсин вирулентного штамма *Yersinia pestis* 231. Журн. микробиол. 2013, 5: 74-80.
3. Кравцов А. Н., Тынянова В. И., Зюзина В. П. Повышение вирулентности бактерий *Yersinia pestis* при инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека. Журн. микробиол. 1993, 4: 3-6.
4. Соколова Е. П., Марченков В. И., Демидова Г. В. и др. Комплексы «мышинного» токсина чумного микроба с модифицированными формами липополисахарида *Yersinia pestis* и с липополисахаридами других бактерий. Биотехнология. 2001, 4: 53-58.
5. Соколова Е. П., Демидова Г. В., Зюзина В. П. и др. Токсичность и цитокининдуцирующая активность ЛПС вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Журн. микробиол. 2011, 6: 20-26.
6. Соколова Е. П., Демидова Г. В., Зюзина В. П., и др. Динамика синтеза TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$



- моноцитами человека под действием липополисахаридов *Yersinia pestis* EV 76 с различной степенью токсичности. Журн. микробиол. 2010, 4: 59-64.
7. Соколова Е. П., Демидова Г. В., Зюзина В. П. и др. Исследование цитокининдуцирующей активности различных форм липополисахаридов *Yersinia pestis* EV76 моноцитами человека. Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естеств. науки. 2012, 2: 75-78.
  8. Таболин В.А., Яковлев М.Ю., Ильина А.Я. и др. Патогенетические механизмы и клинические аспекты действия термостабильного эндотоксина кишечной микрофлоры. Русский медицинский журнал. 2003, 1: 126-128.
  9. Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.В. и др. Гликолипид — биоактиватор токсических субстанций чумного микроба. Биотехнология. 1999, 2: 28-33.
  10. Huber M., Kalis C., Keck S. et al. R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. Eur. J. Immunol. 2006, 36 (3): 701-711.
  11. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H. et al. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. Infect. Immun. 2002, 70 (8): 4092-4098.
  12. Knirel Y.A., Linder B., Vinogradov E.V. et al. Temperature dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharides of *Yersinia pestis*. Biochemistry. 2005, 44: 1731-1743.
  13. Knirel Y. A., Anisimov A. P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties. Acta Nature. 2012, 4 (13): 45-58.
  14. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H. et al. Immunomodulatory properties of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. Clin. Vaccine Immunol. 2010, 17 (1): 49-55.
  15. Montminy S., Khan N., McGrath S. et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. Nature Immun. 2006, 7 (10): 1066-1073.
  16. Sato S., Nomura F., Kawai T. et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2-and TLR4-mediated signaling pathways. J. Immunol. 2000, 165: 7096-7101.
  17. Schromm A., Brandenburg K., Loppnow H. et al. The change of endotoxin molecules influences their formation and IL-6 inducing capacity. J. Immunol. 1998, 161: 5464-5471.
  18. Silverstein R. D-galactosamine lethality model scope and limitations. J. Endotoxin Res. 2004, 10 (3): 147-162.
  19. Rebeil R., Ernst K. E., Clayton O. J. et al. Characterization of late acyltransferase genes of *Yersinia pestis* and their role in temperature-dependent lipid A variation. J. Bacteriol. 2006, 188 (4): 1381-1388.
  20. Telepnev M. V., Klímpel G. R., Haithcoat J. et al. Tetraacylated lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* can inhibit multiple toll-like receptor mediated signaling pathways in human dendritic cells. J. Infect. Dis. 2009, 200: 1694-1702.
  21. Zughair S. M., Zimmer S. M., Datta A. et al. Differential induction of the Toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. Infect. Immun. 2005, 73 (5): 2940-2950.

*Поступила 20.12.15*

Контактная информация: Тынянова Виктория Ивановна, к.б.н.,  
3440002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117, р. т. (862) 240-27-03

## ВОЗМОЖНОСТЬ ПРЕДСКАЗАНИЯ ПАНДЕМИЙ ГРИППА

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

В XX и XXI вв. возникло пять пандемий гриппа. В последние годы получены данные о возможности инфицирования свиней вирусами гриппа человека и длительной циркуляции этих штаммов среди свиней с последующей инфекцией такими вирусами людей. В статье обсуждается возможность предсказания пандемий гриппа путем постоянного наблюдения и исследования вирусов гриппа, циркулирующих среди свиней.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 113—120

Ключевые слова: грипп, пандемия, свиньи

*Yu.Z.Ghendon*

## POSSIBILITY OF INFLUENZA PANDEMIC PREDICTION

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Five influenza pandemics emerged in the 20<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> centuries. Data regarding possibility of infection of swine with human influenza viruses and persistent circulation of these strains among swine with subsequent infection of humans with these viruses were obtained in the recent years. A possibility of prediction of influenza pandemics by constant observation and study of influenza viruses circulating among swine is discussed in the paper.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 113—120

Key words: influenza, pandemic, swine

Анализ заболеваемости людей гриппом выявил первую пандемию гриппа в 1729 году [23]. Следующая пандемия наблюдалась в 1781 году. В XIX веке пандемии гриппа возникали в 1830 и затем в 1889 годах. В XX веке пандемии наблюдались в 1900, 1918, 1957, 1968 и 1977 годах и в XXI веке в 2009 году. Во время пандемии 1889 года смертность от гриппа составила 6 млн человек, 1918 года — 50 млн, 1958 года — 4 млн, 1968 года — 2 млн, 1977 года — смертность была низкой и 2009 года — еще более низкой [1, 5, 9, 23]. Поскольку вирус гриппа человека был открыт только в 1933 году, выделить и охарактеризовать вирусы, вызвавшие пандемии гриппа в XIX веке и начале XX века, не представлялось возможным. Однако ретроспективный анализ антител в сыворотках крови людей, живших во время пандемии, позволил высказать предположение, что пандемию 1889 года вызвал вирус гриппа серотипа А/Н2, пандемию 1900 года — А/Н3. Пандемию 1918 года вызвал вирус А/Н1N1, 1957 г. — А/Н2N2, 1968 г. — А/Н3N2, 1977 г. — А/Н1N1 и 2009 г. — А/Н1N1 [1, 5, 9, 11, 23].

Проведенный в последние годы анализ реконструированного пандемического штамма вируса гриппа Н1N1, вызвавшего пандемию 1918 года, показал, что гемагглютинин этого штамма сходен, но не идентичен гемагглютинину ни одного из 16 циркулирующих вирусов гриппа птиц и отличается от гемагглютинина вируса гриппа птиц Н1, который циркулировал до начала пандемии 1918 года. Полученные данные свидетельствуют о том, что этот пандемический вирус возник не путем реассортации с вирусом гриппа птиц, а прошел длинный путь эволюции. Было показано также, что пандемический штамм 1918 года не является вирусом гриппа свиней [7, 29, 30].

В отношении пандемических штаммов вируса гриппа, вызвавших пандемии 1957 и 1968 годов, было высказано предположение, что они являются реассортантами

между вирусами гриппа человека и птиц. Действительно, у штамма вируса H2N2, вызвавшего пандемию 1957 года, ген, кодирующий белок PB1, имел сходство с этим же геном вируса гриппа птиц [12]. Гены, кодирующие белки PA, NP, M и NS, происходили от циркулировавшего ранее вируса гриппа человека H2N2, а происхождение генов, кодирующих гемагглютинин, нейраминидазу и белки PB1 и PB2, было не ясным [28]. Последующий анализ генов, кодирующих гемагглютинин H2N2 вируса гриппа человека, выделенного в 1957 году, и вирусов гриппа птиц H2N2 выявил лишь 22% гомологии, что свидетельствует о том, что гемагглютинин пандемического штамма H2N2 вируса гриппа не был унаследован от вируса гриппа птиц.

Антитела к вирусу H2 выявлялись в сыворотках крови людей, живших в конце XIX века, причем эти сыворотки были взяты до начала пандемии 1957 года, и эти антитела хорошо реагировали с гемагглютинином пандемического штамма H2 1957 года [16]. Было обнаружено также, что во время пандемии 1957 года пожилые люди болели гриппом значительно реже, чем более молодые, и высказано предположение, что пожилые люди контактировали с аналогичным по антигенной специфичности вирусом гриппа H2 во время пандемии 1889 года, в результате чего у них сохранился определенный иммунитет к этому вирусу.

У пандемических штаммов H3N2, вызвавших пандемию 1968 года, нейраминидаза по антигенной специфичности оказалась сходной со штаммами вируса гриппа H3N2, циркулировавшими до 1918 года [28]. При анализе пандемического штамма 1968 года оказалось, что все гены, кроме гемагглютинина, происходят от предыдущего вируса гриппа человека H2N2, а ген, кодирующий гемагглютинин этого штамма вируса, имел 92% гомологии с вирусом гриппа уток [28]. Однако изучение рецепторной области гемагглютинина пандемических штаммов вируса гриппа 1968 г. показало, что у этих штаммов в рецепторном участке аминокислоты в позициях 226 и 228 были типичны для гемагглютинина вируса гриппа человека [17].

