

ISSN 0372.9311

ЖУРНАЛ

МИКРОБИОЛОГИИ  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ  
И  
ИММУНОБИОЛОГИИ

Издательский  
дом



С-ИНФО

4 2016

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY  
EPIDEMIOLOGY  
AND  
IMMUNOBIOLOGY



4 602607 000085



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.*

4

июль—август

МОСКВА 2016

«С-ИНФО»

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

И.Н.Чайникова<sup>1,2</sup>, Ю.В.Филиппова<sup>2</sup>, Б.А.Фролов<sup>2</sup>, Н.Б.Перунова<sup>1</sup>, Е.В.Иванова<sup>1</sup>,  
Т.А.Бондаренко<sup>1</sup>, Т.В.Панфилова<sup>2</sup>, А.Д.Железнова<sup>2</sup>, Ю.А.Сарычева<sup>2</sup>, О.В.Бухарин<sup>1</sup>

### ВЛИЯНИЕ МИЛИАЦИНА НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ

<sup>1</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; <sup>2</sup>Оренбургский государственный медицинский университет

**Цель.** Сравнительная оценка влияния милиацина на биопленкообразование (БПО) бактерий. **Материалы и методы.** Объект исследования — клинические изоляты *Salmonella enteritidis* (28), *Salmonella typhimurium* (24), *Klebsiella pneumoniae* (8), *Pseudomonas aeruginosa* (8) и эталонные штаммы лактобацилл (5) и бифидобактерий (3). Милиацин получен из кристаллов просяного масла. Антибактериальную активность милиацина определяли методом серийных разведений. Для исследования биопленок использован милиацин в концентрации 100 и 50 мкг/мл. Милиацин растворяли в Твин-21. БПО изучали методом O'Toole G.A., Kolter R. (1998) с использованием спектрофотометра Elx 808 (BioTek, США). Морфометрию биопленки выполняли с помощью атомно-силовой микроскопии с использованием сканирующего зондового микроскопа SMM-2000. **Результаты.** Милиацин и его растворитель не влияли на рост бактерий. Наибольшая чувствительность биопленок к милиацину выявлена у *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, наименьшая — у *S. enteritidis*. Милиацин не влиял на БПО штаммов лактобацилл и бифидобактерий. **Заключение.** Милиацин наряду с иммуотропной активностью, выявленной ранее, ингибирует биопленки условно патогенных и патогенных бактерий, не влияя на БПО представителей нормофлоры.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 3—9

Ключевые слова: тритерпеноиды, милиацин, биопленкообразование бактерий

I.N.Chainikova<sup>1,2</sup>, Yu.V.Filippova<sup>2</sup>, B.A.Frolov<sup>2</sup>, N.B.Perunova<sup>1</sup>, E.V.Ivanova<sup>1</sup>,  
T.A.Bondarenko<sup>1</sup>, T.V.Panfilova<sup>2</sup>, A.D.Zheleznova<sup>2</sup>, Yu.A.Sarycheva<sup>2</sup>, O.V.Bukharin<sup>1</sup>

### MILIACINE INFLUENCE ON THE BIOFILM FORMATION OF BACTERIA

<sup>1</sup>Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; <sup>2</sup>Orenburg State Medical University, Russia

**Aim.** The comparative estimation of miliacin influence on the biofilm formation of bacteria. **Materials and methods.** The objects of investigation were the clinical isolates of *Salmonella enteritidis* (28), *Salmonella typhimurium* (24), *Klebsiella pneumoniae* (8), *Pseudomonas aeruginosa* (8) and reference strains of lactobacilli (5) and bifidobacteria (3). Miliacin was obtained from crystals of millet oil. Antibacterial activity of miliacin was detected by the method of serial dilutions. For investigation of biofilms miliacin in 100 and 50 mkg/ml concentrations was used. Miliacin was diluted in Twin-21. Biofilm formation was studied by method of O'Toole G.A., Kolter R. (1998) using spectrophotometer Elx 808 (BioTek, USA). The morphometry of biofilms was conducted by atomic force microscopy with the use of scanning probe microscope SMM-2000. **Results.** Miliacin and its solvent did not influence the growth of bacteria. Maximum sensivity of biofilms to miliacin was detected in *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, minimal — in *S. enteritidis*. Miliacin did not influence the biofilm formation in strains of lactobacilli and bifidobacteria. **Conclusion.** Miliacin in addition to immunotropic activity, detected earlier, can inhibit the biofilms of opportunistic and pathogenic bacteria without influence on the biofilm formation of representatives of usual flora.

## 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.Иваничева

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору  
в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.  
Свидетельство ПИ № ФС77-36745

Цена за полугодие:

Индексы 71436 и 16729 — 1 111 р. 44 к.

Индекс 1634 (адресная подписка через Сбербанк РФ) — 1 170 р.

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

<http://www.jmicrobiol.com>

---

Подписано в печать 20.07.16. Выход в свет 09.08.16. Формат 70x108 1/16  
Печать офсетная. Тираж 1000. Заказ 25-2016

---

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)



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

И.Н.Чайникова<sup>1,2</sup>, Ю.В.Филиппова<sup>2</sup>, Б.А.Фролов<sup>2</sup>, Н.Б.Перунова<sup>1</sup>, Е.В.Иванова<sup>1</sup>,  
Т.А.Бондаренко<sup>1</sup>, Т.В.Панфилова<sup>2</sup>, А.Д.Железнова<sup>2</sup>, Ю.А.Сарычева<sup>2</sup>, О.В.Бухарин<sup>1</sup>

### ВЛИЯНИЕ МИЛИАЦИНА НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ

<sup>1</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; <sup>2</sup>Оренбургский государственный медицинский университет

**Цель.** Сравнительная оценка влияния милиацина на биопленкообразование (БПО) бактерий. **Материалы и методы.** Объект исследования — клинические изоляты *Salmonella enteritidis* (28), *Salmonella typhimurium* (24), *Klebsiella pneumoniae* (8), *Pseudomonas aeruginosa* (8) и эталонные штаммы лактобацилл (5) и бифидобактерий (3). Милиацин получен из кристаллов просяного масла. Антибактериальную активность милиацина определяли методом серийных разведений. Для исследования биопленок использован милиацин в концентрации 100 и 50 мкг/мл. Милиацин растворяли в Твин-21. БПО изучали методом O'Toole G.A., Kolter R. (1998) с использованием спектрофотометра Elx 808 (BioTek, США). Морфометрию биопленки выполняли с помощью атомно-силовой микроскопии с использованием сканирующего зондового микроскопа SMM-2000. **Результаты.** Милиацин и его растворитель не влияли на рост бактерий. Наибольшая чувствительность биопленок к милиацину выявлена у *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, наименьшая — у *S. enteritidis*. Милиацин не влиял на БПО штаммов лактобацилл и бифидобактерий. **Заключение.** Милиацин наряду с иммуотропной активностью, выявленной ранее, ингибирует биопленки условно патогенных и патогенных бактерий, не влияя на БПО представителей нормофлоры.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 3—9

Ключевые слова: тритерпеноиды, милиацин, биопленкообразование бактерий

I.N.Chainikova<sup>1,2</sup>, Yu.V.Filippova<sup>2</sup>, B.A.Frolov<sup>2</sup>, N.B.Perunova<sup>1</sup>, E.V.Ivanova<sup>1</sup>,  
T.A.Bondarenko<sup>1</sup>, T.V.Panfilova<sup>2</sup>, A.D.Zheleznova<sup>2</sup>, Yu.A.Sarycheva<sup>2</sup>, O.V.Bukharin<sup>1</sup>

### MILIACINE INFLUENCE ON THE BIOFILM FORMATION OF BACTERIA

<sup>1</sup>Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; <sup>2</sup>Orenburg State Medical University, Russia

**Aim.** The comparative estimation of miliacine influence on the biofilm formation of bacteria. **Materials and methods.** The objects of investigation were the clinical isolates of *Salmonella enteritidis* (28), *Salmonella typhimurium* (24), *Klebsiella pneumoniae* (8), *Pseudomonas aeruginosa* (8) and reference strains of lactobacilli (5) and bifidobacteria (3). Miliacin was obtained from crystals of millet oil. Antibacterial activity of miliacin was detected by the method of serial dilutions. For investigation of biofilms miliacin in 100 and 50 mkg/ml concentrations was used. Miliacin was diluted in Twin-21. Biofilm formation was studied by method of O'Toole G.A., Kolter R. (1998) using spectrophotometer Elx 808 (BioTek, USA). The morphometry of biofilms was conducted by atomic force microscopy with the use of scanning probe microscope SMM-2000. **Results.** Miliacin and its solvent did not influence the growth of bacteria. Maximum sensivity of biofilms to miliacin was detected in *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, minimal — in *S. enteritidis*. Miliacin did not influence the biofilm formation in strains of lactobacilli and bifidobacteria. **Conclusion.** Miliacin in addition to immunotropic activity, detected earlier, can inhibit the biofilms of opportunistic and pathogenic bacteria without influence on the biofilm formation of representatives of usual flora.

Key words: triterpenoids, miliacin, biofilm formation of bacteria

## ВВЕДЕНИЕ

Формирование микробных биопленок является одним из важных механизмов колонизации микроорганизмами биотопов и хронизации инфекционного процесса [6]. В связи с этим, разработка подходов к борьбе с биопленками представляет актуальную проблему микробиологии и инфектологии. При всем разнообразии такие подходы требуют соблюдения как минимум двух условий: комплексности воздействия на микрофлору и безвредности для организма [4]. Данным условиям в значительной степени соответствуют вещества растительного происхождения, которые отличает низкая токсичность и возможность комбинированного влияния на процесс биопленкообразования микроорганизмов, включая подвижность бактерий [12], их QS системы [13], адгезивные свойства клеток, изменяя экспрессию генов [15] и др. Среди растительных продуктов с широким спектром биологических свойств, включая антимикробную активность, важное место отводится тритерпеноидам [7, 8]. К числу последних относится милиацин — пентациклический тритерпеноид, который обладает иммунотропной активностью и редукцией патологической эндотоксинемии и обеспечивает протективный эффект при экспериментальной сальмонеллезной инфекции [10]. Вместе с тем, вопрос о возможном участии милиацина в антимикробной защите посредством его влияния на способность к биопленкообразованию микроорганизмов не исследовался.

Целью работы являлась сравнительная оценка влияния милиацина на биопленкообразование различных видов микроорганизмов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были использованы клинические штаммы патогенных бактерий: *Salmonella* серовар *enteritidis* (28 культур), *Salmonella* серовар *typhimurium* (24 штамма), изолированные от больных гастроинтестинальной формой сальмонеллеза. Кроме того, были использованы клинические штаммы условно патогенных бактерий: *Klebsiella pneumoniae* (8 культур) и *Pseudomonas aeruginosa* (8 изолятов), выделенные от пациентов с дисбиозом кишечника II — III степени. В работе также были использованы эталонные культуры микроорганизмов, представителей нормальной микрофлоры человека: *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (№ 900 811 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов НЦЭСМП), *Lactobacillus fermentum* 90T-C4 (№ 900 812 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов НЦЭСМП), *Lactobacillus acidophilus* K3Ш<sub>24</sub> (№ 42 в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского), *Lactobacillus acidophilus* NK<sub>1</sub> (ГНИИ генетика), *Lactobacillus acidophilus* 100аш (ГНИИ генетика), *Bifidobacterium bifidum* № 791 (№ AC-1247 в коллекции промышленных микроорганизмов ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов), *Bifidobacterium adolescentis* MC-42 (ГИСК им. Л.А. Тарасевича), *Bifidobacterium bifidum* 1 (№ 900 791 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов НЦЭСМП).

Милиацин (3-β-метокси-Δ<sup>18</sup>олеанен) получен из кристаллов просяного масла и очищен перекристаллизацией из хлороформа [5].

Антимикробную активность милиацина оценивали по способности инги-

бировать рост бактерий. С этой целью определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) методом серийных разведений (МУК 4.2.1890-04) в 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах, заполненных суспензией (100 мкл) бульонных культур микроорганизмов ( $1 \times 10^6$  КОЕ/мл) с добавлением 100 мкл милиацина (опыт), 100 мкл растворителя для милиацина: Твин-21 на физрастворе (контроль) или 100 мкл физраствора (пробы сравнения). Конечные концентрации милиацина составляли от 400 мкг/мл до 0,049 мкг/мл; растворителя от  $1,6 \times 10^{-8}$  до  $0,2 \times 10^{-12}$  моль. Диапазон концентраций тритерпеноида определялся с учетом его расчетного содержания в крови животных (50 мкг/мл) при использовании в дозе 2 мг/кг, оказывавшей протективный эффект при экспериментальной инфекции [10]. Учет результатов проводили после 24 — 48-часовой инкубации культур ( $37^\circ\text{C}$ ), определяя МПК милиацина с применением спектрофотометра Elx 808 (Bio Tek, США) при длине волны 450 нм.

Образование биопленок изучали на поверхности аналогичных планшетов по методике [14]. В лунки планшетов одновременно вносили по 135 мкл бульонной культуры бактерий ( $0,5 \times 10^6$  КОЕ/мл) и 15 мкл милиацина (опытные пробы). Конечные концентрации милиацина составляли 50 и 100 мкг/мл. В контрольные пробы вместо милиацина добавляли 15 мкл растворителя ( $2 \times 10^{-9}$  и  $4 \times 10^{-9}$  моль). В качестве проб сравнения использовали бактериальные культуры (135 мкл), к которым добавляли 15 мкл физраствора. Все пробы инкубировались 24 — 48 часов при  $37^\circ\text{C}$ . Для культивирования облигатно-анаэробных (бифидобактерии) и микроаэрофильных (лактобациллы) бактерий использовали  $\text{CO}_2$ -инкубатор (Binder, Германия). Сформированные биопленки окрашивали внесением в лунки 0,1% водного раствора кристаллического фиолетового (45 мин при комнатной температуре). Отмывание свободного красителя выполняли трехкратной обработкой лунок дистиллированной водой, а экстракцию фиксированного в биопленках красителя проводили добавлением к пробам 200 мкл 96% этанола.

Выраженность биопленкообразования микроорганизмами оценивали по уровню экстракции (абсорбции) красителя этанолом, который измеряли на микропланшетном ридере ELx 808 (Bio Tek, США) при длине волны 630 нм. Биопленкообразование выражали в условных единицах, рассчитывая коэффициент биопленкообразования (КБПО):  $\text{КБПО} = \text{ОДк} / \text{ОДб}$ , где ОДк — оптическая плотность опытных, контрольных и проб групп сравнения, а ОДб — оптическая плотность питательного бульона.

Наряду со спектрофотометрическим способом определения биопленок в отношении ряда культур применялся метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). Подготовка образцов биопленки выполнялась на поверхности скола слюды с использованием суточных бульонных культур микроорганизмов в присутствии милиацина (50 мкг/мл), растворителя ( $2 \times 10^{-9}$  моль) или без их добавления с последующей инкубацией в течении 24 — 48 часов при  $37^\circ\text{C}$ . Полученные образцы биопленок исследовали методом АСМ в контактном режиме с помощью сканирующего зондового микроскопа SMM-2000 (ЗАО «Протон Миэт», Россия) и с использованием кантилеверов MSCT-AUNM (Park Scientific Instruments, США) с жесткостью балки 0,05 Н/м и радиусом порядка 10 нм. Проводилась визуализация биопленок на поверхности скола слюды, и определялись их морфометрические параметры (длина клеток, толщина клеток, высота биопленки).