Как и в случае с пандемическим штаммом H2N2, до начала пандемии 1968 года у людей, живших в начале XX века, были взяты сыворотки, в которых обнаруживали антитела к гемагглютину H3, сходные по специфичности с антителами в сыворотках людей, переболевших гриппом во время пандемии 1968 года [5, 16]. Эти данные позволили предположить, что такой же штамм вируса гриппа со сходной антигенной специфичностью гемагглютинина H3 циркулировал и вызвал пандемию в самом начале XX века. Не исключено, что пандемический штамм H3N2 1968 года сходен со штаммами пандемии 1900 года. К сожалению, штаммы вируса гриппа H3N2, вызвавшие пандемию в начале XX века, исчезли из циркуляции к началу пандемии 1918 года, и провести сравнение гемагглютинина этих штаммов не представляется возможным, хотя это могло бы дать четкий ответ о происхождении гемагглютинина H3 пандемического штамма вируса гриппа 1968 года.

Во время пандемии 1977 года, вызванной вирусом гриппа человека H1N1, заболеваемость была умеренной, но наблюдалась во многих странах мира. При этом в основном заболевали люди в возрасте до 20 лет. Вирус гриппа H1N1 прекратил циркуляцию в 1957 году, и это объясняет, почему люди, родившиеся после 1957 года и не имевшие контакта с вирусом H1N1, в 1977 году в основном и заболевали гриппом. У более старших возрастных групп сохранялся определенный иммунитет к вирусу H1N1 за счет контакта с этим вирусом до 1957 года. Интересно, что как по антигенной специфичности, так и по последовательности нуклеотидов в генах пандемический вирус H1N1 не отличался от вирусов H1N1, циркулировавших в 1947 — 1957 годах.

Пандемия гриппа 2009 года была вызвана вирусом гриппа H1N1, который представлял собой реассортант, содержащий гены вирусов гриппа свиней, птиц и человека [2, 8, 32, 33]. Люди были инфицированы этим вирусом от свиней, и вирус передавался от человека к человеку. По антигенной специфичности гемагглютинина пандемический штамм H1N1/Калифорния/2009 значительно отличался от вируса гриппа человека H1N1 штамм А/Брисбейн/59/2007, который циркулировал до пандемии среди людей и участвовал в сезонных эпидемиях гриппа. Антитела к штамму H1N1/Калифорния в реакции задержки гемагглютинации почти не реагировали со штаммом H1N1/Брисбейн, также как антитела к этому штамму — со штаммом H1N1/

Калифорния [8, 33]. Следует отметить, что как и в предыдущих пандемиях гриппа, во время пандемии 2009 года заболевание гриппом пожилых лиц наблюдалось значительно реже, чем молодых [8, 32, 33].

Таким образом, результаты исследований последних лет, полученные при изучении пандемий гриппа XX и XXI века, позволяют предположить, что пандемические штаммы вирусов гриппа человека не являются какими-то абсолютно новыми вирусами, которые раньше никогда не циркулировали среди людей.

Анализ антител, полученных от людей, живших за 50 — 60 лет до начала пандемии гриппа, а также сниженная заболеваемость людей старше 50 — 60 лет во время пандемий свидетельствуют о том, что эти штаммы могли циркулировать среди людей десятки лет тому назад, затем прекратили свою циркуляцию на длительное время. Но где-то они сохранялись и затем вновь появлялись и инфицировали людей, вызывая пандемию гриппа, поскольку эти «архивные» штаммы вируса гриппа принципиально отличались по антигенной характеристике гемагглютинина от штаммов вирусов гриппа, циркулировавших среди людей до начала пандемии.

В связи с этим возникает вопрос, где могли в природных условиях сохраняться эти вирусы в течение длительного времени, а потом вновь возвращаться в популяцию людей, тем более, что персистенция вирусов гриппа у людей наблюдается исключительно редко и на короткое время.

Известно, что для инфицирования вирусами гриппа необходимо соответствие рецепторов на гемагглютинине вируса и на мембране клеток инфицируемого животного или человека. При несоответствии этих рецепторов инфицирования не происходит или оно наблюдается крайне редко. Было показано, что у вирусов гриппа человека в рецепторной области гемагглютинина в наиболее важных для видовой специфичности позициях содержатся аминокислоты лейцин и серин в позициях 226 и 228 соответственно. Эта рецепторная область распознает и прикрепляется к рецептору на мембране человеческих клеток, который содержит на конце 6-сиал-(N-ацетил-лактозамин)(Neu 5Ac<sub>2</sub>-3 Gal). У вирусов животных и птиц в этих участках гемагглютинина содержатся иные аминокислоты, например, у вирусов гриппа птиц — глутамин и глицин [17, 18]. Поэтому инфицирование людей вирусами гриппа животных происходит крайне редко. Так, инфицирование людей вирусом гриппа птиц H5N1 за 10 лет, прошедших после заражения 18 человек этим вирусом в Гонконге в 1997 году, составила всего 400 человек, то есть по 40 человек в год, и при этом передача инфекции контактными лицам не наблюдалась [3]. В то же время, при сезонных эпидемиях гриппа заболевает около 10% от всего населения, то есть десятки миллионов человек [34]. В отношении вирусов гриппа лошадей описан лишь один случай заражения человека этим вирусом [3]. Случаи инфицирования людей вирусами тюленей, китов или норок не описаны, равно как и циркуляция вирусов гриппа человека среди птиц, лошадей, тюленей, китов и норок.

Однако имеется один вид животных, которые могут заражаться вирусами гриппа от человека, а также сами инфицировать этими вирусами людей. Такими животными являются свиньи, у которых на клетках эпителия трахеи имеются рецепторы для гемагглютинина не только вирусов гриппа свиней, но также вирусов гриппа птиц и вирусов гриппа человека [10].

После открытия вируса гриппа свиней в 1933 году были сделаны попытки инфицирования этих животных. Однако в первых опытах при заражении свиней вирусом человека никаких признаков инфекции обнаружено не было [21, 24]. Позже при заражении свиней вирусом гриппа человека H2N2 удалось выделить вирус из смывов носа [25]. Классические вирусы гриппа свиней циркулировали среди них с 1930 до 1990 гг. Однако в 1998 году произошла реассортация вируса гриппа свиней с вирусом гриппа человека H3N2. Этот реассортант содержал гены вирусов гриппа свиней, птиц и вируса человека H3N2 [8] и циркулировал среди свиней. Затем появились тройные реассортанты H1N1 [22]. Как было упомянуто ранее, возможность образования реассортантов вируса гриппа в организме свиньи обусловлена наличием особых рецепторов на клетках эпителия трахеи этих животных [10]. В Италии был выделен от свиней тройной реассортант, содержащий гены вирусов свиней, птиц и человека [4].

Реассортант, выделенный от свиней в 1998 году в США, содержал гены, кодирующие белки М, NS и NP вируса гриппа свиней, гены PA и PB2 от вируса гриппа птиц и гены, кодирующие гемагглютинин, нейраминидазу и белок PB1 вируса гриппа человека [8]. Пандемический реассортант H1N1/Калифорния/2009 также содержал гены вирусов гриппа свиней, птиц и человека [8].

У ряда реассортантов, выделенных от свиней, гемагглютинин оказался сходным по антигенной характеристике с гемагглютинидами вирусов гриппа человека. В Корее был обнаружен вирус гриппа свиней, гемагглютинин которого по антигенной специфичности был сходен с гемагглютинином вируса гриппа человека H1, циркулировавшего среди людей [6]. Во время эпидемии гриппа на Тайване, вызванной вирусом гриппа H3N2, среди свиней начал циркулировать вирус гриппа H3N2, гемагглютинин которого был сходен с гемагглютинином эпидемических штаммов вирусов гриппа человека H3N2 [13]. В 1993 году в Италии от свиней были выделены вирусы серотипа H1N1, а также H3N2, гемагглютинины которых были сходны по антигенной специфичности и последовательности нуклеотидов с гемагглютинидами вирусов гриппа человека H3 и H1 [4]. Вирусы гриппа свиней, выделенные в США в 90-годы, имели гемагглютинин, сходный по антигенной специфичности с гемагглютинином H3 вируса гриппа человека, хотя гемагглютинины отличались по 12 аминокислотам [14]. В Канаде в 1997 году от поросенка был выделен вирус гриппа H3N2, крайне сходный с H3 гемагглютинином вируса гриппа человека [22]. В 1992 году на севере Японии были выделены от свиней два штамма вируса гриппа H1N1, у которых ген, кодирующий гемагглютинин, был близок аналогичному гену вирусов гриппа H1N1, циркулировавших среди людей между 1990 и 1992 годами [15]. В 1993 году в Италии был выделен от свиной реассортант вируса гриппа, содержащий гены вирусов гриппа свиней, птиц и человека, при этом гены вируса гриппа человека, кодирующие гликопротеины, были сходны с генами вируса гриппа H3N2 [4]. Исследования, проведенные в Китае, показали, что штаммы вируса гриппа человека H3N2, выделенные от свиней, антигенно и генетически сходны с вирусами гриппа человека, которые циркулировали среди людей до появления этих вирусов у свиней. Филогенетический анализ показал, что этот вирус гриппа человека внедрился в Азии в популяции свиней между 1976 и 1982 годами. Штаммы вируса гриппа свиней H1N1 с гемагглютинином, сходным с гемагглютинином H1 вируса гриппа человека, были выявлены в Европе в 2002 году [19]. Весьма важно, что от свиней удавалось выделять вирусы гриппа человека, сходные по антигенной специфичности с вирусами, циркулировавшими среди людей много лет назад и уже исчезнувшими из циркуляции среди людей. Так, изучение гемагглютинина и нейраминидазы у штаммов вирусов гриппа свиней, выделенных от свиней в 2003 году в Китае, выявило сходство гемагглютинина этого вируса с гемагглютинином вируса гриппа человека штамм А/Москва/99, который циркулировал среди людей четыре года назад [22]. В Литве от заболевших людей выделили штамм вируса гриппа, сходный по антигенной характеристике со штаммом вируса гриппа человека WS H1N1, который был выделен 20 лет назад.