Статистическую обработку данных осуществляли методами вариационной статистики из пакета прикладных программ Microsoft Excel и Statistica 10 c



оценкой различий между средними величинами по t-критерию Стьюдента. Уровень статистической значимости различий показателей, выраженных медианой (Me), нижним (Q25) и верхним (Q75) квартилями, определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении антибактериальных свойств милиацина установлено, что тритерпеноид и растворитель в используемых концентрациях не ингибировали рост исследуемых микроорганизмов. Вместе с тем, при изучении влияния милиацина на БПО у исследуемых культур бактерий была установлена различная чувствительность к тритерпеноиду как по частоте встречаемости, так и по степени выраженности данного свойства. Для штаммов *Salmonella typhimurium* подавление биопленочного процесса при концентрации милиацина 50 мкг/мл отмечалось в 83,3±7,6% случаев. При увеличении дозы фитостерола до 100 мкг/мл биопленкообразование ингибировалось у 100% исследуемых штаммов сальмонелл. Меньшая частота выявления ингибирующего влияния милиацина на БПО обнаруживалась в отношении *S. enteritidis*, для которых эффект подавления при дозах 100 и 50 мкг/мл регистрировался соответственно среди 50,0±17,7 и 64,3±9,1% культур. Штаммы *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* демонстрировали 100% чувствительность к действию милиацина в обеих концентрациях. В противоположность этому устойчивость к тритерпеноиду проявляли все исследуемые культуры эталонных штаммов лактобацилл и бифидобактерий. Оценка выраженности ингибирования БПО (табл.) позволила выделить 3 момента. Во-первых, использование растворителя (контроль) в концентрациях  $4 \times 10^{-9}$  и  $2 \times 10^{-9}$  моль несколько уменьшало показатель КБПО для культур *S. typhimurium* (от 17,6±10,9 до 31,4±9,5%); *S. enteritidis* (от 4,1±7,0 до 15,2±6,8%); *K. pneumoniae* (от 14,2±17,5 до 7,2±9,1%) по отношению к тем же культурам, выращенным с добавлением физраствора (группа сравнения). Эти результаты соответствуют данным о способности детергентов снижать биопленкообразование бактерий без влияния на рост планктонных клеток [11]. Вместе с тем, выявленные различия не были статистически значимыми, что не позволяло сделать вывод об ингибирующем влиянии используемых доз растворителя на биопленочный процесс. Во-вторых, милиацин (опыт) обеспечивал выраженное подавление биопленкообразования, существенно снижая КБПО в культурах опытных проб по отношению как к контрольным культурам, так и к культурам проб сравнения. Для *S. typhimurium* это снижение при дозах милиацина 100 и 50 мкг/мл по отношению к контролю составляло 48,7±10,2 и 52,8±10,2%, а по отношению к пробам сравнения 57,7±14,3 и 67,6±9,6%, соответственно. Для изолятов *S. enteritidis* интенсивность снижения КБПО по отношению к контролю колебалась от 34,8±16,8 до 16,9±7,1%, а по отношению к пробам сравнения от 37,4 до 29,5%, соответственно. Для клинических изолятов *K. pneumoniae* выраженность ингибирования КБПО к контролю при указанных концентрациях милиацина была равна 67,4±23,4 и 47,2±17,6%, а по отношению к пробам сравнения — 72,0±22,4 и 47,3±17,7%. Для *P. aeruginosa* показатели снижения КБПО составляли: 64,6±23,9 и 60,9±17,3% по отношению к контролю; 60,6±24,4 и 55,6±17,6% по отношению к пробам сравнения. Сопоставление этих результатов позволило отметить третье положение — неодинаковую степень чувствительности различных видов микроорганизмов к антибиопленочному действию милиацина. Максимальную чувствительность к тритерпеноиду демонстрировали культуры *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, минимальную — *S. enteritidis*. Анализ КБПО у

## Выраженность антибиопленочного эффекта (КБПО) милиацина [Me (Q25-Q75)]

Микроорганизмы	Чистая культура (группа сравнения) (n)	Культура с растворителем $2 \times 10^{-9}$ моль (контроль) (n)	Культура с милиацином 50 мкг/мл (опыт) (n)	Чистая культура (группа сравнения) (n)	Культура с растворителем $4 \times 10^{-9}$ моль (контроль) (n)	Культура с милиацином 100 мкг/мл (опыт) (n)
<i>Salmonella typhimurium</i>	2,68 (1,77—2,89) (24)	1,84 (1,59—2,08) (20)	0,870* * (0,83—0,93) (20)	2,22 (1,79—2,68) (12)	1,83 (1,64—1,97) (12)	0,94* * (0,74—0,98) (12)
<i>Salmonella enteritidis</i>	2,19 (1,995—2,23) (28)	2,01 (1,91—2,09) (18)	0,84* * (0,8—0,89) (18)	2,23 (1,82—2,77) (8)	2,18 (1,78—2,58) (4)	0,77* * (0,75—0,78) (4)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,07 (2,88—3,24) (8)	2,85 (2,72—3,38) (8)	1,62* * (1,48—1,78) (8)	2,89 (2,86—2,94) (4)	2,48 (2,46—2,495) (4)	0,81* * (0,78—0,82) (4)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,97 (4,82—9,77) (8)	7,93 (4,99—10,87) (8)	3,10* * (1,88—4,38) (8)	4,84 (4,70—5,11) (4)	5,42 (5,15—5,75) (4)	1,92* * (1,91—1,94) (4)
Эталонные штаммы лактобацилл	6,49 (6,37—6,57) (5)	6,45 (6,39—6,47) (5)	6,41 (6,35—6,43) (5)	6,47 (6,31—6,55) (5)	6,47 (6,31—6,51) (5)	6,45 (6,37—6,47) (5)
Эталонные штаммы бифидобактерий	8,67 (8,65—8,73) (3)	8,88 (8,61—8,15) (3)	8,62 (8,57—8,74) (3)	8,65 (8,62—8,99) (3)	8,85 (8,61—9,11) (3)	8,66 (8,57—9,08) (3)

Примечание. \*  $p < 0,05$  по отношению к культуре с растворителем; \*  $p < 0,05$  по отношению к чистой культуре.

эталонных штаммов лактобацилл и бифидобактерий показал отсутствие существенных различий под влиянием обеих доз милиацина и растворителя на выраженность биопленкообразования (табл.).

Оценка морфометрических параметров биопленок с помощью АСМ также подтверждала угнетающее действие милиацина на их образование у клинических изолятов бактерий. Тритерпеноид, не влияя на размеры бактериальных клеток, существенно ( $p < 0,05$ ) снижал высоту биопленок в опытных образцах культур *S. typhimurium* ( $0,938 \pm 0,04$  мкм) и *P. aeruginosa* ( $0,705 \pm 0,03$  мкм) по сравнению с образцами контрольных проб (соответственно  $2,939 \pm 0,03$  и  $1,328 \pm 0,04$  мкм) и проб групп сравнения (соответственно  $1,493 \pm 0,04$  и  $1,467 \pm 0,04$  мкм). Высота биопленки штамма *K. pneumoniae* в контрольной и пробе сравнения составляла соответственно  $0,856 \pm 0,08$  и  $0,866 \pm 0,05$  мкм. В отношении *K. pneumoniae* милиацин демонстрировал наиболее выраженный ингибирующий эффект: под влиянием тритерпеноида биопленка не сформировалась. В отличие от патогенных и условно патогенных грамотрицательных микроорганизмов милиацин не оказывал влияния на морфометрические характеристики биопленки, образованной штаммом *B. bifidum* № 791. Высота биопленки в образце пробы сравнения составляла  $3,17 \pm 0,03$  мкм, в образце с растворителем  $2,987 \pm 0,02$  мкм, в опытном образце  $2,942 \pm 0,03$  мкм.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Образование микроорганизмами биопленок рассматривается как форма персистенции (выживания) патогенов/нормофлоры [1]. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что тритерпеноид растительного

происхождения — милиацин можно рассматривать как бифункциональное средство, обладающее помимо иммуностропных свойств способностью ингибировать био пленкообразование у ряда патогенных и условно патогенных микроорганизмов. Влияние на биологические свойства микроорганизмов установлено и для других иммуномодулирующих препаратов. Так, ранее была показана способность иммуномодулятора полиоксидония подавлять персистентные свойства (антикомплементарная, антилизоцимная активность) некоторых патогенных и условно патогенных бактерий [2]. Антимикробная активность, проявляющаяся в подавлении антикарнозиновой активности и БПО золотистого стафилококка, установлена и для иммуностропного препарата циклоферона [9].

Проведенные исследования *in vitro* показали, что милиацин не обладает антимикробным действием в отношении исследуемых культур микроорганизмов, но при этом подавляет их био пленкообразование. По-видимому, механизмы угнетения БПО могут быть опосредованы стероидной структурой тритерпеноида, которая позволяет ему встраиваться в клеточные мембраны и, таким образом, уменьшать их текучесть. Кроме того, данное свойство обеспечивает милиацину возможность связывания неполярных групп на поверхности бактерий, снижая их адгезивные свойства, что важно для начального этапа образования био пленок (адгезия микробных клеток к поверхности). Отсутствие чувствительности к милиацину со стороны отдельных изолятов *S. enteritidis* соответствует представлениям об особенностях адгезивной активности ее, в частности, такого существенного ее механизма, как гидрофобность, отличающаяся варьированием в широких пределах у разных штаммов бактерий даже среди диссоциантов одного типа [2].

Выявленная устойчивость био пленкообразования к милиацину у штаммов лактобацилл и бифидобактерий — представителей нормальной микрофлоры человека, вероятно, наряду с другими, пока не известными факторами, может определяться формированием у них более выраженных био пленок, по сравнению с условно патогенными бактериями, что было установлено ранее [1] и подтвердилось в данном исследовании. Подобная особенность действия милиацина может иметь важное практическое значение, отражая его селективные преимущества по сравнению с другими неселективными средствами, используемыми для подавления био пленкообразования, поскольку характеризуют способность тритерпеноида ограничивать колонизацию биотопов патогенных и условно патогенных грамотрицательных бактерий без негативного влияния на колонизацию этих же биотопов нормофлорой (бифидобактерии и лактобациллы).

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Оренбургской области в рамках научного проекта №16-44-560553 «р\_а».*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург, 2014.
2. Демаков В.А., Кузнецова М.В., Карпунина Т.И., Николаева Н.В. Гидрофобные свойства и пленкообразующая способность штаммов рода *Pseudomonas*, изолированных из разных экологических ниш. Вестник Пермского университета. 2013, 1 (1): 55-56.
3. Кириллов Д.А., Чайникова И.Н., Перунова Н.Б., Челпаченко О.Е., Паньков А.С., Смолягин А.И., Валышев А.В. Влияние иммуномодулятора полиоксидония на биологические свойства микроорганизмов. Журн. микробиол. 2003, 4: 74-78.
4. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стратегия управления бактриальным био пленочным процессом. Журн. инфектология. 2012, 4 (3): 5-15.
5. Олифсон Л.Е., Осадчая Н.Д., Нузов Б.Г., Галкович К.Г., Павлова М.М. Химическая природа и биологическая активность милиацина. Вопросы питания. 1991, 2: 57-59.



6. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина. Журн. микробиол. 2011, 3: 99-109.
7. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстикова Г.А., Толстикова А.Г., Флехтер О.Б. Терпеноиды ряда лупана — биологическая активность и фармакологические перспективы. Природные производные лупана. Биоорганическая химия. 2006, 1: 42-45.
8. Уткина Т.М., Казакова О.Б., Медведева Н.И., Карташова О.Л. Структурно-функциональная характеристика производных бетулина. Антибиотики и химиотерапия. 2011, 56: 11-12.
9. Уткина Т.М., Потехина Л.П., Карташова О.Л., Васильченко А.С. Характеристика механизмов биологической активности циклоферона. Журн. микробиол. 2014, 4: 76-79.
10. Фролов Б.А., Чайникова И.Н., Филиппова Ю.В., Смолягин А.И., Панфилова Т.В., Железнова А.Д. Механизмы реализации защитного действия милиацина для экспериментальной сальмонеллезной инфекции: влияние на эндотоксинемию и продукцию цитокинов. Журн. микробиол. 2014, 5: 8-12.
11. Chang Y., Gu W., Landsborough L.M. Low concentration of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) affects biofilm formation of *Listeria monocytogenes* by inhibiting its initial adherence. Food Microbiol. 2012, 29 (1): 10-17.
12. Lemos M., Burges A., Teodosio J. et al. The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. Int. Biodeterioration and Biodegradation. 2014, 86: 42-51.
13. Nazzaro F., Erantianni F., Coppola R. Quorum sensing and phytochemicals. Int. J. Mol. Sci. 2013, 14 (6):12607-12619.
14. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol. Microbiol. 1998, 28 (3): 449-461.
15. Wojnicz D., Kucharska A. Z., Sokol-Letowska A. et al. Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli*. Urol. Res. 2012, 40 (6): 683-697.

*Поступила 23.02.16*

Контактная информация: Чайникова Ирина Николаевна, д.м.н., проф., 460000, Оренбург, ул. Пионерская, 11, р.т. (3532) 77-44-63

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*С.Н.Клюева, Т.Н.Шуковская, С.А.Бугоркова, П.С.Ерохин, Е.М.Кузнецова, О.А.Волох*

## **ОЦЕНКА СТИМУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ БИОГЕННОГО АМИНА СЕРОТОНИНА НА КАПСУЛОПОДОБНОЕ ВЕЩЕСТВО *FRANCISELLA TULARENSIS***

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

*Цель.* Изучить влияние серотонина на морфометрические и топографические характеристики клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (Cap<sup>+</sup>) и его бескапсульного варианта *F. tularensis* КМ-9 (Cap<sup>-</sup>). *Материалы и методы.* Анализ проводили методами денситоморфометрии и атомно-силовой микроскопии. *Результаты.* Выявлено, что при выращивании *F. tularensis* 15 НИИЭГ (Cap<sup>+</sup>) на FT агаре в присутствии серотонина толщина капсулоподобного вещества, окружающего бактериальные клетки, увеличивалась в среднем в 3 раза и составляла 95,1±0,56 нм против 31,7±0,18 нм в контроле (без серотонина). При аналогичном выращивании *F. tularensis* КМ-9 (Cap<sup>-</sup>) такого явления не обнаружено. Установлено, что в образовании биопленки важную роль играет капсулоподобное вещество туляремийного микроба. *Заключение.* Полученные данные доказывают важное значение фенотипа туляремийного микроба и позволяют предположить особую роль серотонина в процессах формирования биопленочного сообщества, в составе которого бактерии защищены от повреждающих факторов внешней среды.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, серотонин, капсулоподобное вещество, биопленка, денситоморфометрия, атомно-силовая микроскопия

*S.N.Klyueva, T.N.Schukovskaya, S.A.Bugorkova, P.S.Erokhin, E.M.Kuznetsova, O.A.Volokh*

## EVALUATION OF STIMULATING EFFECT OF BIOGENIC AMINE SEROTONIN ON CAPSULE-LIKE SUBSTANCE OF *FRANCISELLA TULARENSIS*

Russian Research Institute of Plague Control «Microbe», Saratov, Russia

**Aim.** Evaluate the effect of serotonin on morphometric and topographic characteristics of cells of vaccine strain of *F. tularensis* 15 NIEG (Cap<sup>+</sup>) and its non-capsule variant *F. tularensis* KM-9 (Cap<sup>-</sup>). **Materials and methods.** Analysis was carried out by methods of densitomorphometry and atomic-force microscopy. **Results.** Cultivation of *F. tularensis* 15 NIEG (Cap<sup>+</sup>) in FT agar has shown that in the presence of serotonin the thickness of capsule-like substance, surrounding bacterial cells, has increased on average 3 times and was  $95.1 \pm 0.56$  nm against  $31.7 \pm 0.18$  nm in control (without serotonin). During similar cultivation of *F. tularensis* KM-9 (Cap<sup>-</sup>) such phenomenon was not detected. Capsule-like substance of tularemia microbe was established to play an important role in biofilm formation. **Conclusion.** The data obtained prove an importance of phenotype of tularemia microbe and allow to assume a special role of serotonin in the processes of formation of biofilm community, in which the bacteria are protected from damaging factors of the environment.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 9–16

Key words: *Francisella tularensis*, serotonin, capsule-like substance, biofilm, densitomorphometry, atomic-force microscopy

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из факторов, определяющих стабильность природных очагов туляремии [7], является высокая экологическая пластичность туляремийного микроба, обладающего способностью длительного сохранения в естественных биоценозах в виде некультивируемых форм, в том числе, в биопленках [5]. В настоящее время проводятся исследования по изучению роли капсулоподобного вещества *Francisella tularensis* для проявления вирулентности [12, 16] и в формировании биопленки [19]. Для патогенных бактерий биопленка является фактором адаптации к внешней среде, так, формирование биопленки возбудителем чумы связывают с ее участием в образовании «чумного блока» [2]. Известно о способности штаммов *F. tularensis* subsp. *poviscida* формировать биопленки на различных поверхностях, в том числе, на хитине ракообразных с участием ферментов хитиназ [15, 17].

Имеются данные о стимулирующем действии биогенных аминов (серотонина, дофамина) на рост клеток возбудителей особо опасных инфекций, таких как чума, туляремия [6, 11]. В том числе, биогенные амины влияют на подвижность и (в случае патогенов) вирулентность микроорганизмов, а также на формирование микробных биопленок [1, 14]. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электродетекцией установлено, что биогенный амин серотонин (5-гидрокситриптамин) имеется у многих патогенных микроорганизмов, а в случае его добавления к их культурам оказывает влияние на ростовые и структурные эффекты микробных колоний [4, 10].

На настоящий момент недостаточно изучена функциональная морфология и ультраструктура голарктического подвида туляремийного микроба, в том

числе, его капсульных ( $\text{Cap}^+$ ) и бескапсульных ( $\text{Cap}^-$ ) вариантов и их способность формировать био пленку для обеспечения приспособительной изменчивости патогена в среде обитания.

В освещении механизмов адаптации к неблагоприятным условиям среды возбудителя туляремии и других особо опасных инфекций важное место занимают данные о субклеточном строении бактерий при их трехмерной визуализации, а также морфологические изменения бактерий *F. tularensis* под действием различных биологически активных веществ. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является перспективным методом, позволяющим исследовать особенности структуры поверхности бактерий особо опасных инфекций [9].

Цель работы заключалась в изучении влияния биогенного амина серотонина на морфометрические и топографические характеристики клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ) и его бескапсульного варианта *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ) методами денситоморфометрии и АСМ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ) и его бескапсульный вариант *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ) выращивали на FT агаре с глюкозо-витаминной добавкой (ФБУН ГНЦ ПМБ) при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 48 ч. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Из полученных культур готовили бактериальные взвеси в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида рН 7,2 по стандартному образцу мутности ОСО-42-28-85П 10 единиц, эквивалентному  $5 \times 10^9$  м.к./мл. Методом серийных разведений доводили концентрацию клеток до  $1 \times 10^3$  м.к./мл.

Серотонин-креатинин сульфат («Merck», Germany) применяли в виде свежеприготовленного водного раствора, стерилизованного фильтрацией через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Поверхность пластин FT агара до посева бактериальных взвесей обрабатывали в течение 15 мин раствором серотонина концентрацией  $1 \times 10^{-5}$  М,  $1 \times 10^{-6}$  М,  $1 \times 10^{-7}$  М в количестве 0,1 мл [10]. Затем на обработанные указанным способом агаровые пластины высевали культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ) и *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ) в концентрациях 100 м.к./0,1 мл. Контролем являлись посевы *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ) и *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ) в концентрациях 100 м.к./0,1 мл, сделанные на FT агар соответственно без обработки их серотонином. Обработку непосредственно самих взвесей клеток *F. tularensis* ( $1 \times 10^3$  м.к./мл) проводили серотонином  $1 \times 10^{-5}$  М в течение 30 мин при комнатной температуре, затем высевали по 100 мкл соответствующей бактериальной взвеси на FT агар. Посевы *F. tularensis* инкубировали при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 48 часов.