Что касается инфицирования людей вирусами гриппа свиней, то начиная с 1970 года, единичные случаи заражения людей вирусами гриппа свиней описывались неоднократно. За последние 35 лет в мире было зарегистрировано 50 случаев инфицирования людей вирусами гриппа свиней, при этом передача инфекции контактным лицам наблюдалась крайне редко [26]. Следует отметить однако что у людей, часто контактирующих со свиньями, инфицирование вирусами гриппа наблюдалось довольно часто. В США в 1970 году при анализе сывороток крови людей, часто контактирующих со свиньями, антитела к недавно выделенным от свиной штаммам вируса гриппа обнаруживали у 45% людей, работающих на скотобойнях, и достаточно часто у ветеринаров, однако клинических проявлений инфекции не наблюдалось [27]. Наиболее серьезный случай инфицирования людей вирусом гриппа свиней произошел в США в 1976 году, когда 5 солдат заразились от свиней вирусом гриппа H1N1, а у 230 человек была выявлена бессимптомная инфекция [31]. Однако учитывая, что на мембране клеток человека рецепторы к гемагглютину классического вируса

гриппа свиней отсутствуют, можно полагать, что инфицирование людей классическими штаммами вируса гриппа свиней не может вызывать типичное заболевание гриппом, а может вызывать лишь появление антител и иногда бессимптомную инфекцию. Можно полагать, что возникновение инфекции с симптомами гриппа у людей, инфицированных вирусами от свиней, было вызвано не классическими вирусами свиней, а циркулирующими в популяции свиней вирусами гриппа человека или реассортантами, содержащими гены вируса гриппа человека, особенно ген, кодирующий гемагглютинин.

Таким образом, представленные выше данные многочисленных исследований показывают, что пандемии гриппа могут вызывать как вирусы гриппа человека, так и реассортанты, содержащие гены вируса гриппа человека. Однако пандемические штаммы не являются абсолютно новыми вирусами с совершенно новой антигенной характеристикой гемагглютинина, никогда не циркулировавшими среди людей. Анализ антител у людей, живших за 50 — 60 лет до начала пандемии, а также сниженная заболеваемость людей пожилого возраста при пандемиях в сравнении с заболеваемостью более молодых, свидетельствуют о том, что потенциальные пандемические штаммы вируса гриппа могли циркулировать среди людей несколько десятков лет назад, а затем прекратить циркуляцию среди людской популяции, но где-то сохраняться в течение длительного времени, после чего эти вирусы возвращались вновь и инфицировали людей, вызывая пандемию, поскольку антигенная характеристика этих «архивных» вирусов существенно отличалась от антигенной характеристики вирусов гриппа, циркулирующих среди людей перед пандемией.

Однако возникает весьма серьезный вопрос — где в природных условиях могли сохраняться в течение десятков лет эти потенциально пандемические штаммы вируса гриппа? Тем более, что персистенция вирусов гриппа у людей встречается крайне редко и на очень короткое время. Учитывая данные о важности соответствия рецепторов на гемагглютинине вируса гриппа и на мембране клеток человека, что необходимо для инфицирования, можно считать, что заражение людей вирусами гриппа птиц, свиней, лошадей, тюленей, китов и норок может наблюдаться крайне редко, инфекция может быть бессимптомной и не передаваться контактным лицам. Кроме того, вирусы гриппа человека не способны циркулировать ни у одного вида животных и не могут вызвать у людей не только пандемию, но даже эпидемию, за одним исключением. Это исключение — свиньи. В отличие от других животных, на мембране клеток трахеи свиньи имеются рецепторы не только для гемагглютинина вируса гриппа свиней, но также вирусов гриппа птиц и человека. Имеется много исследований, убедительно показывающих возможность инфицирования свиней вирусом гриппа человека и последующей циркуляции этого вируса среди свиней как в виде вируса гриппа в целом, так и реассортанта, образовавшегося в организме свиньи и содержащего гены вируса гриппа человека. Имеются также данные о возможности длительной циркуляции вируса гриппа человека (реассортанта), давно исчезнувшего из популяции людей, среди свиней. Многочисленные данные, приведенные выше, свидетельствуют о том, что свиньи способны играть важную роль в возникновении пандемий гриппа у людей в качестве животных, среди которых могут длительно циркулировать «архивные» штаммы вируса гриппа с антигенной характеристикой гемагглютинина, существенно отличавшейся от антигенной характеристики гемагглютинина вируса гриппа, циркулирующих среди людей в предпандемический период. Такая возможность подтверждается пандемией гриппа, вызванной инфицированием людей штаммом (реассортантом) H1N1/ Калифорния/2009, который образовался в организме свиньи и обладал антигенной специфичностью, существенно отличавшейся от специфичности штаммов вируса гриппа, циркулировавших среди людей в это время.

Еще более 35 лет назад было высказано предположение, что вирусы гриппа человека, циркулирующие среди свиней в течение длительного времени, могут оказаться потенциальными пандемическими штаммами [10, 15, 20]. Однако в то время это было всего лишь предположение. За последующие 40 лет накопилось много достоверных

данных о том, что свиньи действительно могут быть носителями потенциальных пандемических штаммов вируса гриппа и инфицировать этими вирусами людей. Бесспорным подтверждением такой возможности явилась пандемия гриппа 2009 года, когда люди были инфицированы от свиней реассортантным штаммом вируса гриппа, содержащим несколько генов вируса гриппа человека [2].

Если бы удалось своевременно выявить циркуляцию среди свиней вируса гриппа человека или реассортанта, принципиально отличающегося по антигенной характеристике от штаммов вируса гриппа людей, циркулировавших в это же время, то такой потенциальный пандемический штамм можно было бы включить в качестве четвертого компонента гриппозной вакцины для профилактики сезонных эпидемий гриппа и защитить людей от повышенной заболеваемости и смертности при возникновении пандемии.

Естественно, что повышение заболеваемости и смертности при пандемиях зависит не только от несовпадения антигенной характеристики гемагглютинина пандемических и обычных штаммов вируса гриппа. А.А.Сморозинцев и Е.Килбурн считают, что новая антигенная характеристика штамма вируса гриппа должна быть дополнена определенными мутациями в геноме вируса, повышающими его вирулентность. Однако поскольку оценку вирулентности можно сделать лишь после возникновения эпидемии или пандемии, выявление циркуляции среди свиней потенциальных пандемических штаммов вируса гриппа, существенно отличающихся по антигенной характеристике от циркулирующих в данное время вирусов гриппа человека, может дать возможность своевременно подготовиться к пандемии гриппа до ее возникновения.