Способность формировать био пленку штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ) и *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ) оценивали методом окрашивания кристалл-виолетом [18] в стеклянных пробирках и полистироловых планшетах.

Морфологию и величину колоний и клеток туляремиальных бактерий оценивали при увеличении ( $\times 40$ ) и ( $\times 1000$ ) с применением аппаратно-программного комплекса «Мекос-Ц», оснащенного биологическим микроскопом Olimpus CX 31 с видеокамерой JVC. Работу проводили в программе «Денситоморфометрия» (версия 2.1.0.0.).

Для проведения АСМ клетки *F. tularensis* после обеззараживания 2,5 % глутаральдегидом осаждали центрифугированием при 3000 г в течение 15 — 20



мин, осадок отмывали дважды стерильной дистиллированной водой и хранили при температуре 4°C [8]. После осуществления контроля специфической стерильности полученные взвеси клеток в объеме 4 мкл помещали на поверхности подложек (покровные стекла размером 18x18 мм) и высушивали на воздухе.

Топографические характеристики поверхностных структур туляремийных бактерий изучали с применением атомно-силового микроскопа Solver P47-PRO («NT-MDT», Россия) методами полуконтактным, рассогласования и отображения фазы. При этом использовали полуконтактные кремниевые зонды серии NSG01 («NT-MDT», Россия) жесткостью 5,1 Н/м, с радиусом кривизны 10 нм и резонансной частотой 150 кГц. Обработку и анализ топографических изображений осуществляли с использованием программы Nova («NT-MDT», Россия), позволяющей редактировать полученные данные, а также представлять их в дву- (2D) и трехмерном (3D) формате.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по результатам трех независимых экспериментов с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2010. Для определения достоверности различий между анализируемыми выборками определяли среднюю арифметическую ряда, среднее квадратичное отклонение, среднюю ошибку средней арифметической. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении влияния серотонина на рост туляремийного микроба использовали концентрации серотонина ( $1 \times 10^{-7}$  —  $1 \times 10^{-5}$  М), сопоставимые с микромолярными концентрациями серотонина ( $8,5 \times 10^{-4}$  —  $1 \times 10^{-6}$  М), детектируемых в культурах различных микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptococcus faecalis*) при выращивании на плотных питательных средах [1, 4, 10]. Через 48 ч инкубации регистрировали разреженный рост туляремийных колоний в виде капелек росы. В контроле наблюдали колонии SR-типа, характерные для вакцинных штаммов возбудителя туляремии, диаметр которых при морфометрическом анализе составлял в среднем  $948,76 \pm 33,79$  мкм. Предварительная обработка FT агара серотонином в концентрациях  $1 \times 10^{-5}$  М,  $1 \times 10^{-6}$  М,  $1 \times 10^{-7}$  М не влияла на рост и морфологию колоний штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ (Cap<sup>+</sup>) и *F. tularensis* KM-9 (Cap<sup>-</sup>).

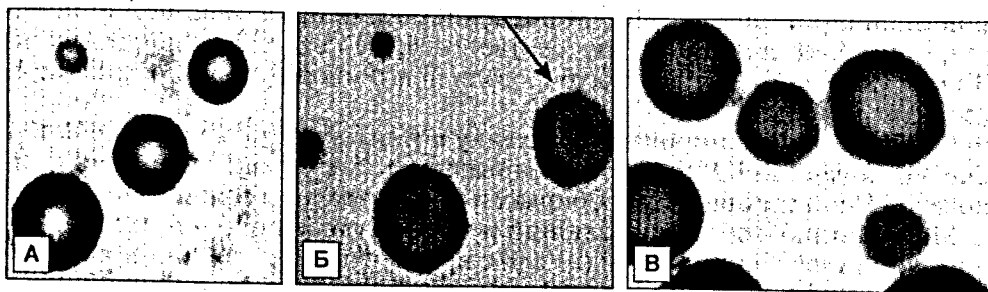


Рис. 1. SR-колонии *F. tularensis* 15 НИИЭГ через 48 ч культивирования при 37°C на FT агаре без серотонина (А), в присутствии серотонина (Б) и выросшие на FT агаре из взвесей *F. tularensis* 15 НИИЭГ, обработанных серотонином (В).

Стрелкой указано капсулоподобное вещество. Ув. x40.

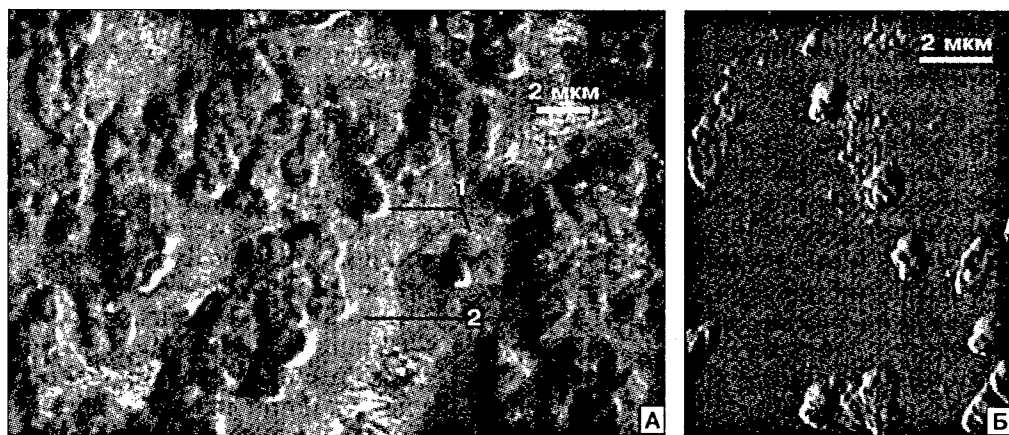


Рис. 2. АСМ-изображения клеток штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, образующих био пленку (А) и *F. tularensis* КМ-9 (Б) через 48 ч культивирования при 37°C на FT агаре.

А — метод отображения фазы, Б — метод рассогласования. Стрелками указаны: 1 — клетки *F. tularensis* 15 НИИЭГ; 2 — межклеточный матрикс.

Денситоморфометрическое исследование показало, что колонии *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ), выросшие на FT агаре в присутствии серотонина в концентрации  $1 \times 10^{-5}$  М, а также из взвесей клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ), обработанных серотонином в концентрации  $1 \times 10^{-5}$  М, окружены капсулоподобным слизистым покровом. Это образование имело вид небольшой светлой зоны вокруг бактериальной колонии (рис. 1Б). Причем колонии возбудителя туляремии, сформировавшиеся на агаре в присутствии серотонина, располагались одиночно (рис. 1Б), а после высевы бактериальных взвесей *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ), обработанных серотонином, в основном — цепочками (рис. 1В). Наличием слизи, которая удерживает микробные колонии, объясняется их характерное расположение в виде цепочек. При аналогичном выращивании *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ) такого явления не обнаружено.

При бактериоскопическом исследовании учитывали тинкториальные свойства (окраска по Граму), морфологию клеток туляремийного микроба. Морфометрические показатели клеток *F. tularensis* (длина, ширина) соответствовали данным литературы. С помощью АСМ установлены трехмерные характеристики бактерий туляремии (высота, объем). Установлено, что высота клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенных на средах, обработанных серотонином, почти в 2 раза превышала аналогичный показатель в контроле (без серотонина) и составляла  $0,29 \pm 0,017$  мкм и  $0,15 \pm 0,002$  мкм соответственно ( $p < 0,05$ ).

Для изучения топографических характеристик туляремийного микроба в нанометровом диапазоне использовался полуконтактный режим АСМ. При этом было обнаружено капсулоподобное вещество, окружающее клетки *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ). Установлено, что клетки *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ), которые выращивались на культуральной среде в присутствии серотонина и без него, на подложке образуют клеточные конгломераты. Причем, при инкубации посевов *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ) на средах, обработанных серотонином, толщина капсулоподобного слизистого вещества туляремийного микроба увеличивалась ( $p < 0,05$ ) по результатам трех независимых экспериментов в среднем в 3 раза и равнялась  $95,1 \pm 0,56$  нм против  $31,7 \pm 0,18$  нм в

контроле (без серотонина). Толщина капсулоподобного вещества туляремийного микроба в присутствии серотонина максимально увеличивалась в 5,8 раза и составляла 196,5 нм против 33,4 нм ( $p < 0,05$ ) в контроле.

Методом АСМ показано, что на подложке бактерии *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ) располагаются в виде отдельных клеток, не образуя конгломераты. В отличие от *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ) бескапсульный штамм *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ) капсулоподобное вещество не продуцировал как в присутствии серотонина, так и без него. Выявлено также, что серотонин не влиял на морфологию клеток и поверхность клеточной стенки *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ).

В следующей серии экспериментов было проведено изучение способности штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ) и *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ) формировать биопленку. Методом АСМ установлено, что *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ) образовывал биопленку (рис. 2А) на различных поверхностях (стекло, пластик) как в условиях оптимальной питательной среды, так и при лимите необходимых витаминов и глюкозы. Через 48 ч культивирования в тонком слое у  $\text{Cap}^+$  штамма зарегистрировано образование групп клеток (рис. 2А), тогда как у штамма с  $\text{Cap}^-$  фенотипом отмечены единичные клетки (рис. 2Б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты денситоморфометрического исследования об отсутствии стимулирующего эффекта серотонина на рост колоний капсульного вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ) и его бескапсульного варианта *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ) на плотной питательной среде согласуются с аналогичными данными при выращивании туляремийных бактерий в жидкой среде культивирования в присутствии серотонина [6].

С использованием АСМ зафиксировано, что капсулоподобное вещество туляремийного микроба способствует образованию клеточных конгломератов *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $\text{Cap}^+$ ), тесно связанных с образованием биопленки. Бескапсульный штамм *F. tularensis* КМ-9 ( $\text{Cap}^-$ ) биопленку не образует, что связано, по-видимому, с отсутствием у бескапсульных штаммов антигенов капсульного вещества.

По данным литературы, с помощью электронной микроскопии изучен капсулоподобный покров туляремийного микроба и показана прямая или косвенная связь этого образования с наружной мембраной бактериальной клетки [16]. Так, известно, что во внешней мембране у капсульных вариантов присутствует белок с молекулярной массой 65 кДа и липополисахарид (ЛПС) находится в S-форме, тогда как у бескапсульных — белок с молекулярной массой 33 кДа и R-ЛПС [3]. Также доказано, что капсула туляремийного микроба аналогична капсулам, продуцируемым некоторыми грамотрицательными бактериями *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Salmonella enterica* [13].

Примечательно, что биогенные амины (норадреналин, дофамин, серотонин) у некоторых микроорганизмов содержатся не внутриклеточно, а в покрывающем клетки матриксе [10]. Из литературных источников известно, что серотонин, выявляемый методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электродетекцией у многих патогенных микроорганизмов, оказывает стимулирующее влияние на ростовые и структурные свойства микробных колоний, а также стимулирует формирование групп клеток *E. coli*, спаянных матриксом [1]. Образование матрикса и биопленки связано с межклеточной сигнальной системой, обеспечивающей «чувство кворума» («quorum sensing») и заключается в способности микроорганизмов регулировать плотность своей популяции [7]. Проблема биопленок возбудителя туляремии имеет огромное практическое значение, поскольку эта форма существования микроорганиз-



мов наряду с некультивируемыми формами, по-видимому, способна поддерживать существование возбудителя в окружающей среде в межэпизоотические (межэпидемические) периоды [5].

Таким образом, установлено, что в образовании биопленки важную роль играет капсулоподобное вещество туляремийного микроба. Серотонин в концентрации  $1 \times 10^{-5}$  М стимулирует выработку капсулоподобного слизистого вещества штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ (Cap<sup>+</sup>). Полученные данные доказывают важное значение фенотипа туляремийного микроба и позволяют предположить особую роль серотонина в процессах формирования биопленочного сообщества, в составе которого бактерии защищены от повреждающих факторов внешней среды, что дает им возможность длительно персистировать в почвенных и водных экосистемах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анучин А.М., Чувелев Д.И., Кировская Т.А., Олескин А.В. Действие нейромедиаторных моноаминов на ростовые характеристики *Escherichia coli* K-12. Микробиология. 2008, 77 (6): 758-765.
2. Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Куклева Л.М., Кошель Е.И., Одинокоев Г.Н., Шавина Н.Ю., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Краснов Я.М., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Ерохин П.С., Бойко А.В., Кутырев В.В. Изучение образования биопленки у беспигментных и бесплазмидных мутантов штамма *Yersinia pestis* на биотических поверхностях в условиях *in vitro* и *in vivo*. Пробл. особо опасных инф. 2012, 3 (113): 45-49.
3. Кузнецова Е.М., Шепелев И.А., Волох О.А. Структурно-функциональная характеристика основных антигенов *Francisella tularensis*. Пробл. особо опасных инф. 2009, 100: 44-49.
4. Маликина К.Д., Шишов В.А., Чувелев Д.И., Кудрин В.С., Олескин А.В. Регуляторная роль нейромедиаторных аминов в клетках *Saccharomyces cerevisiae*. Прикл. биохим. и микробиол. 2010, 46 (6): 672-677.
5. Мещерякова И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика (к 80-летию создания первой туляремийной лаборатории в России). Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 2: 17-22.
6. Мишанькин Б.Н., Демьяненко С.В., Романова Л.В. Действие серотонина и дофамина на рост штаммов *Yersinia pestis* и *Francisella tularensis*. Журн. микробиол. 2009, 2: 93-96.
7. Олескин А.В., Ботвинко И.В., Цавкелова Е.А. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов. Микробиология. 2000, 69 (3): 309-327.
8. Транквилевский Д.В., Удовиков А.И., Попов В.П., Захаров К.С., Попов Н.В., Безмертвый В.Е. Состояние численности грызунов и эпидемиологическая обстановка по туляремии на территории Российской Федерации во втором полугодии 2014 г. и прогноз на 2015 г. Пробл. особо опасных инф. 2015, 1: 30-35.
9. Уткин Д.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Спицын А.Н., Волох О.А., Осина Н.А. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом атомно-силовой микроскопии. Пробл. особо опасных инф. 2012, 1 (112): 62-64.
10. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов. Прикл. биохим. микробиол. 2006, 42 (3): 261-268.
11. Шуковская Т.Н., Ключева С.Н., Кравцов А.Л., Волох О.А., Алешина Ю.А., Кутырев В.В. Влияние биогенного амина серотонина на рост и профиль белков чумного микроба в условиях культивирования на плотных питательных средах. Пробл. особо опасных инф. 2008, 2 (96): 35-39.
12. Bandara A. V., Champion A. E., Wang X. et al. Isolation and mutagenesis of a capsule-like complex (CLC) from *Francisella tularensis*, and contribution of the CLC to *F. tularensis* virulence in mice. PLoS One. 2011, 6: e19003 10.1371/journal.pone.0019003.
13. Chen Y., Bystricky P., Adeyeye J. et al. The capsule polysaccharide structure and biogenesis for non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S: genes are embedded in the LPS region. BMC Microbiol. 2007, 7: 20. doi: 10.1186/1471-2180-7-20.

14. Clarke M.B., Hughes D.T., Zhu C. et al. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006, 103: 10420-10425.
15. Durham-Colleran M.W., Verhoeven A.B., van Hoek M.L. Francisella novicida forms in vitro biofilms mediated by an orphan response regulator. *Microb Ecol*. 2010, 59 (3): 457-465.
16. Jones B.D., Faron M., Rasmussen J.A., Fletcher J.R. Uncovering the components of the Francisella tularensis virulence stealth strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2014, 4: 1-10. doi: 10.3389/fcimb.2014.00032.
17. Margolis J.J., El-Etr S., Joubert L.-M. et al. Contributions of Francisella tularensis subsp. novicida chitinases and secretion system to biofilm formation on chitin. *Appl. Environ. Microbiol*. 2010, 76 (2): 596-608.
18. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol*. 1998, 28 (3): 449-461.
19. Van Hoek M.L. Biofilms. An advancement in our understanding of Francisella species. *Virulence*. 2013, 4 (8): 833-846. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.27023>.

Поступила 15.01.16

Контактная информация: Ключева Светлана Николаевна, к.б.н., 410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)51-52-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

А.А. Бывалов<sup>1,2</sup>, Л.Г. Дудина<sup>1</sup>, С.Г. Литвинец<sup>1</sup>, Е.А. Мартинсон<sup>1</sup>

## ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕЦЕПЦИИ БАКТЕРИОФАГА ЧУМНОГО ПОКРОВСКОЙ

<sup>1</sup>Вятский государственный университет, Киров; <sup>2</sup>Институт физиологии, Сыктывкар

**Цель.** Исследование механизма рецепции бактериофага чумного Покровской к клеткам *Yersinia pestis* с использованием панели моноклональных антител. **Материалы и методы.** С помощью метода конкурентного ингибирования оценена способность моноклональных антител к антигенным эпитопам наружной мембраны бактерий рода *Yersinia* ингибировать адгезию исследуемого бактериофага к клеткам *Y. pestis* штамм EV. **Результаты.** Подтверждена ключевая роль структуры углеводной природы в рецепции бактериофага Покровской. Установлено, что из пяти линий моноклональных антител к белковым эпитопам две вызывают существенную инактивацию адгезии бактериофага к бактериальным клеткам. **Заключение.** Высказано предположение о возможности участия в рецепции бактериофага Покровской клетками чумного микроба структуры полипептидной природы.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 16–21

Ключевые слова: бактериофаг, *Yersinia pestis*; моноклональные антитела, адгезия

А.А. Byvalov<sup>1,2</sup>, L.G. Dudina<sup>1</sup>, S.G. Litvinets<sup>1</sup>, E.A. Martinson<sup>1</sup>

## IMMUNOCHEMICAL STUDY OF RECEPTION OF PLAGUE BACTERIOPHAGE POKROVSKY

<sup>1</sup>Vyatsky State University, Kirov; <sup>2</sup>Institute of Physiology, Syktyvkar, Russia

**Aim.** Study of mechanism of reception of plague bacteriophage Pokrovsky to cells of *Yersinia pestis* using a panel of monoclonal antibodies. **Materials and methods.** Using a method of competitive inhibition, the ability of monoclonal antibodies against antigenic epitopes of outer membrane of *Yersinia* genus bacteria to inhibit adhesion of the studied bacteriophage to cells of *Y. pestis* EV strain, was evaluated. **Results.** A key role of structure of carbohydrate nature in reception of Pokrovsky

bacteriophage was confirmed. Among 5 lines of monoclonal antibodies against protein epitopes 2 were established to cause significant inactivation of bacteriophage adhesion to bacterial cells. *Conclusion.* An assumption is proposed regarding participation of a structure of polypeptide nature in reception of Pokrovsky bacteriophage by cells of plague microbe.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 16–21

Key words: bacteriophage, *Yersinia pestis*, monoclonal antibodies, adhesion

## ВВЕДЕНИЕ

*Yersinia pestis* — один из трех видов бактерий рода *Yersinia*, патогенных для человека. Эволюционно это самый «молодой» представитель вирулентных иерсиний [6], резко отличающийся от своих филогенетических предшественников — энтеропатогенов по эпидемиологическим и патогенетическим особенностям. Вызываемое *Y. pestis* заболевание — самая тяжелая в истории человечества бактериальная инфекция, три пандемии которой унесли жизни более 200 млн людей. Сохранение природных очагов чумы, ежегодно регистрируемые вспышки заболевания вызывают необходимость не только поддержания на существующем уровне, но и совершенствования всей системы противочумных мероприятий. Последнее приобретает особую актуальность в связи с широким распространением явления антибиотикорезистентности возбудителей многих инфекционных заболеваний, в том числе и чумы [13].

Указанная проблема чрезвычайно значима для чумной инфекции вследствие способности возбудителя передаваться воздушно-капельным путем, а также быстрого развития болезни в постинкубационный период, что может привести к невозможности своевременно выбрать и применить эффективную схему лекарственной терапии. В этой связи, в последние годы возобновился интерес исследователей и врачей-инфекционистов к возможности применения специфических фагов для лечения чумы [7], что предлагалось уже вскоре после выделения первых специфических чумных бактериофагов [14]. Однако в последующие десятилетия эта идея должного развития не получила. Вместе с тем, практика клинического применения бактериофагов для лечения людей от некоторых инфекционных заболеваний насчитывает без малого 100 лет [10].

Внедрение в современную лечебную практику новых средств, в том числе и бактериофагов, предполагает проведение широких исследований, включающих изучение механизмов и условий адгезии частиц бактериофага на микробной клетке. Общий механизм защиты бактерии основан на предотвращении адсорбции фага и/или инъекции его генома в клетку путем выключения экспрессии соответствующего рецептора, секреции внеклеточных полисахаридов, ограничивающих доступ фага к рецептору, биосинтеза мембранных белков, препятствующих инъекции генетического материала фага в клетку и др. В свою очередь, бактериофаги располагают арсеналом способов преодоления иммунитета прокариотической клетки. Так, для повышения эффективности адгезии они могут использовать различные рецепторы на поверхности микроба, продуцировать ферменты, деградирующие внеклеточные полисахариды [11]. Механизмы взаимодействия специфических бактериофагов с клетками возбудителя чумы, в первую очередь, с использованием иммунохимических и биофизических методов, исследованы недостаточно. Вместе с тем, в последнее десятилетие секвенирован геном пяти чумных бактериофагов, наиболее востребованных в диагностической практике [15]. Идентифицированы рецепторы шести бактериофагов, локализованные на различных участках молекулы

липополисахарида (ЛПС) *Y. pestis* [9]. В предшествующих исследованиях нами был получен набор гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к ряду неидентичных антигенных эпитопов наружной мембраны иерсиний углеводной и белковой природы [2, 3].

Цель настоящей работы состояла в изучении способности к конкурентному ингибированию названными моноклональными антителами рецепции клетками штамма EV *Y. pestis* бактериофага Покровской.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *Y. pestis* EV, бактериофаг чумной Покровской и поликлональную лошадиную агглютинирующую сыворотку к цельным клеткам *Y. pestis* (ПЧС), полученные из коллекции Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», а также моноклональные антитела девяти линий (МКАт 1 — 9) к поверхностным антигенам бактерий рода *Yersinia*, полученные нами ранее [2, 3]. Культуру *Y. pestis* выращивали в течение 2 сут при температуре 27°C на плотной питательной среде — БТН-агаре (Биотехновация, Россия), затем инактивировали 0,3% формальдегидом.

Для обработки бактерий протеиназой К («Serva», США) 1 мл убитой культуры (~2·10<sup>9</sup> микробов/мл) осаждали центрифугированием, осадок ресуспендировали в 1 мл фосфатного буферного раствора (ЗФР) pH 7,3, содержащего протеиназу К в концентрации 0,2 мг/мл. Обработку ферментом проводили в течение трех часов при температуре 37°C. В контрольной пробирке клетки

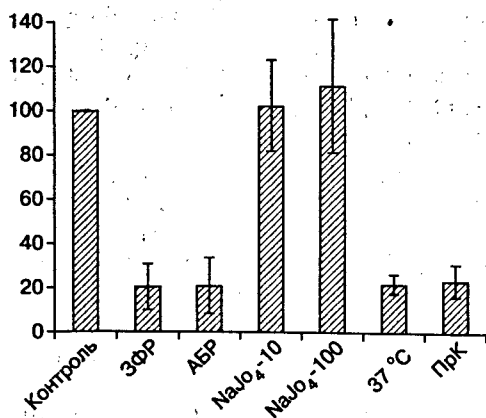


Рис. 1. Влияние обработки клеток *Y. pestis* штамм EV периодатом натрия и протеиназой К на адгезию бактериофага Покровской.

По оси абсцисс — препараты бактериофага: контроль — без микробных клеток; ЗФР — с клетками в ЗФР при комнатной температуре; АБР — с клетками в АБР; NaJO<sub>4</sub>-10 и NaJO<sub>4</sub>-100 с клетками, обработанными периодатом натрия в концентрации 10 и 100 мкг/мл соответственно; 37°C — с клетками в ЗФР 37°C; ПрК — с клетками, обработанными протеиназой К. По оси ординат — остаточное кол-во бактериофага в надосадочной жидкости (%) (здесь и на рис. 2).

выдерживали в ЗФР без добавления протеиназы К при температуре 37°C.

При обработке периодатом натрия («Acros Organics», США) 1 мл исследуемой бактериальной культуры (~2·10<sup>9</sup> микробов/мл) осаждали центрифугированием, и осадок ресуспендировали в 1 мл 50 мМ ацетатного буферного раствора (АБР) pH 5,2 со 100 (или 10) мМ NaJO<sub>4</sub>. Контролем служили клетки, ресуспендированные в ацетатном буфере без добавления периодата натрия. Препараты выдерживали в течение 2 часов при комнатной температуре в защищенном от света месте. Общим контролем служил препарат убитых клеток, ресуспендированных в ЗФР и не подвергавшихся нагреванию при температуре 37°C.

После обработки бактерий протеиназой К и периодатом натрия все препараты (опытные и контрольные) отмывали один раз в ЗФР и ресуспендировали в ЗФР до оптической плотности 1,2 при длине волны 600 нм. Смешивали 500 мкл суспензии бактериальных клеток и 100 мкл раствора бактериофага, содержащего 8·10<sup>5</sup> БОЕ.

Растворы инкубировали в течение 1,5 часов при температуре 37°C на термощейкере, после чего бактериальные клетки осаждали центрифугированием. Концентрацию оставшихся в надосадочной жидкости частиц бактериофага определяли по методу Грациа [4], результаты учитывали через 17 — 20 час.

Для оценки возможности конкуренции МКАт и бактериофага за сайты связывания на поверхности клеток *Y.pestis* суспензию инактивированных бактерий в ЗФР в концентрации  $(2 - 3) \cdot 10^9$  микробов/мл инкубировали с МКАт ( в виде асцитной жидкости) в разведении 1:100 для МКАт 1, 2, 5 — 7, 9 и 1:50 для МКАт 3, 4, 8 или с ПЧС в разведении 1:100 в течение 1,5 часов при температуре 37°C в термощейкере. После центрифугирования осадок клеток ресуспендировали в ЗФР до оптической плотности 1,2 при длине волны 600 нм. Адсорбцию бактериофага на микробные клетки и определение концентрации бактериофага проводили по вышеописанной методике.

На рис. 1 и 2 представлены результаты в виде средних арифметических с доверительным интервалом для  $p=0,95$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Учитывая то, что использованные в работе МКАт комплементарны как углеводным (МКАт 1 — 4), так и полипептидным (МКАт 5 — 9) эпитопам наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*, предварительно представлялось целесообразным с помощью указанных выше методических подходов определить химическую природу рецепторов бактериофага Покровской. Полученные результаты (рис. 1) согласуются с данными Филиппова А.А. и др. [9], показавших с использованием мутантов штамма CO92 *Y. pestis*, что рецептор бактериофага Покровской ассоциирован с областью Нер II/ Нер III на внутренней части кора ЛПС. Обработка клеток протеиназой К не оказывала влияния на уровень адгезии бактериофага, в то же время, предварительная инкубация бактериальной суспензии с периодатом натрия даже в минимальной из использованных концентраций (10 мМ) полностью отменяла способность клеток адгезировать бактериофаг (рис. 1). Эти данные указывают на углеводную природу рецептора бактериофага Покровской.

Результаты оценки конкурентного ингибирования рецепции бактериофага предшествующей обработкой препаратами, содержащими антитела различной специфичности, показали, что ни один из них не предотвращал полностью адгезию бактериофага (рис. 2). Так, ПЧС, содержащая поликлональные антитела к жи-

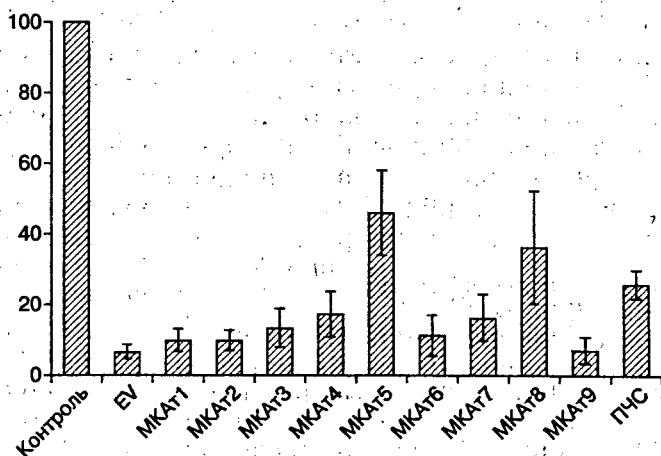


Рис. 2. Конкуренция антител и бактериофага Покровской за сайты связывания на поверхности клеток *Y. pestis* штамм EV.

По оси абсцисс — препараты бактериофага: контроль — без микробных клеток; EV — с интактными клетками, МКАт 1 — 9, ПЧС — с клетками, обработанными соответствующими антителами.

неспособным клеткам *Y. pestis*, лишь в 4 раза повышает количество неприсоединившихся к бактериальным клеткам частиц бактериофага (в среднем с 6,5 до 25,7%). МКАт 1 — 4, как и ожидалось, не оказали выраженного влияния на адгезию бактериофага. Вместе с тем, следует отметить тенденцию к неспецифическому ингибированию связывания с микробной клеткой бактериофага препаратами МКАт (во всяком случае, МКАт 3, 4), комплементарных эпитопам О-боковых цепей *Y. pseudotuberculosis*, не экспрессируемых клетками *Y. pestis* (рис. 2).

Среди МКАт 5 — 9, выявляющих белковые антигенные детерминанты наружной мембраны *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* [3], МКАт 5 и МКАт 8 вызывали подавление рецепции бактериофага.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Некоторое снижение адгезивности бактериофага к клеткам штамма EV после их обработки моноклональными антителами к О-боковым цепям ЛПС *Y. pseudotuberculosis* (МКАт 3, 4) может происходить за счет Fc-фрагментов антител либо иных компонентов асцитной жидкости. Эти данные подтверждают известную способность нескольких поверхностных белков бактерий *Y. pseudotuberculosis*, например, шаперона Skp, неспецифически связывать иммуноглобулины G [5] или белка рН 6,0 *Y. pestis* — иммуноглобулины подклассов G 1 — 3 и аполипопротеин B100 из неиммунных сывороток человека и животных [1].

Существенное подавление рецепции бактериофага путем обработки клеток МКАт 5, 8 объясняется, по-видимому, стерическим экранированием антителами, провзаимодействовавшими со своими специфическими белковыми эпитопами, пространственно соседствующими с коровой областью ЛПС, включающей рецепторную структуру бактериофага.

Иное и, возможно, менее вероятное толкование частичного ингибирования рецепции бактериофага с использованием вышеуказанных МКАт может состоять в том, что бактериофаг Покровской обладает способностью адгезировать к бактерии посредством распознавания не только упомянутого рецептора углеводной природы (и связывания с ним), но и иного, глубже расположенного белкового участка наружной мембраны. Так, показано, что в акте адгезии чумного бактериофага Yер-phi к микробной клетке участвуют не только ЛПС, но и идентифицированные структуры белков наружной мембраны Ail и OmpF [15]. Правда, в отличие от представленных нами данных, такой вывод сделан авторами, в том числе, и на основании результатов опытов, в которых адгезия бактериофага подавлялась предварительной обработкой бактерий как протеиназой K, так и периодатом натрия.

Довольно невысокую специфичность псевдотуберкулезного бактериофага R1-37, способного инфицировать бактерии *Yersinia similis* O:9 и *Yersinia enterocolitica* нескольких серотипов [8], авторы объясняют двояко. Во-первых, пространственным (но не химическим) сходством рецепторной структуры ЛПС в области наружного кора *Y. enterocolitica* YeO3-c-R1 и О-антигена *Y. similis* R708. Второе и более вероятное, по мнению авторов, объяснение состоит в том, что вышеуказанный бактериофаг экспрессирует несколько белков, способных связываться с различными участками ЛПС.

Более того, есть данные литературы, указывающие, в частности, на способность одного из бактериофагов семейства T4 с одинаковой эффективностью использовать в качестве рецептора OmpC или ЛПС *Escherichia coli* [12]. В связи с выше изложенным, отсутствие в наших опытах инактивации адсорб-



ции бактериофага после инкубации клеток с протеиназой К прямо не означает неучастия белковых структур наружной мембраны *Y. pestis* в рецепции специфического бактериофага. Частичное блокирование рецепции бактериофага МКАт 5 и МКАт 8, а также ПЧС может свидетельствовать об обратном. Во всяком случае, требуется проведение дальнейших специальных исследований механизма взаимодействия бактериофага Покровской с клеткой *Y. pestis* с использованием иных методических подходов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Молекул. генетика. 2002, 3: 3-23.
2. Бывалов А.А., Дудина Л.Г., Литвинец С.Г., Новикова О. Д., Хоменко В. А., Портнягина О. Ю., Оводов Ю. С. Исследование поверхностных антигенных эпитопов *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью моноклональных антител. Прикладная биохимия и микробиология. 2014, 50 (2): 203-210.
3. Бывалов А. А., Дудина Л. Г., Чернядьев А. В., Кобышев И. В., Литвинец С. Г., Оводов Ю.С. Иммунохимическая активность Б-антигена *Yersinia pseudotuberculosis*. Молекул. генетика. 2015, 2: 32-38.
4. Лабинская А.С. Титрование бактериофага. В кн.: Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М., Медицина, 1978, с. 77-79.
5. Сидорин Е.В., Зиганшин Р.Х., Набережных Г.А., Лихацкая Г.Н., Трифонов Е.В., Анастюк С.Д., Черников О.В., Соловьева Т.Ф. Белок шаперон Skp из *Yersinia pseudotuberculosis* обладает способностью связывать иммуноглобулины G. Биохимия. 2009, 74 (4): 501-514.
6. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999, 96: 14043-14048.
7. Anisimov A.P., Amoako K.K. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics. J. Med. Microbiol. 2006, 55: 1461-1475.
8. Beczala A., Ovchinnikova O.G., Datta N. et al. Structure and genetic basis of *Yersinia similis* serotype O:9 O-specific polysaccharide. Innate Immunity. 2015, 21 (1): 3-16.
9. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y. et al. Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis*: identification of phage receptors and attenuation for mice. PLoS One. 2011, 6 (9): E25486.
10. Golkar Z., Bagasra O., Pace D.G. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. J. Infect. Dev. Ctries. 2014, 8 (2): 129-136.
11. Marraffini L.A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. Nature. 2015, 1; 526 (7571): 55-61.
12. Montag D., Hashemolhosseini S., Henning U. The receptor-recognition area of protein 37 of phage T4 Tula and Tulb. Receptor-recognition proteins of T-even type bacteriophages. J. Mol. Biol. 1990, 216 (2): 327-334.
13. Welch T.J., Fricke W.F., McDermott P.F. et al. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. PLoS One. 2007, 2 (3): E309.
14. Summers W.C. Bacteriophage therapy. Annu. Rev. Microbiol. 2001, 55: 437-453.
15. Zhao X., Cui Y., Yan Y. et al. Outer membrane proteins Ail and OmpF of *Yersinia pestis* are involved in the adsorption of T7-related bacteriophage Yep-phi. J. Virol. 2013, 87 (22): 12260-12269.