Для профилактики заболевания гриппом во время сезонных эпидемий гриппа оптимальным препаратом является гриппозная вакцина. Однако в связи с высокой изменчивостью вируса гриппа почти каждый год появляются новые антигенные варианты штаммов вируса гриппа, к которым у людей нет иммунитета, в связи с чем, почти каждый год необходимо заменять некоторые вакцинные штаммы на новые и своевременно включать эти штаммы в вакцину для следующего эпидсезона. Рекомендации в отношении новых вакцинных штаммов вируса гриппа сообщает ВОЗ на основании анализа тысяч изолятов вируса от больных гриппом, которые присылают более 100 лабораторий по гриппу в 90 странах в один из четырех Центральных лабораторий ВОЗ по гриппу для тщательного изучения антигенной характеристики изолятов с целью выявления нового антигенного варианта, который после обсуждения полученных результатов экспертами ВОЗ рекомендуется в качестве нового вакцинного штамма для гриппозной вакцины на следующую сезонную эпидемию гриппа. Такая программа ВОЗ наблюдения за гриппом существует более 50 лет и очень помогает в борьбе с сезонными эпидемиями гриппа. Однако, к большому сожалению, пока не существует какой-либо международной организации, которая могла бы осуществлять сходную программу по изучению штаммов вирусов гриппа, выделенных от свиней, с целью обнаружения потенциальных пандемических штаммов вируса. В настоящее время лаборатории, в которых изучают штаммы вируса гриппа, выделенные от свиней, имеются лишь в нескольких странах — США, Италии, Германии, Англии, Австралии и России. Однако постоянного обмена штаммами вирусов, выделенных от свиней, или полученными результатами не существует, равно как и координации исследований в рамках программы какой-либо международной организации типа ВОЗ. Создание такой программы с привлечением Китая, где чаще всего возникают пандемические штаммы вируса гриппа, а также Японии и стран Южной Америки могло бы очень помочь в выявлении потенциальных пандемических штаммов вируса гриппа и своевременной подготовке к борьбе с пандемией. Было бы оптимально, чтобы сбор изолятов вирусов гриппа от свиней и анализ этих изолятов входил бы в существующую программу ВОЗ по наблюдению и борьбе с гриппом. Тем более, что квалифицированный персонал Центральных лабораторий по гриппу ВОЗ мог бы не только определять антигенную характеристику этих изолятов, но также специфику их рецепторов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гендон Ю.З. Пандемия гриппа: предположения и факты. Журн. микробиол. 2008, 5: 109-118.
2. Гендон Ю.З. Свиной грипп H1N1/Калифорния — страсти и факты. Журн. микробиол. 2010, 4: 105-114.
3. Гендон Ю.З. Эпизоотии гриппа птиц и борьба с ними. Журн. микробиол. 2006, 5: 17-28.
4. Castrucci M., Donatelli I., Sidoil L. et al. Reassortment between avian and human influenza A virus in Italian pigs. *Virology*. 1993, 193: 503-506.
5. Davenport F., Minuse E., Henessy A. et al. Interpretations influenza patterns of man. *Bull. WHO*. 1969, 41: 453-460.
6. Francis T., Shope R. Neutralization test with sera of immunized animals and the virus of swine and humans in influenza. *J. Exp. Med.* 1936, 63: 645-653.
7. Fanning T., Slemons R., Reid A. et al. 1917 avian influenza virus sequences suggest that 1918 pandemic virus not acquire its hemagglutinin directory from birds. *J. Virol.* 2002, 76: 7860-7862.
8. Garten R., Davus C., Russel C. et al. Antigenic avian and genetic characteristics of swine-origin 2009 (H1N1) influenza virus circulating in humans. *Science*. 2009, 325: 197-201.
9. Hilleman M. Realities and enigmas of human virus influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*. 2002, 20: 3068-3087.
10. Ito T., Couclio J., Kelm S. et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A virus with pandemic potential. *J. Virol.* 1998, 72: 7367-7373.
11. Kulbourne E. Influenza pandemics of the 20<sup>th</sup> century. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12: 9-14.
12. Kawaoka Y., Krauss S., Webster R. Avian to human transmission of the PB1 gene of influenza virus in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol.* 1989, 63: 4608.
13. Kundin W., Hong Kong A-2 influenza among swine during a human epidemic in Taiwan. *Nature*. 1970, 228: 85.
14. Karasin A., Suttan M., Cooptr L. et al. Genetic characterization of H3N2 influenza virus isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotype. *Virus Res.* 2000, 68: 71-85.
15. Katsuda R., Sato S., Shirahata T. et al. Antigenic and genetic characteristics of H1N1 human influenza virus isolated from pigs in Japan. *J. Gen. Virol.* 1995, 76: 1247-1249.
16. Masurel N., Marine W. Recycling of Asian and Hong Kong influenza A virus hemagglutinin in man. *Am. J. Epidemiol.* 1973, 97: 44-49.
17. Matrocovich M., Gambaryan A., Teneberg S. et al. Avian influenza virus differ from human virus by recognition of sialioligosaccharides and gangliosides and by higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology*. 1997, 233: 224-234.
18. Matrosovich M., Matrosovich T., Gray T. et al. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2004, 101: 4620-4624.
19. Marosini S., Gregory V., Cameron K. et al. Antigenic and genetic diversity among swine influenza A/H1N1 in Europe. *J. Gen. Virol.* 2002, 83: 735-745.
20. Nakajima K., Desselberger U., Palese P. Recent human influenza A viruses closely related genetically to strain isolated in 1950. *Nature*. 274: 334-339.
21. Patoka F., Shreiber E., Kubelka V. et al. An attempt to transmit the human influenza virus strain A/Singapore/57 to swine. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immun.* 1958, 2: 9-12.
22. Pan C., Wang G., Liao M. et al. High genetic and antigenic similarity between a swine H3N2 influenza A virus and a prior human influenza vaccine virus: A possible immune pressure-drive cross-species transmission. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 2009, 385: 402-407.
23. Potter C. Chronicle of influenza pandemics. *In: Textbook of influenza*. K. Nicholson, R. Webster, A. Hay (ed.). Blackwell Sci. 1998, p. 3-18.
24. Shoper R., Francis T. The susceptibility of swine to the virus of human influenza. *J. Exp. Med.* 1936, 64: 791-801.
25. Styk B., Subo A., Blaskovic D. Experimental infection of pigs with Hong Kong influenza viruses. *Acta Virol.* 1971, 15: 221-224.
26. Shinde V., Bridges C., Uyeki T. et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *New Engl. J. Med.* 2009, 360: 2616-2625.
27. Schnurrenberger F., Woods G., Martin R. Serologic evidence of human infection with swine influenza virus. *Am. Rev. Respir.* 1970, 102: 356-360.
28. Scholtissek C., Rhode W., Hoyningen V. et al. On the origin of the human influenza virus subtype H2N2 and H3N2. *Virology*. 1978, 87: 13-20.
29. Taubenberger J., Reid A., Lowrens R. et al. Characterisation of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*. 2005, 437: 889-893.



30. Taubenberger J. The origin and virulence of the 1918 «Spanish» influenza virus. Proc. Am. Phil. Soc. 2006, 150: 86-112.
31. Top F., Russell P. Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey. Summary and speculation. J. Infect. Dis. 1977, 136: 379-380.
32. WHO. Pandemic (H1N1)2009 -update 58: <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html>.
33. WHO. New influenza A(H1N1) virus : global epidemiological situation. Weekly Epidemiol. Rec. 2009, 84: 249-257.
34. WHO. Influenza vaccines. WHO position paper. Weekly Epidemiol. Rec. 2005, 80: 306-308.

*Поступила 11.09.15*

Контактная информация: Гендон Юрий Захарович, д.м.н., проф.,  
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*А.Ю.Попова<sup>1</sup>, А.В.Топорков<sup>2</sup>, А.В.Липницкий<sup>2</sup>, Н.В.Половец<sup>2</sup>, Д.В.Викторов<sup>2</sup>*

## **РАСПРОСТРАНЕНИЕ В МИРЕ ОСОБО ОПАСНЫХ МИКОЗОВ**

<sup>1</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва; <sup>2</sup>Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

В обзоре представлены современные сведения о распространении в мире особо опасных микозов — кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза, бластомикоза и паракокцидиоидомикоза. Рассмотрены источники и пути инфицирования возбудителями этих заболеваний, кратко охарактеризованы клинические формы микозов. Отмечено возрастание заболеваемости ими в последнее десятилетие. Подчеркивается необходимость своевременной диагностики импортированных микозов вне эндемических регионов.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 120—126

Ключевые слова: грибы, кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, бластомикоз, паракокцидиоидомикоз, эндемические регионы, заболеваемость

*A. Yu. Popova<sup>1</sup>, A. V. Toporkov<sup>2</sup>, A. V. Lipnitsky<sup>2</sup>, N. V. Polovets<sup>2</sup>, D. V. Viktorov<sup>2</sup>*

## **SPREAD OF ESPECIALLY DANGEROUS MYCOSES IN THE WORLD**

<sup>1</sup>Federal Service for Surveillance on Consumer Rights' Protection and Human Well-being, Moscow; <sup>2</sup>Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

Contemporary information on the spread in the world of especially dangerous mycoses — coccidioidomycosis, histoplasmosis, blastomycosis and paracoccidioidomycosis are presented in the review. Sources and infection routes of causative agents of these diseases are examined, clinical forms of mycoses are briefly characterized. An increase of morbidity due to them over the last decade is noted. A necessity of timely diagnostics of imported mycoses outside endemic regions is underscored.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P.120—126

Key words: fungi, coccidioidomycosis, histoplasmosis, blastomycosis, paracoccidioidomycosis, endemic regions, morbidity

Особо опасные микозы (кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, бластомикоз, паракокцидиоидомикоз) относятся к эндемическим системным инфекционным заболеваниям. Их возбудители — грибы II группы патогенности (опасности) обитают в почвенных очагах

определенных регионов мира. Они принадлежат к группе диморфных грибов, находящихся во внешней среде в сапробной (мицелиальной) форме, а в организме человека и животных — в паразитической (тканевой или дрожжеподобной) форме. В связи с тем, что инфицирование ими происходит преимущественно аэрогенно с последующим поражением верхних и нижних дыхательных путей, они носят также название «респираторных» микозов. В отличие от возбудителей оппортунистических глубоких микозов (кандидоза, аспергиллеза, мукороза, криптококкоза, споротрихоза, феогифомикоза), они являются первичными патогенами, т.е. поражают иммунокомпетентных людей с ненарушенной иммунной системой [1, 10, 34, 49]. Ежегодное количество больных особо опасными микозами в мире составляет более полумиллиона человек и имеет тенденцию к повышению. В немалой степени этому способствует миграция населения, возрастание числа деловых и туристических поездок в эндемичные регионы. Увеличилось количество больных, выявляемых вне эндемичных зон после посещения их жителями той или иной страны [14, 45, 48].

Учитывая высокую степень инфекционной чувствительности человека к возбудителям особо опасных микозов, даже кратковременное пребывание в эндемичном регионе может привести к заражению. При этом приблизительно лишь у трети инфицированных возникает клинически выраженное заболевание, которое протекает обычно в виде кратковременной острой респираторной инфекции. Однако факторы, способствующие снижению естественной иммунной защиты, могут привести к манифестации болезни спустя месяцы или даже годы [26].

Реальная возможность диагностики импортированных эндемических микозов представляется при возникновении групповых заболеваний, объединенных единым местом и временем заражения. Гораздо сложнее диагностировать спорадические случаи, поскольку данные об источнике инфекции и времени инфицирования могут быть неизвестны.

Из особо опасных микозов в мире наиболее распространен гистоплазмоз. Его возбудители — *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* и *H. capsulatum* var. *duboisii* [34]. Инфицирование первым из них чаще всего происходит в центральных штатах и на среднем западе США, в Центральной и Южной Америке, Австралии. Недавно выявлены автотонные случаи заболевания в Китае [44, 47, 49]. Заболевания, вызванные *H. capsulatum* var. *duboisii*, зарегистрированы в 20 странах Африки и на острове Мадагаскар, причем 50% инфицированных — жители Нигерии, 25% — Нигера, Сенегала и Конго. В Южно-Африканской Республике встречается только var. *capsulatum*, в странах Западной, Восточной и Центральной Африки обнаруживаются оба варианта возбудителя. Однако обычно это спорадические заболевания, при которых источник инфекции часто остается невыявленным. Достоверные случаи гистоплазмоза и других особо опасных микозов, подтвержденные выделением культур, в России и на территории стран СНГ не зарегистрированы. Вспышки гистоплазмоза вне Америки не описаны. Поэтому очень трудно представить карту мирового распространения этого микоза.

Известно, что *H. capsulatum* обитает в почвах, обогащенных экскрементами летучих мышей или птиц. Группы риска включают профессии, связанные с разрушением почвы, контаминированной грибами, что приводит к аэрозолированию элементов мицелиальной фазы [49]. Тяжесть заболевания в определенной степени зависит от величины инфицирующей дозы. Гистоплазмоз, как правило, протекает с симптомами острого респираторного заболевания (ОРЗ), сопровождаясь высокой температурой, головной болью, кашлем, болями в груди. Симптомы обычно возникают через 1 — 3 недели после заражения, и у большинства инфицированных болезнь разрешается спонтанно в течение трех недель [34]. Диссеминированная форма редка и чаще описывается у иммунокомпрометированных индивидуумов [35]. Гистоплазмоз признается наиболее важной грибковой инфекцией ВИЧ-инфицированных, проживающих в эндемичных регионах [26, 38].

Гистоплазмоз считают болезнью спелеологов. Свыше 60% спелеологов США положительно реагировали на внутрикожное введение аллергена (гистоплазмина) [48]. Вспышки гистоплазмоза неоднократно возникали после пребывания в пещерах Центральной и Южной Америки, населенных летучими мышами [29, 31, 33]. Так, недавно описана вспышка гистоплазмоза среди туристов из Европы после посещения ими пещер в Эль-Сальвадоре и Гватемале. Из 19 обследованных у 16 выявлено длительно протекающее респираторное заболевание, подтвержденное как гистоплазмоз [21]. В настоящее время очевидно, что инфицирование возбудителем гистоплазмоза может происходить и при других условиях. Так, в мае 2001 г. группа студентов из штата Джорджия (США) путешествовала по

Никарагуа. В течение трех дней после возвращения домой у 12 человек развились клинические симптомы острого гистоплазмоза, позднее подтвержденного серологически. Госпитализированы 6 человек. Инфицирование этой группы произошло при посещении рудника по добыче серебра, содержащего гуано летучих мышей [48]. Крупная вспышка болезни была зарегистрирована в 2004 г. среди студентов из США через 1 — 2 недели после возвращения их из Акапулько (Мексика), где они проводили каникулы. Более чем у 250 человек появились симптомы острого гистоплазмоза, 25 — были госпитализированы. Большинство заболевших во время пребывания в Мексике проживали в гостинице, в которой проводились ремонтные работы, сопровождающиеся повреждением почвы. Впоследствии в пробах этой почвы был обнаружен возбудитель гистоплазмоза [Taylor M.L. et al., 2005].

Диагноз гистоплазмоза вне эндемических регионов обычно устанавливают путем обнаружения гуморальных антител в реакциях иммунодиффузии в агаровом геле (РИД), связывания комплемента (РСК) или специфического антигена в моче [23, 34]. Применяемая ранее внутрикожная аллергическая проба для определения ГЗТ в настоящее время не используется в связи с прекращением производства аллергена. В последние годы для идентификации гриба успешно применяют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) [2, 15, 34].

Этиологическими агентами кокцидиоидомикоза в соответствии с недавними результатами молекулярно-генетических исследований являются грибы двух видов рода *Coccidioides* — *C. immitis* и *C. posadasii* [3, 8]. Хотя их экологические почвенные ниши географически достаточно четко разделены, однако патогенез и клиника вызываемого ими заболевания не различаются. Эндемичные районы обитания *C. immitis* — почвы некоторых полупустынных регионов Юго-Запада США (преимущественно, Аризона и Калифорния), *C. posadasii* — Центральной и Южной Америки [8]. Заболевания людей обусловлены инфицированием грибами при строительстве, сельскохозяйственных работах, археологических раскопках и пр. [1]. Естественные природные явления, такие как землетрясения, ураганы, увеличивают риск инфицирования и приводят к крупным вспышкам заболевания [48]. Серьезную опасность представляет возможность внутрилабораторного заражения при манипуляциях с возбудителями кокцидиоидомикоза. Возбудители кокцидиоидомикоза оцениваются в США как потенциальные агенты биотерроризма [Warnock D.W., 2007].

Через 1—3 недели после инфицирования *Coccidioides* spp. у 40% появляются такие симптомы как лихорадка, головная и мышечные боли, сыпь, сухой кашель, потеря веса, слабость. В редких случаях развивается тяжелое легочное заболевание, сопровождающееся пневмонией с образованием каверн. Менее чем в 1% случаев происходит диссеминация процесса в центральную нервную систему, суставы, кости и кожу. К группам риска диссеминации относят индивидуумов с иммунодефицитом, этнические группы афроамериканцев и филиппинцев, беременных женщин, больных сахарным диабетом [1]. Инфицированные *Coccidioides* spp. приобретают иммунитет к реинфекции независимо от клинической картины заболевания [10].

В недавние годы отмечено повышение заболеваемости кокцидиоидомикозом в Калифорнии и Аризоне, что может быть объяснено иммиграцией американцев в эти штаты [19, 20]. Увеличился поток туристов из США в Мексику. Среди возвратившихся из поездок отмечены несколько вспышек болезни [48]. Так, описана вспышка микоза в группе церковнослужителей из Пенсильвании после пребывания в Гермозилльо (Мексика), где они участвовали в строительстве церкви. Через 2 недели после возвращения у многих появились гриппоподобные симптомы, а у восьми диагноз кокцидиоидомикоза был подтвержден в серологических реакциях [17].

Посещение эндемических очагов кокцидиоидомикоза жителями ряда стран Европы [22, 48], Японии [45], Австралии [7] также приводило к развитию заболевания. Несколько случаев микоза отмечено у граждан Индии, ранее работавших в штате Аризона.

Вспышка болезни в нескольких странах была зарегистрирована после возвращения домой участников чемпионата мира по авиамодельному спорту, который проходил в октябре 2001 г. в высокоэндемичном районе Калифорнии. Заболевания отмечены среди участников чемпионата из Великобритании, Финляндии, Австралии и Новой Зеландии [18]. Не во всех случаях был установлен точный первоначальный диагноз микоза. Так, в Великобритании для этого понадобился длительный срок, связанный с выделением и идентификацией культуры гриба из бронхоальвеолярного секрета.

Обычно диагностика острого легочного кокцидиоидомикоза проводится путем прямого микроскопического исследования образцов из нижнего отдела респираторного тракта с целью выявления тканевой фазы (сферул) и культивированием гриба. Однако вне эндемичных регионов диагноз, как правило, основывается на результатах серологических тестов (РИД, РСК, ИФА) по выявлению антител у заболевших [4, 13, 27] не ранее, чем через 2 — 4 недели после развития симптомов болезни. В реакциях непрямой или латекс-агглютинации результаты могут быть получены несколько раньше, но они менее специфичны [37]. Молекулярно-генетические методы идентификации *Coccidioides* spp. пока не получили широкого распространения, однако их перспективность несомненна [3]; [Vucicevic D. et. al., 2010].

Профилактика заражения кокцидиоидомикозом в эндемичных очагах затруднительна. Тем не менее, при нахождении в них следует максимально ограничить контакты с почвенной пылью. Некоторую защиту могут обеспечить маски, предохраняющие органы дыхания, и контроль систем кондиционирования воздуха [48].