Поступила 23.02.16

Контактная информация: Бывалов Андрей Анатольевич, д.м.н., проф.,  
610000, Киров, ул. Московская, 36, р.т. (8332)64-50-69

З.Ф. Дугаржапова<sup>1</sup>, Н.Б. Бадмаев<sup>2</sup>, В.Е. Такайшвили<sup>1</sup>, Е.В. Кравец<sup>1</sup>, Б.З. Цыдыпов<sup>3</sup>,  
О.Н. Очиров<sup>4</sup>, А.А. Аюржанаев<sup>3</sup>, Б.В. Содномов<sup>4</sup>, Б.Б. Малаткина<sup>7</sup>, О.А. Зверева<sup>5</sup>,  
О.П. Шахаева<sup>6</sup>, К.В. Булутов<sup>7</sup>, С.С. Ханхареєв<sup>8</sup>, М.В. Чеснокова<sup>1</sup>, С.В. Балахонов<sup>1</sup>

## ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ ТЕРРИТОРИЙ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ

<sup>1</sup>Иркутский научно-исследовательский противочумный институт; <sup>2</sup>Институт общей и экспериментальной биологии, <sup>3</sup>Байкальский институт природопользования, <sup>4</sup>Институт физического материаловедения, <sup>5</sup>Бурятская республиканская научно-производственная ветеринарная лаборатория, <sup>6</sup>Управление ветеринарии по Республике Бурятия, <sup>7</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Бурятия, <sup>8</sup>Управление Роспотребнадзора по Республике Бурятия, Улан-Удэ

*Цель.* Анализ результатов экологического и микробиологического обследования неблагополучных по сибирской язве территорий в Баргузинском и Курумканском районах Республики Бурятия для обоснования профилактических мероприятий. *Материалы и методы.* Использованы космические снимки и установлены пространственные и ландшафтные признаки скотомогильников. Отобраны и исследованы 174 пробы почвы и шесть проб костных останков сельскохозяйственных животных. *Результаты.* В августе 2014 г. проведено обследование 15 объектов в 12 стационарно-неблагополучных по сибирской язве пунктов Республики Бурятия. Разработан и предложен новый подход к выявлению заброшенных скотомогильников, в пробах которых обнаружена ДНК *Bacillus anthracis*. *Заключение.* Экологические свойства почв двух районов республики способствуют длительному сохранению возбудителя сибирской язвы в окружающей среде. Рекомендованы мероприятия по санитарной очистке неблагополучных территорий, утилизации биологических отходов и решение правового статуса заброшенных объектов.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 22—28

**Ключевые слова:** сибирская язва, *Bacillus anthracis*, стационарно-неблагополучный по сибирской язве пункт, космические снимки, пространственные и ландшафтные признаки

Z.F. Dugarzhapova<sup>1</sup>, N.B. Badmaev<sup>2</sup>, V.E. Takaisvili<sup>1</sup>, E.V. Kravets<sup>1</sup>, B.Z. Tsydyпов<sup>3</sup>,  
O.N. Ochirov<sup>4</sup>, A.A. Ayurzhanayev<sup>3</sup>, B.V. Sodnomov<sup>4</sup>, B.B. Malatkina<sup>7</sup>, O.A. Zvereva<sup>5</sup>,  
O.P. Shakhayeva<sup>6</sup>, K.V. Bulutov<sup>7</sup>, S.S. Khankhareev<sup>8</sup>, M.V. Chesnokova<sup>1</sup>, S.V. Balakhonov<sup>1</sup>

## ECOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF TERRITORIES NON-WELFARE FOR ANTHRAX IN THE REPUBLIC OF BURYATIA

<sup>1</sup>Irkutsk Research Institute of Plague Control, <sup>2</sup>Institute of General and Experimental Biology, <sup>3</sup>Baikal Institute of Nature Management, <sup>4</sup>Institute of Physical Materials Science, <sup>5</sup>Buryatia Republic Scientific-Production Veterinary Laboratory, <sup>6</sup>Administration for Veterinary of the Republic of Buryatia, <sup>7</sup>Centre of Hygiene and Epidemiology for the Republic of Buryatia, <sup>8</sup>Administration of the Federal Service for Surveillance on Consumers' Rights Protection and Human Wellbeing for the Republic of Buryatia, Ulan-Ude, Russia

*Aim.* Analysis of results of ecological and microbiological examination of territories non-welfare for anthrax in territories of Barguzinsky and Kurumkansky districts of the Republic of Buryatia for justification of prophylaxis measures. *Materials and methods.* Space photographs were used and area and landscape signs of cattle grave sites were established. 174 samples of soil and 6 samples of bone remains of agricultural animals were obtained and studied. *Results.* Examination of 15 objects in 12 non-welfare for anthrax stationary points of the Republic of Buryatia was carried out in August 2014. A novel approach to detection of abandoned cattle grave sites, where DNA of *Bacillus anthracis* had been detected in samples, was developed and proposed. *Conclusion.* Ecological

properties of soils 2 districts of the Republic facilitate prolonged conservation of *B. anthracis* in the environment. Measures of sanitary clean-up of non-welfare territories, utilization of biological waste and decision on legal status of abandoned objects are recommended.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 22—28

Key words: anthrax, *Bacillus anthracis*, non-welfare for anthrax stationary point, space photography, area and landscape signs

## ВВЕДЕНИЕ

Республика Бурятия находится в зоне высокого риска заражения сельскохозяйственных животных (СХЖ) и человека сибиреязвенной инфекцией и относится к территориям сибирского региона с выраженным эпизоотолого-эпидемиологическим неблагополучием по сибирской язве. В соответствии с Кадастром СНП РФ (2005 г.) в республике учтено 369 стационарно-неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП), из них 10 (2,7%) в Баргузинском и 17 (4,6%) в Курумканском районах [3]. В перечне скотомогильников (в том числе сибиреязвенных) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, расположенных на территории Сибирского федерального округа (2012 г.), указаны 19 сибиреязвенных скотомогильников: 10 в Баргузинском и 9 в Курумканском районах. Данных о точном местоположении других скотомогильников (захоронений) нет.

Споры *B. anthracis* длительно сохраняют жизнеспособность в почве и устойчивы к различным неблагоприятным воздействиям. Для вегетации и сохранения *B. anthracis* почвенный субстрат выступает питательной средой, а его физико-химические и экологические свойства влияют на темпы размножения и сохранение возбудителя [4]. Известно, что черноземные почвы, аллювиальные отложения, лессовидные глины и суглинки степных и лесостепных зон способствуют росту и развитию в них возбудителя сибирской язвы [4, 5]. Наличие микроэлементов, таких как кобальт и марганец, а также определенное количество питательного субстрата, кислотность, влажность и температура почв оказывают влияние на выживание возбудителя сибирской язвы в окружающей среде [7].

Цель работы — оценка результатов экологического и микробиологического обследования неблагополучных по сибирской язве территорий в Баргузинском и Курумканском районах Республики Бурятия для обоснования профилактических мероприятий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен анализ действующих нормативно-методических документов по обустройству скотомогильников. В работе использованы космические снимки территорий Баргузинского и Курумканского районов Республики Бурятия, на основании которых установлены пространственные и ландшафтные признаки скотомогильников. Полевые работы в двух районах республики проведены в августе 2014 г. Отобраны 174 пробы почвы (глубина 5 — 40 см) и шесть проб костных останков СХЖ на территории 12 СНП и 15 объектов (пять предполагаемых мест сибиреязвенных захоронений, восемь мест падежа СХЖ в период эпизоотии 2008 г., биотермическая яма Беккари и несанкционированный полигон биологических отходов) в соответствии с МУК 4.2.2413-08

«Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы». Точки отбора фиксировали координатами GPS навигации.

Пробоподготовку и исследования проб почв, костных останков СХЖ проводили согласно требованиям МУК 4.2.24.13-08 в Испытательном лабораторном центре Иркутского научно-исследовательского противочумного института.

Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали тест-систему «АмплиСенс Bacillus anthracis-FRT» (ЦНИИЭ, Москва), для метода флуоресцирующих антител — два вида иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных (Ставрополь НИПЧИ и НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва).

Культурально-морфологические свойства выделенных культур, подозрительных на *B. anthracis*, проверяли на жидких (мясо-пептонный бульон и бульон Хоттингера, рН 7,2), полужидких (0,3% полужидкий агар) и плотных (казеиново-дрожжевой агар и агар Хоттингера, рН 7,2; кровяной агар с 5% дефибринированной крови барана; агар с добавлением 0,05 ЕД бензилпенициллина натриевой соли; 1% бикарбонатный агар) питательных средах. Бактериоскопию мазков проводили с окраской по Граму, Ожешко и Бурри-Гинсу на наличие спор и капсулы. Для оценки фаголизательности применяли бактериофаг Гамма А-26 (Ставрополь НИПЧИ).

Для проведения биопробы нативного материала и подозрительных на *B. anthracis* культур заражали внутрибрюшинно (0,5 мл) на одну пробу по три мыши обоих полов весом  $18 \pm 1$  г. Животных наблюдали в течение 10 суток, затем усыпляли хлороформом, вскрывали для дальнейшего бактериологического исследования. При работе с лабораторными животными руководствовались правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Токсичность и питательные возможности почвы изучали бактериологическим методом согласно методическим рекомендациям Иркутского противочумного НИИ «Изучение токсичности и питательных свойств проб почв стационарно-неблагополучных по сибирской язве пунктов и сибиреязвенных захоронений в отношении *B. anthracis*» (2013 г.). Токсичность почвы оценивали по наличию или отсутствию роста на чашках с агаризованной почвой культуры штамма *B. anthracis* СТИ-1 после инкубации при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Питательные возможности почвы определяли по срокам роста (от 1 до 7 суток) штамма *B. anthracis* СТИ-1 на голодном агаре с почвенным субстратом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При ретроспективном анализе заболеваемости установлено, что с 1914 по 2008 г. в двух районах республики сибирская язва отмечалась у 1043 голов животных. В Курумканском районе за 1934 — 1976 г. заболела 731 голова СХЖ, из них пали 564 (77,2%). Последние проявления сибирской язвы относятся к 1976 г. (совхоз «Гаргинский») и 1979 г. (с. Арзгун), когда заболели по одной голове КРС. Официальных данных о заболевших людях в Курумканском районе нет. В Баргузинском районе за 1914 — 2008 г. выявлено 312 голов СХЖ, больных сибирской язвой, из них пали 208 (69,9%), зарегистрированы 13 случаев сибирской язвы среди людей [6].

Крупная эпизоотия сибирской язвы с эпидемическими осложнениями возникла в июне 2008 г. в с. Баянгол и прилегающих местностях Баргузинского района. Ранее случаи заболевания в этих местах регистрировались в 1936 — 1939 и 1954 — 1958 г. Эпизоотия началась в середине июня с падежа овец (38

голов) на пастбище местности Тогсохо. Животных закапывали в месте падежа, затем трупы эксгумировали и кремировали с последующим захоронением на санкционированном скотомогильнике с. Баянгол. Всего за период с 15 июня по 18 июля 2008 г. в селах Баянгол и Соел, местностях Даахин и Жаргаланта заболели и пали 59 голов СХЖ, из них МРС — 51, КРС — 4, лошади — 3, свиньи — 4. После вынужденного убоя бычка 28 июня на заимке Асули заболели восемь человек. Заражение людей произошло контактным (75 %) и алиментарным (25 %) путями. Во время вспышки культура *V. anthracis* выделена из проб мяса бычка, ноздри и уха павших овец, почвы с мест убоя бычка и падежа лошади, а также ДНК *V. anthracis* обнаружена в почве несанкционированного захоронения трупов овец в местности Тогсохо [2].

Для выявления местоположения сибиреязвенных захоронений и заброшенных скотомогильников (СМ) нами разработан и предложен новый подход, основанный на анализе космических снимков с применением пространственных и ландшафтных признаков для их распознавания, который ранее был применен для координатного анализа и распознавания почв межгорных котловин (Еравнинская, Нерчинская и Ундино-Даинская) Забайкалья [1].

На первом этапе проведен анализ полученных космических снимков и общих нормативных требований к размещению и строительству сибиреязвенных скотомогильников на территории Российской Федерации согласно ВП 13.3.1320-96 «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. 6. Сибирская язва», СП 3.1.7.2629-10 «Профилактика



Расположение сибиреязвенных скотомогильников в Баргузинском и Курумканском районах Республики Бурятия и пространственные (справа в квадратах) характеристики заброшенного (вверху) и официального (внизу) объектов.

сибирской язвы», «Ветеринарно-санитарные правила сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов» № 13-7-2/469. По итогам работы создан «портрет 1 СМ» для выявления заброшенных скотомогильников.

На втором этапе проведены полевые исследования для установления достоверных пространственных (размер и форма скотомогильника, траншеи и рвы, формы биотермических ям) и ландшафтных (рельеф — сухой возвышенный участок, открытые степные необлесенные уголья) характеристик «19 СМ» с точными географическими координатами (рис.).

В Курумканском районе обследованы два сибиреязвенных захоронения в местностях Ухэрин-Гол, Зун Поле и шесть СНП (Арзгун, Барагхан, Гарга, Курумкан, Могойто, Сахули). Установлено, что растительность вблизи скотомогильников представлена сосновым лесом, остепненным лугом на дерновых лесных, аллювиальных остепненных, каштановых и лугово-каштановых почвах. Пробы почвы Курумканского района имели средние (50%), низкие (10%) и крайне низкие (40%) питательные свойства для выживания и сохранения *V. anthracis*. Исследования на сибирскую язву 86 проб почвы показали отрицательные результаты.

В Баргузинском районе обследованы шесть СНП (Соел, Усть-Баргузин, Максимиха и места эпизоотии сибирской язвы 2008 г. в Баянголе, Асули, Тогсохо). В местности Тогсохо обозначены и огорожены три участка, где регистрировался падеж овец, их промежуточное захоронение и остатки жилых построек.

Растительность Баргузинского района характеризовалась в основном сосновым лесом со степными и залежными сообществами. Преобладание низких (52%) и наличие крайне низких (20%) питательных свойств по отношению к *V. anthracis* в пробах почвы Баргузинского района обусловлено подзолами иллювиально-гумусовыми с дерновыми таежными кислыми перемежающимися с аллювиально-дерновыми типами почв. В аллювиально-дерновых почвах СНП Асули, Баянгол, Соел и Тогсохо отмечались средние (28 %) питательные свойства. Исследования показали, что пробы почвы обоих районов обладали слабощелочной реакцией (7,0 — 7,2) и не токсичны по отношению к возбудителю сибирской язвы.

На основе анализа космических снимков и установленных пространственных и ландшафтных признаков выявлены четыре заброшенных скотомогильника на территории Баргузинского района Республики Бурятия. Первое предполагаемое место сибиреязвенного захоронения расположено на равнине в местности Урда-Займка северо-восточнее (в 2 — 3 км) с. Соел. Второе — на территории выпаса и бывшего загона скота в местности Табхандай. Следующие два неучтенных объекта отмечены в местностях Гаагин и Даахин. В ложбине местности Гаагин по правой стороне дороги в направлении горы Ясаа обнаружен несанкционированный полигон биологических отходов, где разбросаны останки трупов КРС и МРС, истлевшие от времени и атмосферного воздействия. В местности Даахин отмечена заброшенная биотермическая яма Беккари, вокруг которой лежат костные фрагменты СХЖ. На момент обследования состояние объектов не соответствовало нормативным требованиям ВСП № 13-7-2/469.

В 88 пробах почвы и шести костных останков животных Баргузинского района при исследовании бактериологическим методом обнаружены подозрительные на *V. anthracis* культуры в семи пробах (6,2%): в почве частной усадьбы с. Баянгол, местности Табхандай, несанкционированного полигона биологических отходов в местности Гаагин, первого участка в местности



Тогсохо, рядом с ямой Беккари в местности Даахин, а также в одной пробе кости КРС в местности Гаагин. Принадлежность к виду *B. anthracis* выделенных культур не подтверждена в основных идентификационных тестах по совокупности культурально-морфологических свойств.

Несмотря на отрицательные результаты бактериологического исследования, в четырех (1,5%) пробах методом ПЦР обнаружена ДНК внехромосомных элементов *B. anthracis*. В пробе почвы, отобранной рядом с ямой Беккари в местности Даахин, выявлены специфические фрагменты генов плазмид токсино- (pXO1) и капсулообразования (pXO2). В почве усадьбы Тогмидон (2 пробы) и пробе кости крупного рогатого скота в местности Гаагин получен положительный амплификационный ответ на наличие сигнальной последовательности гена плазмиды токсинообразования (pXO1). Исследование нативных проб с положительными результатами ПЦР было продолжено бактериологическим и биологическим методами. В суспензиях органов биопробных животных культуры *B. anthracis* и ее ДНК не выделены.

Обнаружение в ПЦР специфических участков одного или двух генов ДНК *B. anthracis* в почве и костных фрагментах животных на фоне отсутствия токсичности и наличия средних питательных свойств почвы СНП Асули, Баянгол, Соел и Тогсохо могут косвенно указывать на возможность длительного сохранения возбудителя сибирской язвы в одной из своих жизненных форм или стадий развития в окружающей среде.

На основании полученных результатов муниципальным образованиям Баргузинского района рекомендованы следующие мероприятия: 1. санитарная очистка потенциально опасных территорий частной усадьбы в с. Баянгол, местности Табхандай, несанкционированного полигона сброса биологических отходов местности Гаагин, первого участка местности Тогсохо и вокруг ямы Беккари в местности Даахин Баргузинского района; 2. использование метода кремации при утилизации биологических отходов в соответствии с требованиями ВП 13.3.1320-96 «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. 6. Сибирская язва», СП 3.1.7.2629-10 «Профилактика сибирской язвы», ветеринарно-санитарных правил сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов № 13-7-2/469; 3. решение вопроса правового статуса заброшенных скотомогильников и их обустройство, содержание или ликвидация.