Бластомикоз эндемичен на Юге и Среднем Западе США, в Центральной и Южной Америке, а также в некоторых частях Африки [11]. Возбудителем бластомикоза до настоящего времени считали единственный вид *Blastomyces dermatitidis*, однако в 2013 году на основании полученных молекулярно-генетических данных было предложено разделить возбудителя заболевания на две самостоятельные таксономические единицы. Помимо *B. dermatitidis* новым видом стал *B. gilchristii* [12, 15]. Излюбленные места обитания *B. dermatitidis* — сильно увлажненная почва по берегам рек и затопленных равнин. Гриб хорошо выживает в закисленной почве с высоким содержанием азота и органических остатков. Как результат крупные вспышки этого микоза отмечаются преимущественно вблизи рек Миссисипи и Огайо, района Больших озер в США и Канаде, а также в небольшой зоне, граничащей с рекой Святого Лоуренса [49]. Из-за столь широкого распространения в этом регионе прежнее название микоза — северо-американский бластомикоз. Ареал распространения *B. gilchristii* ограничен районами северо-запада Онтарио, Висконсина и Миннесоты [15]. Возможно, наличие естественных резервуаров каждого вида обусловлено их географическим разделением, связанным со специфическим микроэкологическими факторами.

Заражение бластомикозом происходит, как правило, респираторным путем. Иногда болезнь возникает после травматической кожной инокуляции. Разрушение почвы, особенно в лесистых местах, способствует попаданию гриба в воздух, а затем в дыхательные пути человека, где мицелиальная фаза трансформируется в дрожжевую. Гриб вызывает широкий спектр клинических проявлений — от бессимптомной легочной инфекции у иммунокомпетентных людей до распространенной диссеминированной инфекции у иммунокомпрометированных индивидуумов. При поражении респираторного тракта отмечаются гриппоподобные симптомы с кашлем и болями в груди [11]. В течение многих лет полагали, что бластомикоз — кожное заболевание, а поражение легких — результат системной инвазии. Однако в настоящее время известно, что кожа является наиболее частым местом диссеминации гриба из легких. Реже поражается костная система, урогенитальный тракт, центральная нервная система [30, 36].

К группам риска можно отнести людей, близко контактирующих с почвой (фермеры, строители, охотники, рыболовы). Болеют люди обоего пола, но чаще мужчины молодого и среднего возраста [49].

В эндемичных очагах бластомикоз часто наблюдается у собак, значительно реже у кошек [13]. Он также диагностирован у диких представителей семейства кошачьих — пантер и леопардов. Хотя передача бластомикоза от человека и животных человеку наблюдается крайне редко, однако зафиксированы случаи заражения при вскрытии трупов человека и собаки после укуса больной собаки.

Бластомикоз редко регистрируется вне эндемичных регионов, возможно, в связи с трудностью постановки диагноза [39] и достаточно длительным инкубационным периодом болезни (30 — 45 дней). Тем не менее, такие случаи описаны в Индии, Мексике, Италии.

Паракокцидиоидомикоз, единственным возбудителем которого до недавнего времени считали *Paracoccidioides brasiliensis*, эндемичен в субтропических регионах Центральной и Южной Америки. Использование генетических методов показало, что генетическая вариабельность, оцениваемая ранее как внутривидовая, на самом деле отражает существование четырех независимых видов, имеющих общего предка: трех — внутри комплекса *P.*

brasiliensis — S1, PS2, PS3 [40, 41] и нового — *P. lutzii* [16], первоначально обозначенных как Pb01-like. Наиболее благоприятные условия для роста гриба с продукцией инфекционных элементов мицелиальной фазы (конидий) создаются в песчаных и глинистых почвах с большим содержанием воды, характерных для нор животных [5, 6]. Однако конкретные экологические ниши пребывания гриба во внешней среде не определены [24]. Редкие находки гриба в почве связывают с тем, что оптимальные условия, способствующие размножению гриба, могут быть достаточно кратковременны.

В последнее десятилетие значительное внимание исследователей привлекает естественная заболеваемость в эндемичных очагах микоза нескольких видов броненосцев. Нахождение паразитической (тканевой) фазы гриба в их тканях, наряду с множественными поражениями внутренних органов, включая легкие, подчеркивает их роль в эпидемическом процессе. Появилось сообщение, что болезнь встречается и у диких обезьян, живущих в эндемичном очаге [25]. В то же время, сероэпидемиологическое исследование в одном из эндемичных районов Бразилии показало, что хотя значительное количество (80,5%) собак, живущих в сельской местности, имеют антитела к грибу, однако они, по-видимому, резистентны к заболеванию [28].

Инкубационный период болезни у человека может длиться много лет [14]. Наиболее распространенное проявление микоза — хроническая прогрессирующая форма болезни взрослых с диссеминацией. Клинические проявления — лихорадка, потеря аппетита, поражение легких, слизистых оболочек и кожи. Паракокцидиоидомикоз — наиболее важный системный микоз в странах Латинской Америки. Показано, что эпидемиологическая и клиническая характеристика микоза у ВИЧ-инфицированных отличается от такового у заболевших иммунокомпетентных людей более молодого возраста с быстрым прогрессированием болезни [46]. До недавнего времени вспышки заболевания не были описаны [46], лишь в 2010 г. [9] появилось сообщение, в котором автор, проведя ретроспективный анализ заболеваемости, связанной с последствиями климатической аномалии Эль-Ниньо 1982 — 1983 гг., оценил ее как вспышку паракокцидиоидомикоза.

Микоз редко диагностируют вне эндемичных регионов, однако в последние годы, благодаря внедрению молекулярно-генетических методов идентификации возбудителя, такие случаи стали описывать чаще. Они зафиксированы в Японии, Великобритании, Австрии, Испании, Голландии [32, 42, 43, 50]. В Голландии [Van Damme P.A. et al., 2006] реактивация инфекции произошла через 8 лет после возвращения из эндемичного очага, по-видимому, вследствие применения иммунодепрессантов.

Таким образом, представленные материалы свидетельствуют о повышении в последние годы заболеваемости особо опасными микозами в эндемических регионах мира. Расширение международных связей, в частности туризма, определяет возможности инфицирования жителей России в очагах микозов, а также нахождения на территории нашей страны заболевших жителей других стран. Это следует особенно учитывать при проведении массовых спортивных, культурных и иных мероприятий. В связи с изложенным, актуальным является повышение информированности об этих заболеваниях как выезжающих за рубеж, так и врачей широкого профиля. Повышение уровня диагностики особо опасных микозов в нашей стране также является актуальной задачей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Особо опасные микозы. Под ред. В.В. Малеева. Волгоград: Волга-Паблицер, 2013.
2. Вьючнова Н.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Савченко С.С., Антонов В.А., Липницкий А.В. Конструирование олигонуклеотидных праймеров для выявления ДНК возбудителя гистоплазмоза. Проблемы медицинской микологии. 2012, 14 (2): 58-63.
3. Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Антонов В.А. и др. Идентификация возбудителей кокцидиоидомикоза методом полимеразной цепной реакции. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 2007, 4: 25-31.
4. Ampel N.M. The diagnosis of coccidioidomycosis. Med. Rep. 2010, 18: 2-13.
5. Bagagli E., Bosco S.M., Theodoro R.C., Franco M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. Infect. Genet. Evol. 2006, 6 (5): 344-351.
6. Bagagli E., Theodoro R.C., Bosco S.M., McEwen J.G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. Mycopathologia. 2008, 165 (4-5): 197-207.
7. Baird R.W., Teichtahl H., Ednie H.M. et al. A fluffy white traveller: imported *Coccidioides immitis* infection in an Australian tourist. Pathology. 1999, 31 (1): 47-50.