Обследование СНП на территории Баргузинского и Курумканского районов Республики Бурятия показало, что основными резервуарами *B. anthracis* остаются места сброса биологических отходов и сибиреязвенные захоронения.

Положительные результаты исследования методом ПЦР проб почвы и костных фрагментов животных из заброшенных скотомогильников свидетельствуют о возможности длительного сохранения сибиреязвенного микроба в окружающей среде и являются индикаторами потенциальной биологической опасности заброшенных объектов.

*Научно-исследовательская работа проведена в рамках проекта UNOPS (RPO GPO\_2014-071 (IWC-78317), финансируемого Глобальным экологическим фондом.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бадмаев Н.Б. Координатный анализ и распознавание почв. Улан-Удэ, Изд-во БГУ, 2015.
2. Дугаржапова З.Ф., Родзиковский А.В., Чеснокова М.В., Балахонов С.В., Болوشيнов А.Б., Ханхареев С.С. и др. Эпизоотолого-эпидемиологический анализ ситуации по

сибирской язве в Республике Бурятия (1995 — 2008 гг.). Эпидем. инф. бол. 2010, 6: 11-15.

3. Кадастр стационарно-неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации: Справочник. Б.Л. Черкасский (ред.). М., Интерсэн, 2005.
4. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники и диагностики, лечения и профилактики. Г.Г. Онищенко (ред.). М., ВУНМЦ МЗ РФ, 1999.
5. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М., Интерсэн, 2002.
6. Цыдыпов В.Ц., Галсанова Г.Д., Будаев Ю.Ж., Гармаев М.Ц. Эпизоотологический мониторинг сибирской язвы в регионе Центральной Азии. Улан-Удэ, Изд-во БГСХА, 2000.
7. Viator R.J., Rest R.F., Hildebrandt E., McGee D.J. Characterization of *Bacillus anthracis* arginase: effects of pH, temperature and cell viability on metal preference. BMC Biochem. 2008, 3: 9-15.

Поступила 10.03.16.

Контактная информация: Дугаржапова Зоригма Федоровна, к.м.н., 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р.т. (3952)22-01-35

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Е.Д.Савилов<sup>1,3</sup>, В.А.Астафьев<sup>1,3</sup>, М.К.Винокурова<sup>2</sup>, О.Б.Огарков<sup>1,4</sup>,  
С.Н.Жданова<sup>1</sup>, Г.И.Алексеева<sup>2</sup>, А.Ф.Кравченко<sup>2</sup>

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ТУБЕРКУЛЕЗУ В ДАЛЬНЕВОСТОЧНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ И РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

<sup>1</sup>Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, <sup>2</sup>Научно-практический центр «Фтизиатрия», <sup>3</sup> Государственная медицинская академия последиplomного образования, Иркутск; <sup>4</sup>Иркутский государственный университет

**Цель.** Комплексная оценка эпидемиологической ситуации по туберкулезу на территории Дальневосточного федерального округа (ДФО) и Республики Саха (Якутия). **Материалы и методы.** Использовались данные (заболеваемость, распространенность, смертность, генотипы *Mycobacterium tuberculosis*), характеризующие эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу за 2002 — 2014 гг. **Результаты.** Показано, что из всех округов РФ наиболее высокие показатели заболеваемости туберкулезом регистрировались в ДФО, а из всех территорий округа наиболее высокий ее уровень регистрировался в Приморском крае и Еврейской автономной области ( $166,3 \pm 6,2$  / $10000$  и  $166,1 \pm 4,8$  / $10000$  соответственно), а самые низкий — в Магаданской области и Якутии ( $76,0 \pm 2,1$  / $10000$  и  $78,6 \pm 1,9$  / $10000$  соответственно). В районах, располагающихся в арктической зоне республики Якутия, эпидемиологическая ситуация характеризуется как неблагоприятная. Кроме того, наиболее высокие показатели заболеваемости туберкулезом регистрировались среди малочисленных народов Севера. **Заключение.** Интегральная оценка основных эпидемиологических показателей позволяет проводить более глубокую сравнительную оценку эпидемиологической ситуации. С учетом такого подхода установлено, что в ДФО наиболее неблагоприятная ситуация по туберкулезу регистрируется в Приморском крае, а в Якутии имеет место наиболее благоприятная. Наблюдение за циркуляцией генотипов *M. tuberculosis* позволяет предположить возможность вытеснения генотипа S более агрессивными (трансмиссивными) субтипами генотипа Beijing.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 28—34

**Ключевые слова:** туберкулез, заболеваемость, смертность, интегральный показатель, генотипы микобактерий туберкулеза, Республика Саха (Якутия), Дальневосточный федеральный округ

E.D.Savilov<sup>1,3</sup>, V.A.Astafiev<sup>1,3</sup>, M.K.Vinokurova<sup>2</sup>, O.B.Ogarkov<sup>1,4</sup>,  
S.N.Zhdanova<sup>1</sup>, G.I.Alekseeva<sup>2</sup>, A.F.Kravchenko<sup>2</sup>

## EPIDEMIOLOGIC SITUATION FOR TUBERCULOSIS IN THE FAR EASTERN FEDERAL DISTRICT AND THE REPUBLIC OF SAKHA (YAKUTIA)

<sup>1</sup>Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems, <sup>2</sup>Scientific-Practical Centre «Phthisiatry», <sup>3</sup>State Medical Academy of Post-Graduate Education, Irkutsk; <sup>4</sup>Irkutsk State University, Russia

**Aim.** Complex evaluation of epidemiologic situation for tuberculosis on the territory of the Far Eastern Federal District (FEFD) and the Republic of Sakha (Yakutia). **Materials and methods.** Data (morbidity, prevalence, mortality, genotypes of *Mycobacterium tuberculosis*), characterizing epidemiologic situation for tuberculosis from 2002 — 2014 were used. **Results.** The highest parameters of tuberculosis morbidity from all the regions of Russian Federation were registered in FEFD, and from all the territories of the region the highest levels were registered in Primorsky Region and Jewish Autonomous Region ( $166.3 \pm 6.2$  ‰ and  $166.1 \pm 4.8$  ‰, respectively), and lowest — in Magadan Region and Yakutia ( $76.0 \pm 2.1$  ‰ and  $78.6 \pm 1.9$  ‰, respectively). In the regions, located in the arctic zone of the Republic of Yakutia, epidemiologic situation is characterized as non-welfare. Moreover, the highest parameters of morbidity for tuberculosis were registered among low-number peoples of the north. **Conclusion.** Integral evaluation of the main epidemiologic parameters allows to conduct a more in-depth comparative evaluation of the epidemiologic situation. Taking into account such an approach, in the FEFD the most non-welfare situation was established to be registered in Primorsky Region, and in Yakutia the most welfare occurs. Monitoring of the circulation of genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* allows to assume a possibility of displacement of genotype S by more aggressive (transmissible) subtypes of Beijing genotype.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 28—34

**Key words:** tuberculosis, morbidity, mortality, integral parameter, genotypes of *Mycobacterium tuberculosis*, Republic of Sakha (Yakutia), Far Eastern Federal District

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в Российской Федерации регистрируется стабилизация показателя заболеваемости туберкулезом населения страны [4]. Тем не менее, РФ входит в число государств с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией по туберкулезу с показателем заболеваемости за 2002 — 2014 гг. в  $77,8 \pm 2,2$  ‰, что значительно выше среднеевропейского уровня, составляющего  $37,0 \pm 0,3$  ‰ [9]. Наиболее неблагоприятная эпидемиологическая обстановка регистрируется в Дальневосточном федеральном округе (ДФО), где в среднем за указанный период заболеваемость превышала аналогичные данные по РФ почти в два раза. В ДФО входит Республика Саха (Якутия), РС(Я), являющаяся крупнейшим территориальным образованием России (более трех млн км<sup>2</sup>).

Цель работы — комплексная оценка эпидемиологической ситуации по туберкулезу на территории Дальневосточного федерального округа и Республики Саха (Якутия).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ретроспективный анализ эпидемиологической ситуации по туберкулезу в ДФО и Республике Саха (Якутия) за 2002 — 2014 гг. включал в себя оценку заболеваемости, распространенности и смертности с использованием официальных статистических материалов Роспотребнадзора по РС (Я) НПЦ «Фтизиатрия», Федерального Центра мониторинга противодействия распро-

странению туберкулеза Центрального НИИ организации и информатизации здравоохранения.

Для интегральной оценки эпидемиологической ситуации отдельных территориальных образований ДФО использованы показатели заболеваемости туберкулезом и связанные с ними следующие статистические критерии: ошибка средней, амплитуда многолетней заболеваемости и темп прироста ( $T_{пр}$ ) заболеваемости по выровненным данным. Алгоритм расчета интегрального показателя в виде коэффициента наглядности (Кн.) подробно изложен в ряде источников литературы [2, 8].

Статистическая обработка данных проведена с применением общепринятых параметрических и непараметрических критериев статистики. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принят равным  $p \leq 0,05$  [5].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка движения заболеваемости туберкулезом за рассмотренный многолетний период по федеральным округам России в направлении от запада к востоку выявила статистически значимый ( $<0,01$ ) ее рост в обозначенном направлении (табл. 1). Вместе с тем, для всех федеральных округов (кроме ДФО) имеет место снижение заболеваемости, носящее высоко достоверный характер ( $p < 0,01$ ). Таким образом, наиболее неблагоприятная эпидемиологическая ситуация в России отмечается для территории ДФО, для которой помимо самого высокого уровня заболеваемости, имеют место самые низкие показатели ее прироста, не имеющие при этом значимых значений.

При оценке напряженности эпидемического процесса туберкулеза на территориях отдельных административных образований ДФО выявлены выраженные различия в показателях многолетней заболеваемости (табл. 2).

Анализ представленных материалов свидетельствует, что заболеваемость туберкулезом на различных территориях ДФО варьировала в широких пределах от минимального в Магаданской области ( $76,0 \pm 2,1$  ‰) до максимального в Приморском крае ( $166,3 \pm 5,4$  ‰). За изучаемый период значимое снижение заболеваемости имело место в Якутии и Амурской области, а в Чукотском автономном округе имел место ее рост. На остальных административных образованиях не было выявлено достоверного уровня изменения в движении заболеваемости.

Учитывая, что заболеваемость является основным предметом эпидемиологических исследований, нами была проведена дополнительная ретроспективная оценка этого показателя для всех административных территорий ДФО. С этой целью использованы основные обобщающие статистические показатели, оценивающие как среднюю величину, так и весь динамический ряд этих

Таблица 1. Многолетняя динамика заболеваемости туберкулезом по федеральным округам Российской Федерации за 2002 — 2014 гг.

Территория	M (‰)	$\pm m$ (‰)	$T_{пр}$ (%)
Российская Федерация	77,8	9,0	-2,7
Центральный ФО	56,1	8,7	-3,7
Северо-Западный ФО	59,4	7,0	-2,9
Южный ФО	73,8	7,2	-2,1
Северо-Кавказский ФО	49,0	7,9	-10,3
Приволжский ФО	71,7	7,2	-2,5
Уральский ФО	96,2	10,3	-2,4
Сибирский ФО	122,6	11,3	-2,0
Дальневосточный ФО	128,0	12,2	-0,6

Таблица 2. Многолетняя динамика заболеваемости туберкулезом в ранжированном ряду административных территорий ДФО за 2002 – 2014 гг.

Территория	М ( <sup>0</sup> /0000)	±m ( <sup>0</sup> /0000)	Амплитуда (M <sub>max</sub> -M <sub>min</sub> )	T <sub>пр.</sub> (%)	Кн. (%)	Тенденция (р)	Ранг	
							М	Кн.
Магаданская обл.	76,0	2,1	25,0	-0,9	12,5	>0,05	1	2
Республика Саха (Якутия)	78,6	1,9	23,1	-2,2	6,3	<0,01	2	1
Камчатский край	87,8	2,3	27,3	0,1	37,5	>0,05	3	3
Сахалинская обл.	93,3	3,6	43,0	-0,5	46,9	>0,05	4	5
Чукотский АО	93,6	6,9	82,5	11,0	87,5	<0,01	5	8
Хабаровский край	125,5	3,1	37,4	-0,7	43,8	>0,05	6	4
Амурская обл.	134,9	6,3	76,0	-3,8	59,4	<0,01	7	6
Еврейская АО	166,1	4,8	58,1	-0,03	68,8	>0,05	8	7
Приморский край	166,3	6,2	74,8	0,1	87,5	>0,05	9	9

Таблица 3. Многолетняя динамика распространенности туберкулеза в ранжированном ряду административных территорий ДФО за 2002 – 2014 гг.

Территория	М ( <sup>0</sup> /0000)	±m ( <sup>0</sup> /0000)	Амплитуда (M <sub>max</sub> - M <sub>min</sub> )	T <sub>пр.</sub> (%)	Кн. (%)	Тенденция (р)	Ранг	
							М	Кн.
Республика Саха	202,5	7,2	86,1	-3,2	9,4	>0,05	1	1
Магаданская обл.	211,7	15,1	181	-6,8	40,6	>0,05	2	3
Камчатский край	231,6	9,4	113,3	-2,2	31,3	<0,01	3	2
Чукотский АО	253,7	11	132,4	2,8	53,1	>0,05	4	6
Хабаровский край	259,6	14,7	176,3	-4,6	43,8	>0,05	5	4
Сахалинская обл.	335,2	9,5	113,7	-2,1	43,8	<0,01	6	5
Приморский край	346,3	14,8	177,1	-2	68,8	>0,05	7	7
Еврейская АО	420,6	20	240,4	-3,2	78,1	>0,05	8	8
Амурская обл.	435,4	24,3	291,8	-4,6	81,3	<0,01	9	9

величин в совокупности, и расчет на этой основе коэффициента наглядности (Кн.).

Представленное распределение обобщенных показателей заболеваемости административных территорий, входящих в состав ДФО, существенно отличается от стандартных ее оценок (табл. 2), и на первое место (как наиболее благополучная территория) переместилась Республика Саха (Якутия). Это обусловлено тем, что помимо относительно невысокого интенсивного уровня заболеваемости имеет место минимальная величина ее ошибки, что свидетельствует о надежности оценки этого основного статистического показателя. Кроме того, отмечается минимальный размах многолетних показателей заболеваемости, что, в свою очередь, характеризует стабильность эпидемического процесса на рассматриваемой территории, а также имеет место выраженный отрицательный темп прироста заболеваемости ( $p < 0,01$ ). Таким образом, по каждому из четырех использованных основных статистических показателей в своем ранжированном ряду Якутия занимает первое или второе место среди всех территорий ДФО.

Соответствующие изменения имеют место и для других регионов округа. Например, Чукотский автономный округ переместился с пятого места на последнее ранговое место (девятое), что является более логичным, учитывая комплекс статистических показателей в совокупности, а именно: наибольший разброс показателей многолетней заболеваемости, что свидетельствует о нестабильном развитии эпидемического процесса и является неблагоприятным прогностическим признаком, а также имеет место выраженный положительный прирост заболеваемости.

Сопоставление многолетней динамики заболеваемости и распространенности туберкулеза в ДФО (табл. 2, 3) выявило опережающее снижение распространенности на всех административных территориях округа, что может свидетельствовать об улучшении качества лечения пациентов ДФО за рассматриваемый период времени.

Анализ распределения ранговых показателей распространенности туберкулеза показал, что, как и при анализе заболеваемости, имели место ранговые перемещения для отдельных территорий, входящих в ДФО. Например, если по показателю распространенности Чукотский автономный округ занимал четвертое место, то при комплексной оценке рассматриваемого показателя эта территория переместилась на шестое место. Здесь следует также отметить, что наиболее благоприятная эпидемиологическая ситуация, оцениваемая по распространенности туберкулеза, отмечается для территории Республики Саха (Якутия). Об этом свидетельствует как совпадение минимальных рангов при сравнительной оценке показателей распространенности, так и выраженное отличие Кн. территории Якутии (9,4%) от находящейся на втором ранговом месте территории Камчатского края (31,3%). Для остальных территорий округа коэффициенты наглядности отличались друг от друга не столь существенно и достаточно равномерно.

Еще одним важнейшим показателем, характеризующим эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу, является смертность от этого заболевания, многолетний показатель которой в Якутии ( $8,4 \pm 0,5 \text{ } ^0/0000$ ) значительно ниже, чем в России ( $17,2 \pm 1,0 \text{ } ^0/0000$ ) и в ДФО ( $26,4 \pm 1,4 \text{ } ^0/0000$ ), что является своеобразной особенностью исследуемой территории.

Выявлено существенное расхождение в основных эпидемиологических показателях туберкулеза между различными этносами, проживающими на территории республики Саха (Якутия). Наиболее высокие значения показателей заболеваемости туберкулезом зарегистрированы для малочисленных народов Севера ( $114,2 \pm 9,4 \text{ } ^0/0000$ ), далее в порядке снижения следуют якуты ( $81,6 \pm 2,5 \text{ } ^0/0000$ ) и менее всего в эпидемический процесс туберкулеза вовлеклись представители прочих этносов ( $56,8 \pm 1,5 \text{ } ^0/0000$ ).

Учитывая, что малочисленные народы Севера Республики Саха (Якутия) проживают преимущественно в ее арктической зоне, нами в рамках настоящего исследования было изучено сравнительное распределение заболеваемости туберкулезом на этой территории и на остальных районах Якутии без учета столицы Республики (г. Якутск), в которой проживает 31,3% населения.

В число районов, входящих в арктическую зону, включено 13 районов. Объединяющим признаком всех районов этого пояса является их выход к Северному Ледовитому океану с системой впадающих в него арктических рек. Учитывая крайне низкую плотность населения Республики Саха (Якутия) и для получения надежных выводов указанный анализ был осуществлен суммарно по всем 13 районам арктической территории. Установлено, что в этих



районах показатели заболеваемости были значимо выше, чем в прочих районах республики, по всем сравниваемым показателям: заболеваемости ( $84,8 \pm 4,2$  ‰/0000 и  $58,2 \pm 1,2$  ‰/0000 соответственно), распространенности ( $248,8 \pm 25,5$  ‰/0000 и  $152,1 \pm 10,3$  ‰/0000), смертности ( $9,0 \pm 2,2$  ‰/0000 и  $6,2 \pm 0,6$  ‰/0000).

Как следует из представленных данных, в арктических районах республики по среднемуголетним данным сложилась неблагоприятная эпидемиологическая обстановка. Для всех рассматриваемых показателей (заболеваемость, распространенность, смертность) в этих районах имеет место более высокий их уровень ( $P < 0,05$ ) по сравнению с прочими районами Якутии. Столь же неблагоприятная тенденция для арктической зоны имеет место и при количественной оценке движения всех эпидемиологических показателей. При значимой тенденции к снижению показателей заболеваемости и распространенности в целом на территории Якутии и в ее других районах, в арктической зоне не выявлено однонаправленного статистически значимого (рост или снижение) движения исследуемых показателей.

Несколько иная картина наблюдается для показателей смертности. Значимое ее снижение отмечено лишь для г. Якутск. Для остальных сравниваемых территорий не выявлено значимых тенденций к снижению уровня смертности. Тем не менее, имеющаяся однонаправленная тенденция на всех территориях является благоприятным прогностическим признаком.

Выявленные особенности распределения эпидемиологических показателей туберкулеза на территории Якутии могут быть, в частности, связаны и с особенностями циркуляции генотипов возбудителя этого заболевания. Проведенные нами исследования [1] показали, что на территории республики циркулируют два основных эпидемических варианта *Mycobacterium tuberculosis*, относящихся к семействам Пекин и S, которые имеют существенные отличия от их распространения на других территориях России.

В настоящее время генотип Пекин относится к наиболее агрессивным биологическим вариантам возбудителя туберкулеза, способным к пандемическому распространению [6, 7]. Однако если на территории России циркуляция этого генотипа в различных регионах, как правило, превышает 50% с трендом его увеличения на азиатскую часть страны, то на территории Якутии он колеблется от 42 до 46% [1]. На сопредельных территориях (Иркутская область, Республика Бурятия) величина этого показателя достигает практически 70%, а в Монголии равна 64%. При этом, как показали наши исследования [7, 10], у мужчин европеоидов с наличием -336G аллеля в случае развития инфекционного процесса, вызванного генотипом Пекин, риск летального исхода увеличивается почти в три раза. Таким образом, территориальные показатели смертности при туберкулезной инфекции напрямую связаны с распространенностью генотипа Пекин и генетическими особенностями человеческой популяции.

Важное место в популяции микобактерий туберкулеза в Якутии занимает также семейство S [11] с величиной кластера в 11,4%. На территориях других регионов (как в Европейской, так и Азиатской части России) находки этого семейства определяются лишь в единичных случаях. При этом кластер семейства S, ранее не рассматриваемый как эпидемический штамм в России, в Якутии был самым распространенным среди впервые выявленного туберкулеза с множественной лекарственной устойчивости (более 80%) [1].

Столь выраженные отличия в структуре основных генотипов *M. tuberculosis* от других территорий страны могут быть связаны как с удаленностью и

трудной доступностью Республики Саха (Якутия), что во многом определяет социальные особенности этой территории, так и с национальным составом этого региона, который может определять генотипические особенности популяций [3].

Ни в коей мере не подвергая сомнению основополагающую роль природных и социальных факторов в распространении туберкулеза, следует в контексте рассматриваемой проблемы обратить более пристальное внимание на изучение генетических признаков не только возбудителя, но и «хозяина» туберкулезной инфекции, что будет способствовать пониманию причин возникновения и распространения инфекционных заболеваний в глобальном ее понимании и дальнейшему развитию персонализированной медицины.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева Г.И., Астафьев В.А., Винокуров И.И., Винокурова М.К., Жданова С.Н., Зорина С.П., Корнилов А.Ф., Кравченко А.Ф., Линева Э.И., Огарков О.Б., Ощепкова Н.М., Павлов Н.Г., Савилов Е.Д., Яковлева Л.П. Туберкулез: эпидемиология и организация борьбы в современных условиях Крайнего севера (на примере Республики Саха (Якутия)). Новосибирск, Наука, 2015.
2. Астафьев В. А., Савилов Е. Д., Зоркальцева Е. Ю., Мальцева М. В., Огарков О. Б., Погорелов В. И. Оценка эпидемиологической ситуации по туберкулезу в Иркутской области. Сибирский медицинский журнал. 2011, 6: 199-202.
3. Винокурова М.К., Евдокимова Н.Е., Алексеева Г.И., Кравченко А.Ф., Савилов Е.Д., Огарков О.Б., Жданова С.Н. Основные генотипы *M. tuberculosis*, циркулирующих в Республике Саха (Якутия). Проблемы туберкулеза и болезни легких. 2015, 6: 38-39.
4. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Демина Ю.В., Дементьева Л.А., Папскина Н.Д., Фролова Л.А. Актуальные проблемы надзора за инфекционными болезнями в Российской Федерации. Журн. микробиол. 2014, 5: 13-24.
5. Савилов Е.Д., Астафьев В.А., Жданова С.Н., Заруднев Е.А. Эпидемиологический анализ: Методы статистической обработки материала. Новосибирск, Наука-Центр, 2011.
6. Савилов Е.Д., Синьков В.В., Огарков О.Б. Пекинский генотип *M. tuberculosis*. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010, 4: 50-53.
7. Савилов Е.Д., Синьков В.В., Огарков О.Б. Эпидемиология туберкулеза на Евро-Азиатском континенте: оценка глобального движения штаммов генотипа «Пекин». Иркутск, РИО ГБОУ ДПО ИГМАПО, 2013.
8. Сазыкин В.Л., Сон И.М. Комплексная оценка эпидемиологической ситуации по туберкулезу в России. Проблемы туберкулеза и болезни легких. 2006, 10: 65-69.
9. Туберкулез в Российской Федерации 2011 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. М., 2013.
10. Ogarkov O., Mokrousov I., Sinkov V. et al. Lethal combination of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and human CD209 —336G allele in Russian male population. Infect. Genet. Evol. 2012, 12 (4): 732-736.
11. Zhdanova S., Savilov E., Heysell S.K. et al. Primary multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in 2 regions, Eastern Siberia Russian Federation. Emerg. Infect. Dis: 2013, 10: 1649-1652.

Поступила 15.01.16

Контактная информация : Астафьев Виктор Александрович, д.м.н., проф., 664003, Иркутск, ул. Тимирязева, 16, р.т. (3952)33-34-25

О.В.Исаева<sup>1</sup>, В.С.Кичатова<sup>1</sup>, А.А.Карлсен<sup>1</sup>, С.А.Солонин<sup>1,2</sup>,  
П.Н.Дмитриев<sup>1</sup>, К.К.Кюрегян<sup>1</sup>, М.И.Михайлов<sup>1</sup>

## МНОГОЛЕТНЯЯ ДИНАМИКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С В МОСКОВСКОМ РЕГИОНЕ

<sup>1</sup>Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова, <sup>2</sup>НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, Москва

**Цель.** Определить распространенность генотипов вируса гепатита С (ВГС), циркулирующих в Московском регионе на протяжении последних десяти лет. **Материалы и методы.** Определяли наличие РНК ВГС, генотип и субтип вируса в собранных в 2006 — 2014 гг. образцах сыворотки крови от 2847 лиц с наличием ВГС-инфекции, имевших и не имевших в анамнезе употребление инъекционных наркотиков. **Результаты.** На протяжении последних 10 лет основными субтипами, циркулирующими в популяции, остаются 1b и 3a. Произошло заметное снижение циркуляции субтипа 1a среди потребителей инъекционных наркотиков (ПИН). Рекомбинантная форма вируса гепатита RF1\_2k/1b присутствует только среди данной группы риска и составляет 2% от общего количества субтипов как в 2007, так и в 2014 гг. В 2014 году выявлен генотип 4d, который не характерен для территории РФ. Среди ПИН в возрастных группах 20 — 29 и старше 40 лет доминирующим субтипом является 3a, в группе 30 — 39 лет основным — субтип 1b. Филогенетический анализ показал отсутствие определенных генетических вариантов субтипов 1b и 3a, характерных для ПИН, что свидетельствует о широкой циркуляции основных субтипов вируса во всей популяции инфицированных ВГС лиц. **Заключение.** Распределение основных генотипов/субтипов ВГС в общей популяции и среди ПИН в Москве остается стабильным на протяжении последних десяти лет.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 35—42

Ключевые слова: вирус гепатита С, генотип, потребители инъекционных наркотиков

O.V.Isaeva<sup>1</sup>, V.S.Kichatova<sup>1</sup>, A.A.Karlsen<sup>1</sup>, S.A.Solonin<sup>1,2</sup>,  
P.N.Dmitriev<sup>1</sup>, K.K.Kyuregyan<sup>1</sup>, M.I.Mikhailov<sup>1</sup>

## MULTI-YEAR DYNAMICS OF SPREAD OF HEPATITIS C VIRUS GENOTYPES IN MOSCOW REGION

<sup>1</sup>Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalites, <sup>2</sup>Sklifosovskiy Research Institute of Emergency Aid, Moscow, Russia

**Aim.** Determine spread of hepatitis C virus genotypes, circulating in Moscow Region over the last decade. **Materials and methods.** The presence of HCV RNA, genotype and subtype of the virus were determined in blood sera samples obtained in 2006 — 2014 from 2847 individuals with the presence of HCV infection, who had or did not have injectable drug administration in anamnesis. **Results.** 1b and 3a remain the main subtypes, circulating in the population over the last decade. A notable reduction of 1a subtype circulation took place among injectable drug users (IDU). Recombinant form RF1\_2k/1b of hepatitis virus is present only among this risk group and constitutes 2% of the overall amount of subtypes in both 2007 and 2014. Genotype 4d was detected in 2014, that is not typical for Russian Federation. Genotype 3a is dominant in IDU age groups of 20 — 29 and older than 40, and in the 30 — 39 group the main — subtype 1b. Phylogenetic analysis has shown the lack of certain genetic variants of subtypes 1b and 3a, characteristic for IDU, that gives evidence on a wide circulation of the main subtypes of the virus in the whole population of individuals, infected by HCV. **Conclusion.** Spread of main genotypes/subtypes of HCV in the overall population and among IDU in Moscow remains stable over the last decade.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 35—42

Key words: hepatitis C virus, genotype, injectable drug users

## ВВЕДЕНИЕ

Вирусом гепатита С (ВГС) инфицировано 2 — 3% населения мира, а внутривенное употребление наркотиков является основной причиной распространения инфекции в промышленно развитых странах [15]. Китай, Россия, США и Бразилия — основные страны, где сосредоточены многочисленные популяции потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) [20]. В 77 странах мира проживают около 10 млн ПИН, инфицированных вирусом гепатита С. Из них в 12 странах процент таких больных составляет более 80 от общего числа инфицированных [13]. Популяция ПИН в настоящее время является основным звеном передачи гепатита С (ГС) и в Европе, представляя собой главный фактор риска для распространения острых и хронических случаев заболевания ГС (33,3 и 83,7%, соответственно) [6, 12]. В связи с этим, меняется и путь передачи инфекции, замещая ятрогенную передачу, которая была основной в течение десятилетий [7, 17]. Проблемы, связанные с распространением инфекции ГС, продолжающаяся передача вируса среди потребителей инъекционных наркотиков обуславливают необходимость более глубокого понимания эпидемиологии ВГС в этой группе риска [15]. За последнее десятилетие число зарегистрированных больных хроническим гепатитом С (ХГС) в Российской Федерации увеличилось вдвое, в 2014 году заболеваемость ХГС достигла 40,90/0000 [1].

Учитывая высокую частоту бессимптомного хронического носительства инфекции, значительное количество случаев заболевания остается невыявленным. В РФ предположительно проживают 1,5 — 3 млн больных хроническим гепатитом С [4]. Учитывая тот факт, что предотвращение распространения возбудителя является основным направлением борьбы с данным заболеванием, особую актуальность в современных условиях приобретают популяционные исследования, направленные на определение распространенности и генотипического разнообразия ВГС.

Современная классификация ВГС включает 11 генотипов и более 300 субтипов вируса, при этом постоянно появляются сообщения о выявлении новых вариантов вируса [18].

Генетическое разнообразие ВГС связывают с высокой частотой мутаций, накапливаемых в геноме, и другим фундаментальным механизмом изменчивости — рекомбинациями, происходящими между геномами вирусов различных генотипов/серотипов. Единственным в настоящее время устойчивым рекомбинантным вариантом ВГС является штамм RF1\_2k/1b, наиболее часто выявляемый среди ПИН [5, 8]. Настоящее исследование посвящено выявлению различий в распространенности генотипов ВГС на протяжении последних 10 лет в Московском регионе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были исследованы образцы сыворотки крови от 2521 пациента с клинически подтвержденным хроническим гепатитом ХГС, наблюдавшихся в Гепатологическом центре Инфекционной больницы №1 г. Москва в 2007 — 2011 гг. (452 пациента в 2007 г., 481 пациент в 2008 г., 811 пациентов в 2009 г., 569 пациентов в 2010 г. и 208 пациентов в 2011 г.). Также исследовали образцы сыворотки крови ПИН, полученные в Московском областном центре СПИД (Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями) в 2006 — 2007 гг. (49 образцов), охарактеризованные по возрасту, наличию антител к вирусу гепатита С, уровню вирусной нагрузки, и образцы сыворотки крови анти-ВГС позитивных пациентов, получивших неотложную помощь

в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского в 2014 г., преимущественно ПИН (277 образцов). Все образцы были получены от инфицированных лиц, проживающих в Московском регионе, что позволило провести анализ распределения генотипов вируса гепатита С, циркулирующих в 2006 — 2011 и 2014 гг. на данной территории, всего в исследование были включены 2847 образцов.

Выделение вирусной РНК проводили по принципу обратимого связывания нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц с помощью набора для выделения ДНК/РНК из плазмы или сыворотки крови на магнитных частицах MP@SiO<sub>2</sub> («Sileks», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Определение РНК ВГС было проведено в ОТ-ПЦР с использованием праймеров к 5'-нетранслируемой области (5'-НТО). Праймеры для детекции: внешний прямой 5'- ctg tga gga act act gtc tt -3'; внешний обратный 5'- tat cag gca gta cca caa gg -3'; внутренний прямой 5'- ttc acg cag aaa gcg tct ag -3'; внутренний обратный 5'- acc caa cac tac tcg gct ag -3'. Условия первого раунда ПЦР были следующими: 94°C — 2 мин, затем 35 циклов денатурации при 94°C 30 сек, отжига при 55°C 30 сек и удлинения цепи при 72° 45 сек. Продукт первой ПЦР амплифицировали во втором раунде ПЦР при тех же условиях. Полученный продукт ПЦР величиной 207 нт определяли в электрофорезе в агарозном геле (2%) в ТВЕ.

Определение генотипа проводили во всех образцах, положительных по РНК ВГС. Для образцов от пациентов с ХГС, исследованных в 2007 — 2011 гг. (2521 образец), генотип ВГС определяли с помощью ОТ-ПЦР с генотип-специфичными праймерами, предложенными в [14]. Для остальных образцов генотип ВГС РНК в положительных образцах был определен с помощью анализа амплифицированных нуклеотидных последовательностей двух участков генома ВГС — полноразмерного core и фрагмента области NS5B. Обратную транскрипцию и амплификацию участков генома core и NS5B проводили с помощью наборов Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit и Fast Start High Fidelity PCR System (Roche) соответственно. Для амплификации участка core применяли следующие праймеры: внешний прямой 5'- gct-agg-cga-gta-gtg-ttg-gg -3'; внешний обратный 5'- acc-agt-tca-tca-tca-tat-ucc -3'; внутренний прямой 5'- gaa-agg-cct-tgt-ggt-act-gc -3'; внутренний обратный 5'- ttc-atc-atc-ata-ttc-cat-gcc-a -3'. Условия первого раунда ПЦР были следующими: 94°C — 5 мин, затем 35 циклов денатурации при 94°C 45 сек, отжига при 55°C 45 сек и удлинения цепи при 72° 90 сек, финальная элонгация — 72 °С 7 мин. Продукт первой ПЦР амплифицировали во втором раунде ПЦР при тех же условиях. Размер полученного фрагмента 1048 нт.

Для амплификации области NS5B генома ВГС использовали следующие праймеры: прямой 5'- tac-ctv-gtc-ata-gcc-tcc-gtg-aa -3'; обратный 5'- ttc-tcr-tat-gay-acc-cgc-tyt-ttt-ga -3'. Условия одностадийной ПЦР были следующими: 94°C — 5 мин, затем 40 циклов денатурации при 94°C 30 сек, отжига при 55°C 30 сек и удлинения цепи при 72° 45 сек, финальная элонгация — 72 °С 7 мин. Размер полученного фрагмента 389 нт.

Продукты амплификации вырезали из геля и выделяли из агарозы с помощью набора QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) и определяли первичную нуклеотидную последовательность на автоматическом секвенаторе 3130 Genetic Analyzer (ABI) с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Анализ нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы MEGA (версии 5.2). Филогенетическое дерево 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.