8. Barker B.M., Jewell K.A., Kroken S., Orbach M.J. The population biology of coccidioides: epidemiologic implications for disease outbreaks. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007, 1111: 147-163.
9. Barrozo L.V., Benard G., Silva M.E. et al. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2010, 4 (3): e643.
10. Borchers A.T., Gershwin M.E. The immune response in Coccidioidomycosis. *Autoimmun Rev.* 2010, 10 (2): 94-102.
11. Bradsher R.W., Jr. Pulmonary blastomycosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2008, 29 (2): 174-181.
12. Brown E.M., McTaggart L.R., Zhang S.X. et al. Phylogenetic analysis reveals a cryptic species *Blastomyces gilchristii*, sp. nov. within the human pathogenic fungus *Blastomyces dermatitidis*. *PLoS ONE.* 2013, 8 (3): 1-14.
13. Brömel C., Sykes J.E. Epidemiology, diagnosis, and treatment of blastomycosis in dogs and cats. *Clin. Tech. Small. Anim. Pract.* 2005, 20 (4): 233-239.
14. Buitrago M.J., Bernal-Martínez L., Castelli M.V. et al. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. *Travel. Med.* 2011, 18 (1): 26-33.
15. Buitrago M.J., Canteros C.E. et al. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. *Rev. Iberoam. Micol.* 2013, 30 (4): 256-260.
16. Carrero L.L., Niño-Vega G., Teixeira M.M. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet. Biol.* 2008, 45 (5): 605-612.
17. CDC. Coccidioidomycosis in travelers returning from Mexico—Pennsylvania, 2000. *MMWR.* 2000, 49 (44): 1004-1006.
18. CDC. Coccidioidomycosis among persons attending the world championship of model airplane flying—Kern County, California, October 2001. *MMWR.* 2001, 50 (49): 1106-1107.
19. CDC. Increase in coccidioidomycosis — California, 2000-2007. *MMWR.* 2009, 58 (5): 105-109.
20. CDC. Increase in coccidioidomycosis — Arizona, 1998-2001. *MMWR.* 2003, 52 (6): 109-112.
21. CDC. Outbreak of histoplasmosis among travelers returning from El Salvador—Pennsylvania and Virginia, 2008. *MMWR.* 2008, 57 (50): 1349-1353.
22. Chandesris M.O., Hot A., Dannaoui E. et al. Coccidioidomycosis: an imported invasive fungal disease in France. *Med. Mal. Infect.* 2008, 38 (6): 336-342.
23. Connolly P.A., Durkin M.M., Lemonte A.M. et al. Detection of histoplasma antigen by a quantitative enzyme immunoassay. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2007, 14 (12): 1587-1591.
24. Conti Dias I.A. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. *Rev. Inst. Med. Trop. San. Paulo.* 2007, 49 (2): 131-134.
25. Corte A.C., Svoboda W.K., Navarro I.T. et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. *Mycopathologia.* 2007, 164 (5): 225-228.
26. Couppié P., Aznar C., Carne B., Nacher M. American histoplasmosis in developing countries with a special focus on patients with HIV: diagnosis, treatment, and prognosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2006, 19 (5): 443-449.
27. Durkin M., Connolly P., Kuberski T. et al. Diagnosis of coccidioidomycosis with use of the *Coccidioides* antigen enzyme immunoassay. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 47 (8): e69-73.
28. Fontana F.F., dos Santos C.T., Esteves F.M. et al. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia.* 2010, 169 (3): 159-165.
29. García-Vázquez E., Velasco M., Gascón J. et al. *Histoplasma capsulatum* infection in a group of travelers to Guatemala. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 2005, 23 (5): 274-276.
30. Gascón J., Torres J.M., Jiménez M. et al. Histoplasmosis infection in Spanish travelers to Latin America. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2005, 24 (12): 839-841.
31. Hoenigl M., Schwetz I., Wurm R. et al. Pulmonary histoplasmosis in three Austrian travelers after a journey to Mexico. *Infection.* 2008, 36 (3): 282-284.
32. Igarashi T., Kurose T., Itabashi K. et al. A case of chronic pulmonary paracoccidioidomycosis. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.* 2004, 42 (7): 629-633.
33. Jülg B., Elias J., Zahn A. et al. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. *J. Travel. Med.* 2008, 15 (2): 133-136.
34. Kauffman C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007, 20 (1): 115-132.
35. Kauffman C.A. Diagnosis of histoplasmosis in immunosuppressed patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008, 21 (4): 421-425.
36. Kralt D., Light B., Cheang M. et al. Clinical characteristics and outcomes in patients with pulmonary blastomycosis. *Mycopath.* 2009, 167 (3): 115-124.
37. Kuberski T., Herrig J., Pappagianis D. False-positive IgM serology in coccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48 (6): 2047-2049.

38. Loulergue P., Bastides F., Baudouin V. et al. Literature review and case histories of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* infections in HIV-infected patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2007, 13 (11): 1647-1652.
39. Mason A.R., Cortes G.Y., Cook J. et al. Cutaneous blastomycosis: a diagnostic challenge. *Int. J. Dermatol.* 2008, 47 (8): 824-830.
40. Matute D.R., Mc Ewen J.G., Montes B. A. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* 2006, 23: 65-73.
41. Matute D.R., Sepulveda E.V., Quesada L.M. et al. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44: 2153-2157.
42. Mayayo E., López-Aracil V., Fernández-Torres B. et al. Report of an imported cutaneous disseminated case of paracoccidioidomycosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 2007, 24 (1): 44-46.
43. Mayr A., Kirchmair M., Rainer J. et al. Chronic paracoccidioidomycosis in a female patient in Austria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2004, 23 (12): 916-919.
44. McLeod D.S., Mortimer R.H., Perry-Keene D.A. et al. Histoplasmosis in Australia: report of 16 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2011, 90 (1): 61-68.
45. Miyaji M., Kamei K. Imported mycoses: an update. *J. Infect. Chemother.* 2003, 9 (2): 107-113.
46. Morejón K.M., Machado A.A., Martínez R. Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009, 80 (3): 359-366.
47. Pan B., Chen M., Pan W., Liao W. Histoplasmosis: a new endemic fungal infection in China? Review and analysis of cases. *Mycoses.* 2013, 56 (3): 212-221.
48. Panackal A.A., Hajjeh R.A., Cetron M.S., Warnock D.W. Fungal infections among returning travelers. *Clin. Infect. Dis.* 2002, 35 (9): 1088-1095.
49. Pfaller M.A., Diekema D.J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit. Rev. Microbiol.* 2010, 36 (1): 1-53.
50. Ramírez-Olivencia G., Ramírez-Rubio O., González P.R. et al. Paracoccidioidomycosis in a Spanish missionary. *J. Travel. Med.* 2010, 17 (2): 139-140.

*Поступила 15.09.15*

Контактная информация: Липницкий Анатолий Васильевич, д.м.н., проф.,  
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)37-37-74

### **ПАМЯТИ ИРИНЫ СЕРГЕЕВНЫ МЕЩЕРЯКОВОЙ**

6 апреля 2016 года на 79 году ушла из жизни одна из старейших сотрудниц Федерального НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, доктор биологических наук, руководитель лаборатории туляремии Мещерякова Ирина Сергеевна.

И.С.Мещерякова была одним из ведущих специалистов по туляремийной инфекции. Под ее руководством и непосредственном участии разрабатывались проблемы профилактики и диагностики туляремии, изучались экология и механизмы циркуляции возбудителя туляремии в естественных и антропогенно-трансформируемых экосистемах. В отечественных и зарубежных журналах И.С.Мещеряковой опубликовано около 200 научных работ.

Ирина Сергеевна вела большую научно-организационную работу. Она возглавляла Центр Минздравсоцразвития РФ по туляремии, являлась членом Ученого совета института, проблемной комиссии «Природно-очаговые инфекции», специализированной комиссии ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Большинство методических материалов по туляремии, диагностических препаратов, широко используемых специалистами в научных и практических учреждениях, были подготовлены или получены непосредственно с ее участием.

За большую научную и общественную работу, активную помощь практическому здравоохранению И.С.Мещерякова была награждена медалями: «Ветеран труда», «В память 850-летия Москвы»; знаками «Отличнику здравоохранения» и «70 лет эпидслужбы РФ».

Светлая память об Ирине Сергеевне Мещеряковой навсегда останется в памяти всех знавших этого замечательного человека.

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

## ORIGINAL ARTICLES

- Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Андрущенко С.В.* Межмикробное распознавание «свой-чужой» в паре «доминант-ассоциант» пробиотических штаммов *Escherichia coli* M-17 и *Escherichia coli* ЛЭГМ-18 .... 3
- Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Востров А.В.* Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* катионами меди и цинка, примененными в физиологических концентрациях ..... 9
- Бурацева Н.П., Антюганов С.Н., Семенко О.В., Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Куличенко А.Н., Мезенцев В.М.* Эпизоотолого-эпидемиологическое районирование территории Северо-Кавказского федерального округа по степени неблагополучия по сибирской язве с использованием программы Arc GIS10 ..... 19
- Мочалкин П.А., Мочалкин А.П., Степанов Е.Г., Фарвазова Л.А., Попов Н.В.* Эпидемиологическая дифференциация природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом Республики Башкортостан ..... 24
- Курбонов К.М., Саторов С.С., Симонова Е.Г., Филатов Н.Н.* Современные эпизоотолого-эпидемиологические особенности бруцеллеза в Республике Таджикистан ..... 31
- Караваяев В.С., Олейникова Е.С., Азаев М.Ш., Беклемисhev А.Б.* Иммунохимический анализ рекомбинантного химерного полипептида  $\text{OspC}_{\text{gar+afz}}$  изолятов *Borrelia garinii* и *B. afzelii* ... 37
- Печельюк А.А., Тараканова Ю.Н., Дмитриев А.Д., Массино Ю.С., Сегал О.Л., Лавров В.Ф., Дмитриев Д.А.* Анализ эффективности использования IgY кур в сэндвич-методе тестирования HBsAg ..... 44
- Сорокина Е.В., Ахматова Н.К., Сходова С.А., Чалая Е.Л., Масыюкова С.А.* Эффективность применения комбинированной терапии ранней эритемной стадии болезни Лайма с учетом особенностей иммуногенеза ..... 51
- Чучалин А.Г., Онищенко Г.Г., Колосов В.П., Курганова О.П., Тезиков Н.Л., Мананов Л.Г., Перельман Ю.М.* Клинико-эпидемиологическая оценка эффективности вакцинации детей против пневмококковой инфекции в Амурской области ..... 57
- Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Исаева О.В.* Случай завоза вируса гепатита E 4 генотипа в Россию ..... 64
- Панферова Ю.А., Фрейлихман О.А., Токаревич Н.К., Карпенко С.Ф., Галимзянов Х.М.* Сравнение диагностической эффективности методов детекции *Coxiella burnetii* в крови больных лихорадкой Ку на основе амплификации фрагментов гена 16S рРНК (стандартная ПЦР) и гена groEL (ПЦР в режиме реального времени) ..... 70
- Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Дубянский В.М., Рязанова А.Г., Прислегина Д.А., Шапошникова Л.И., Манин Е.А., Юничева Ю.В., Василенко Л.Е., Агаптов Д.С., Bukharin, O.V., Perunova, N.B., Ivanova, E.V., Andryuschenko, S.V.* Intermicrobial «self-nonself» discrimination in «dominant-associant» pair of probiotic strains of *Escherichia coli* M-17 and *E. coli* LEGM-18
- Cheknev, S.B., Vostrova, E.I., Sarycheva, M.A., Vostrov, A.V.* Inhibition of growth of bacteria in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* cultures by copper and zinc cations, applied at physiological concentrations
- Buravtseva, N.P., Antyuganov, S.N., Semenko, O.V., Ryazanova, A.G., Eremenko, E.I., Kulichenko, A.N., Mezentsev, V.M.* Epizootological and epidemiological zoning of the territory of North Caucasus Federal Region by a degree of non-welfare by anthrax using Arc GIS10 program
- Mochalkin, P.A., Mochalkin, A.P., Stepanov, E.G., Farvazova, L.A., Popov, N.V.* Epidemiological differentiation of natural foci of hemorrhagic fever with renal syndrome of the Republic of Bashkortostan
- Kurbonov, K.M., Satorov, S.S., Simonova, E.G., Filatov, N.N.* Contemporary epizootological and epidemiological features of brucellosis in the Republic of Tajikistan
- Karavaev, V.S., Oleinikova, E.S., Azaev, M.Sh., Beklemishev, A.B.* Immunochemical analysis of recombinant chimeric polypeptide  $\text{OspC}_{\text{gar+afz}}$  of *Borrelia garinii* and *B. afzelii* isolates
- Pechelyulko, A.A., Tarakanova, Yu.N., Dmitriev, A.D., Massino, Yu.S., Segal, O.L., Lavrov, V.F., Dmitriev, D.A.* Analysis of effectiveness of using IgY from chicken in sandwich method of HBsAg testing
- Sorokina, E.V., Akhmatova, N.K., Skhodova, S.A., Chalaya, E.L., Masyukova, S.A.* Effectiveness of application of combined therapy of early erythema stage of Lyme disease taking into consideration immunogenesis features
- Chuchalin, A.G., Onischenko, G.G., Kolosov, V.P., Kurganova, O.P., Tezikov, N.L., Manakov, L.G., Perelman, Yu.M.* Clinical and epidemiological assessment of the effectiveness of vaccination of children against pneumococcal infection in the Amur region
- Mikhailov, M.I., Malinnikova, E.Yu., Kyuregyan, K.K., Isaeva, O.V.* A case of import of genotype 4 hepatitis E virus into Russia
- Panferova, Yu.A., Freilikhman, O.A., Tokarevich, N.K., Karpenko, S.F., Galimzyanov, Kh.M.* Comparison of diagnostic effectiveness of methods of detection of *Coxiella burnetii* in blood of patients with Q fever based on amplification of 16S rRNA gene fragments (standard PCR) and groEL gene (real-time PCR)
- Popova, A.Yu., Kulichenko, A.N., Maletskaya, O.V., Dubyansky, V.M., Ryazanova, A.G., Prislegina, D.A., Shaposhnikova, L.I., Manin, E.A., Yunicheva, Yu.V., Vasilenko, L.E., Agapov, D.S.,*





## ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

Редколлегия принимает на рассмотрение статьи по вопросам медицинской микробиологии и биотехнологии, эпидемиологии, вакцинологии, экологии микроорганизмов, иммунотерапии и иммунодиагностики инфекционных болезней человека, а также работы, освещающие закономерности иммунного ответа на возбудители, секретируемые ими продукты и их антигены.

При направлении статей в ЖМЭИ авторам следует соблюдать следующие правила:

1. Статья должна иметь направление от учреждения. Присылать по почте (п. 13) 2 экз. статьи через 2 интервала на компьютере с лазерным принтером шрифтом не меньше 12 — 14 кегля. Не будут приниматься «слепые» распечатки бумажного варианта статей. К бумажному варианту должен быть приложен лазерный компакт-диск в жесткой упаковке только с текстом статьи, литературой, табл., резюме, подрис. подписями, если есть рис. (рис. на отдельном диске). Размер статей не должен превышать у оригинальных 10—12 стр., обзоров 15 стр., кратких сообщений 8 стр., остальных 3—5 стр.

2. В выходных данных указывать инициалы и фамилии авторов (иностранных в иностранной транскрипции), название работы, учреждение, город. Статья должна быть подписана всеми авторами с указанием только для одного из авторов (для контактной информации) полных имени и отчества, места работы, учебного звания, ученой степени, служебного адреса (с индексом города) и служебного телефона; сотового телефона и e-mail (если есть) в конце статьи в набранном виде. Необходимы цифровые ссылки у фамилий авторов и у институтов, где они работают.

3. Оригинальная статья должна состоять из разделов: Введение, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение. К оригинальным статьям, обзорам и кратким сообщениям должно прилагаться резюме на русском и английском языках с указанием авторов, названия статьи, институтов (на отдельной странице, не более 1500 знаков каждое) и ключевые слова на русском и английском языках. Резюме должно иметь разделы: Цель, Материалы и методы, Результаты, Заключение. В резюме к обзорам разделы не нужны.

4. Количество рис. и таблиц в сумме не должно превышать 3. Принимаются только графики, схемы, микрофото, филогенетические деревья. Микрофото должны быть контрастными, 6x9 или 5x8, в 2 экз. В подписи указать окуляр, объектив и метод окраски или импрегнации. Графики и схемы должны быть четкими, не перегружены подписями. Иллюстрации принимаются только в черно-белом варианте. Размер филогенетического дерева не более 1/2 печатной страницы. Кроме бумажного варианта иллюстраций необходим файл иллюстративных программ (TIFF и др.) на отдельном диске. Таблицы не должны дублировать графики, иметь краткое название, быть компактными, с «шапками», точно отражающими содержание граф. Цифры в таблицах должны быть статистически обработаны и соответствовать таковым в тексте. Не принимаются табл. размером более 1 печатной стр. Перечисляемые праймеры не должны превышать 1/4 печатной стр.

5. Родовые и видовые названия микроорганизмов, инфраподвидовые категории, наименования семейств должны соответствовать принятым Международным таксономическим комитетом (9 изд. «Руководство по систематике бактерий Берги»). Первый раз название бактерий пишется полностью (*Shigella flexneri*), далее род одной прописной буквой, вид полностью со строчной (*S. flexneri*). Наименования семейств пишутся полностью.

6. В математических формулах размечать строчные и прописные, подстрочные и надстрочные буквы. Сокращения (за исключением общепринятых химических и математических величин) не допускаются. Использовать только единицы СИ.

7. Литература (в оригинальных статьях не более 15, проблемных и обзорах не более 50, кратких сообщениях не более 10) печатается на отдельном листе колонкой в алфавитном порядке (русские авторы, потом иностранные). В тексте дается ссылка на порядковый номер списка. В списке приводятся все отечественные авторы, иностранные — 3 автора et al., название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для книг, патентов и авторефератов диссертаций давать точное название. Ссылки на тезисы конференций, симпозиумов, пленумов, съездов и на неопубликованные работы не допускаются. Фамилии иностранных авторов в тексте статьи даются в иностранной транскрипции.

8. Направление в ЖМЭИ работ, посланных в другие редакции, не допускается. Статьи, оформленные не по правилам, редколлегией не рассматриваются и авторам не возвращаются; посылается лишь сообщение редакции о неправильном оформлении.

9. Только при оформлении статей по вышеперечисленным правилам они рецензируются членами редколлегии и/или специалистами профильных научных учреждений. Статьи с положительными рецензиями принимаются в печать. Отклоненные по рецензии рукописи, непрофильные статьи и рекомендованные для доработки авторам не возвращаются, посылается только решение редколлегии и рецензия. Поступившие после переработки рукописи вновь рассматриваются на заседании редколлегии и при выполнении автором рекомендаций рецензента принимаются в печать. Датой поступления статьи считается дата ее принятия в печать.

10. Редакция оставляет за собой право редактировать статьи, сокращать или исправлять их, а также помещать в виде кратких сообщений: 8 стр. текста с резюме (п. 3) и литературой (п. 7) без рисунков и таблиц.

11. Плата с аспирантов за публикацию статей не взимается.

12. При выполнении экспериментальных работ авторы обязаны придерживаться «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». В статье необходимо указать вид, количество использованных животных, методы обезбоживания и умерщвления.

13. Статьи и запросы о прохождении статей направлять по адресу: 121059, Москва, ООО «С-инфо», а/я 88, редакция ЖМЭИ. За статьи, посланные иным путем, редакция ответственности не несет.