Достоверность различий значений показателей в сравниваемых группах оценивали с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони и  $\chi^2$  с поправкой Йетса с использованием программы GraphPadPrism (различия оценивались как достоверные при вероятности 95% —  $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты пятилетнего наблюдения (2007 — 2011 гг.) за структурой генотипов ВГС в Московском регионе продемонстрировали ее относительную стабильность — генотип 3a являлся доминирующим, его доля составляла в разные годы от 50,1 до 55,2%. Вторым по значимости на протяжении последних пяти лет был генотип 1b, его доля варьировала от 26,9 до 38,9%. Генотип 2a являлся минорным, частота его выявления варьировала от 5,1 до 8,7%. Необходимо отметить, что для каждого из генотипов (1b, 2a и 3a) различия между показателями частоты выявления в разные годы отсутствовали. Однако для генотипа 1a была выявлена тенденция к увеличению его доли в общей структуре генотипов ВГС, частота его выявления возросла с 1,1% в 2007 году до 7,7% в 2011 году ( $p < 0,05$ ). Коинфекция двумя разными генотипами стабильно оставалась редким явлением, на ее долю приходилось 1,1 — 2,9% в общей структуре генотипов ВГС. Частота выявления коинфекции разными генотипами ВГС не рассчитывалась отдельно для каждой комбинации генотипов, значение в процентах рассчитывали для всех случаев коинфекции.

Всего за 5 лет наблюдения не удалось определить генотип ВГС с помощью применявшейся ОТ-ПЦР с генотип-специфичными праймерами к участку соге генома ВГС в 39 образцах, доля таких нетипируемых образцов составляла от 1,1 до 2,9%. Для всех изолятов ВГС с неустановленным генотипом определяли нуклеотидную последовательность участков генома ВГС соге и NS5B для уточнения генотипа вируса. По данным филогенетического анализа, выполненного для соге и NS5B, из 39 нетипируемых изолятов ВГС 16 изолятов (41%) принадлежали генотипу 1b, 22 изолята (56,4%) — генотипу 3a, и в одном случае был выявлен рекомбинантный вариант ВГС 2k/1b. Таким образом, после уточнения генотипа для образцов, нетипируемых в ОТ-ПЦР с генотип-специфичными праймерами, структура генотипов ВГС не изменилась, доминировал генотип 3a, вторым по распространенности являлся генотип 1b. Неудача определения генотипа ВГС для 39 образцов в ОТ-ПЦР с генотип-специфичными праймерами была, по-видимому, связана не с низкой вирусной нагрузкой в данных образцах, а с нуклеотидными заменами в сайтах посадки праймеров. Анализ последовательности участка соге для нетипируемых изолятов ВГС подтвердил предположение о присутствии несовпадений нуклеотидов в сайтах посадки праймеров, применявшихся в ОТ-ПЦР для генотипирования ВГС.

Сравнительный анализ частоты выявления генотипов ВГС в 2006 — 2007 гг. среди ПИН и больших ХГС в 2007 г. по результатам генотипирования 49 изолятов продемонстрировал стабильную циркуляцию основных субтипов (1b и 3a). В группе ПИН их распределение было примерно одинаковым (38,8% и



36,7%, соответственно). Необходимо отметить, что субтип 1a среди потребителей инъекционных наркотиков выявлялся достоверно чаще, чем среди пациентов с ХГС в 2007 году (14,3 против 1,1%,  $p < 0,05$ ). Субтип 2a, коинфекция (1b+3a) среди ПИН являлись минорными, их доля составила 4% от общего числа. Рекомбинантная форма ВГС RF1\_2k/1b в 2007 г. была выявлена только среди ПИН с частотой 2%.

В 2014 году при исследовании 277 сывороток крови с наличием анти-ВГС 207 оказались положительными при определении РНК вируса (74,7%). Из них для сравнения были выбраны сыворотки крови 55 ПИН и 22 пациентов, положительных по анти-ВГС и РНК ВГС, но не имевших в анамнезе употребление наркотических препаратов (не-ПИН). Распределение выявленных субтипов в общем числе образцов в 2014 году было следующим: 1a — 6,5% (5/77); 1b — 42,9% (33/77); RF\_2k/1b — 1,3% (1/77), 4 — 1,3% (1/78), 3a — 48,0% (37/77). Основными субтипами, циркулирующими в 2014 г. в обеих подгруппах, являются, как и в предыдущие годы, 1b и 3a. В группе не-ПИН частота выявления субтипа 1b достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем среди ПИН. Основным отличием, характерным для группы ПИН, является наличие субтипа 1a (9%) и рекомбинантной формы RF1\_2k/1b (2%). Субтип 3a был выявлен в 51% случаев в 2014 году среди ПИН, что достоверно чаще, чем в 2006 — 2007 гг. в этой же группе риска и в группе не-ПИН в 2014 г. ( $p < 0,05$ ). В 2006 — 2007 гг. в группе ПИН отмечается достаточно широкое распространение субтипа 1a (14,3%), с заметным снижением аналогичного показателя в 2014 году до 9% в группе ПИН и отсутствием его в группе не-ПИН. Необходимо отметить, что субтип 2a и коинфекция (1b+3a) обнаруживались среди ПИН в 2006 — 2007 гг. Рекомбинантная форма вируса гепатита RF1\_2k/1b присутствует только среди ПИН и составляет 2% от общего количества субтипов как в 2006 — 2007 гг., так и в 2014 году. Только в группе не-ПИН выявлен генотип 4d (4%).

На основании данных анкет и медицинских карт ПИН были распределены на три возрастных группы: 20 — 29, 30 — 39 и более 40 лет. Анализ возрастной структуры инфицированных ВГС ПИН в 2006 — 2007 гг. и 2014 г. продемонстрировал следующие статистически значимые различия: доля инфицированных ВГС ПИН в возрасте 20 — 29 лет стала достоверно меньше в 2014 г. по сравнению с 2006 — 2007 гг. (26 и 47% соответственно,  $p < 0,05$ ). Доля инфицированных ВГС ПИН в возрасте 30 — 39 лет, наоборот, возросла с 39% (2006 — 2007 гг.) до 58% в 2014 г., доля лиц старше 40 лет увеличилась в 2014 г. в 8 раз (16% против 2%,  $p < 0,05$ ). Как в 2006 — 2007 гг., так и в 2014 г. среди ПИН в возрастных группах 20 — 29 и более 40 лет доминирующим субтипом являлся 3a, в группе 30 — 39 лет основным стал субтип 1b.

Для того чтобы выяснить, существуют ли в рамках каждого субтипа ВГС определенные группы штаммов вируса, характерные для изученных групп (ПИН и пациенты, не принимающих инъекционные наркотики), был проведен филогенетический анализ последовательностей ВГС, выделенных в 2014 году. Анализ нуклеотидных последовательностей участков core и NS5B генома ВГС показал, что выделенные в 2014 г. от ПИН и не-ПИН изоляты ВГС субтипов 1b и 3a не формируют отдельных монофилетических групп в зависимости от обследованной когорты пациентов. Такое распределение на филогенетическом дереве изолятов ВГС, выделенных от ПИН и не-ПИН, свидетельствует о широкой циркуляции штаммов основных субтипов вируса (1b и 3a) во всей популяции инфицированных ВГС лиц и об отсутствии определенных генетических вариантов субтипов 1b и 3a, приуроченных к определенным группам риска инфицирования.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Целью данной работы являлось определение изменения циркулирующих генотипов ВГС среди различных групп пациентов с ХГС (потребители инъекционных наркотиков, больные, не имеющие в анамнезе практики употребления наркотических препаратов) на одной территории (Московский регион) в течение последних 10 лет (с 2006 по 2014 гг.). Как известно, ПИН являются основной группой риска инфицирования ВГС, где данный вирус циркулирует интенсивно, поэтому внедрение и распространение новых для конкретной территории вариантов/субтипов вируса происходит зачастую именно в этой группе населения [13, 19]. Для получения необходимых сравнительных данных был определен спектр циркулирующих в популяции генотипов и субтипов и даны характеристики произошедшим за десятилетний период наблюдения изменениям.

Основными субтипами ВГС, циркулирующими в исследуемой когорте в течение последних 10 лет, являются 1b, 3a и 1a. Такие данные были описаны для территории РФ на протяжении и первого десятилетия века [9], [Калинина О.В. и др., 2012]. Минорные субтипы характерны для группы потребителей инъекционных наркотиков — это рекомбинантная форма RF\_2k/1b, 2a и сочетанная форма инфицирования (1b+3a) [Калинина О.В. и др., 2012].

Частота выявления субтипа 1b среди обследованных пациентов (42,9%) по отношению к группе ПИН и стабильная величина выявления данного субтипа у ПИН (38%) в течение последних 10 лет является свидетельством в пользу его широкого распространения в популяции. Ранее нами было показано, что среди больных ХГС в г. Москва доля субтипа 1b колеблется в пределах 26,9 — 38,9% [2]. В то же время, необходимо отметить, что частота выявления субтипа 1b достоверно выше в группе сравнения (55%), чем среди группы ПИН, как в 2006 — 2007 гг., так и в 2014 г. Это свидетельствует о том, что данный субтип наиболее характерен для популяции больных, не имеющих в анамнезе практики употребления инъекционных наркотиков [16].

Субтип 1a, а также субтип 3a, пришедший из Центральной Азии, продемонстрировали экспоненциальный рост в популяции в течение XX века со временем удвоения 7 — 8 лет [11]. При определении субтипа 3a в исследуемых группах было показано, что процент выявления его среди группы ПИН в 2014 году достоверно выше (51%), чем в группе сравнения (41%,  $p < 0,05$ ). Такие данные можно объяснить тем, что субтип 3a является доминирующим среди циркулирующих вариантов вируса в группе риска инфицирования ВГС. Его показатели возросли в 2014 году по сравнению с аналогичной группой 2006 — 2007 гг, по-видимому, из-за увеличения потребления наркотических средств [11].

В Москве в 2006 — 2007 гг. в группе ПИН отмечается достаточно широкая циркуляция субтипа 1a (14,3%) с заметным снижением аналогичного показателя в 2014 г. до 9% в группе ПИН и отсутствием его в группе сравнения (замещение субтипом 3a). Аналогичным образом, в общей группе пациентов с ХГС за период наблюдения нами был отмечен подъем распространенности субтипа 1a, который однако не получил дальнейшего распространения, на что указывает отсутствие его выявления в 2014 г. у лиц, не относящихся к ПИН. Необходимо отметить, что случаи коинфекции двумя генотипами (1b+3a) обнаруживались только среди ПИН в 2006 — 2007 гг. В общей популяции за период наблюдения минорные субтипы определялись в проценте от 1,3 до 6,5. По данным Калининой О.В., среди пациентов инфекционных отделений в Санкт-Петербурге, положительных по анти-ВГС и РНК ВГС, наблюдалось

сходное распределение субтипов [3]. Для сравнения, за 6-летний период в Швеции доминировали субтипы 3a (33%), 1a (41%), 2b (22%), субтип 1b выявлен только в 3% случаев, что свидетельствует об отсутствии смены основных циркулирующих субтипов [10].

Одной из основных особенностей вируса гепатита С является его генетическая неоднородность (11 основных генотипов, более 300 субтипов и множество квазивидов). Единственной жизнеспособной рекомбинантной формой вируса является штамм RF1\_2k/1b [8]. Основной его генетической и фенотипической особенностью является принадлежность структурных генов к субтипу 2k, а неструктурные гены принадлежат к субтипу 1b [5]. Данные об эпидемиологии этой рекомбинантной формы ограничены, в большинстве случаев этот вариант вируса выявляют среди ПИН [8]. Нам также удалось определить данную рекомбинантную форму ВГС только в образцах сывороток крови ПИН с частотой выявления в 2006 — 2007 и 2014 годах в 2% случаев.

Филогенетический анализ неструктурной области NS5B и области core генома ВГС не доказал существования каких-либо кластеров, соответствующих определенным группам риска. Нами не показано образования в рамках циркулирующих субтипов монофилетических групп, характерных только для ПИН. Такой профиль распределения вариантов ВГС оказался характерным не только для исследуемых групп в Московском регионе. Аналогичные данные получены для ПИН, проживающих в европейских странах [Calado R.A. et al., 2011]. Филогенетический анализ не показывает четкой кластеризации последовательностей, полученных от больных в разных странах, а скорее, демонстрирует перемешивание последовательностей ВГС из разных географических регионов, что подтверждает повсеместную международную циркуляцию изолятов ВГС.

Таким образом, данные, полученные в результате десятилетнего наблюдения за циркулирующими на территории Московского региона субтипами ВГС, позволяют сделать вывод об относительно стабильной структуре генотипов. Характерные для ПИН субтипы 1a и RF1\_2k/1b не вышли за пределы данной группы риска и не получили широкого распространения, соотношение доминирующих субтипов 1b и 3a остается неизменным.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-15-30039).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антонова Т. В. и др. В: Онищенко Г. Г., Жебрун А. Б. (ред.). Вирусные гепатиты в РФ 2010. МЗ РФ, Роспотребнадзор, Спб НИИЭМ им. Пастера, СПб, 2010.
2. Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов. М., Икар, 2013.
3. Калинина О.В. Молекулярно-генетические механизмы эволюции вируса гепатита С. Автореф. дисс. д.б.н. СПб, 2013.
4. Шахгильдян И. В., Михайлов М. И., Онищенко Г. Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). М., ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003.
5. Demetriou V.L., Kyriakou E., Kostrikis L.G. Near-full genome characterisation of two natural intergenotypic 2k/1b recombinant hepatitis C virus isolates. Adv. Virol. 2011, 2011: 710438.
6. Esteban J.I., Sauleda S., Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. J. Hepatol. 2008, 48: 148-162.
7. Hope V.D., Eramova I., Capurro D., Donoghoe M.C. Prevalence and estimation of hepatitis B and C infections in the WHO European Region: a review of data focusing on the countries outside the European Union and the European Free Trade Association. Epidemiol. Infect. 2014, 142: 270-286.

8. Kurbanov F., Tanaka Y., Chub E. et al. Molecular epidemiology and interferon susceptibility of the natural recombinant hepatitis C virus strain RF1\_2k/1b. *J. Infect. Dis.* 2008, 15, 198 (10): 1448-1456.
9. Kalinina O., Norder H., Vetrov T. et al. Shift in predominating subtype of HCV from 1b to 3a in St. Petersburg mediated by increase in injecting drug use. *J. Med. Virol.* 2001, 65: 517-524.
10. Lidman C., Norden L., Käberg M. et al. Hepatitis C infection among injection drug users in Stockholm Sweden: prevalence and gender. *Scand. J. Infect. Dis.* 2009, 41: 679-684.
11. Morice Y., Cantaloube J.F., Beaucourt S. et al. Molecular epidemiology of hepatitis C virus subtype 3a in injecting drug users. *J. Med. Virol.* 2006, 78 (10): 1296-1303.
12. Mühlberger N., Schwarzer R., Lettmeier B. et al. HCV-related burden of disease in Europe: a systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity, and mortality. *BMC Public Health.* 2009, 9: 34.
13. Nelson P.K., Mathers B.M., Cowie B. et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet.* 2011, 378: 571-583.
14. Ohno T., Mizokami M. Genotyping with type-specific primers that can type HCV types 1-6. *Methods in molecular medicine, Vol. 19: Hepatitis C protocols.* 1998, p: 159-164.
15. Pybus O.G., Cochrane A., Holmes E.C., Simmonds P. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect. Genet. Evol.* 2005, 5 (2): 131-139.
16. Rhodes T., Platt L., Maximova S. et al. Prevalence of HIV, hepatitis C and syphilis among injecting drug users in Russia: a multi-city study. *Addiction.* 2006, 101: 252-266.
17. Sarna A., Panda S. HCV in people who inject drugs: a neglected epidemic. *Lancet Infect. Dis.* 2015, 15: 4-5.
18. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus — 15 years on. *J. Gen. Virol.* 2004, 85 (11): 3173-3188.
19. Thorpe L. E., Ouellet L. J., Hershov R. et al. Risk of hepatitis C virus infection among young adult injection drug users who share injection equipment. *Am. J. Epidemiol.* 2002, 155: 645-653.
20. World Health Organization. A strategy to halt and reverse the HIV epidemic among people who inject drugs in Asia and the Pacific: 2010 — 2015, WHO Library Cataloguing, 2015.

*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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Д.В.Воробьев, В.С.Соломка, К.И.Плахова, Д.Г.Дерябин, А.А.Кубанов*

## **NG-MAST ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ NEISSERIA GONORRHOEAЕ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2012 — 2015 ГОДАХ**

Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии, Москва

*Цель.* Характеристика современных штаммов *N.gonorrhoeae* с использованием NG-MAST генотипирования (*Neisseria gonorrhoeae* multi antigen sequence typing), выявление доминирующих вариантов и анализ их территориального распределения. *Материалы и методы.* В работе использованы 440 штаммов *N.gonorrhoeae*, выделенных в 2012 — 2015 годах на территории 19 субъектов Российской Федерации. Генотипирование проводили на основе секвенирования переменных участков генов *porB* и *tbpB*. Идентификацию аллелей и сиквенс-типов осуществляли согласно [www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net). *Результаты.* Идентифицировано 172 NG-MAST генотипа, 100 из которых были описаны впервые. Преобладающими сиквенс-типами являлись 807, 1152, 1544, 5714 и 5941, типичные для нескольких субъектов Российской Федерации и некоторых стран ближнего зарубежья, а также впервые описанные сиквенс-типы 8583 и 9476, получившие исключительное распространение в регионах своего возникновения. Эпидемически значимые в странах

дальнего зарубежья сиквенс-типы 225, 1407 и 2992 в настоящем исследовании были представлены единичными изолятами. *Заключение.* Показано своеобразие и значительное генетическое разнообразие штаммов *N.gonorrhoeae*, циркулирующих на территории Российской Федерации, с характерной привязанностью некоторых NG-MAST генотипов к одному или нескольким регионам.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 42—51

Ключевые слова: *Neisseria gonorrhoeae*, молекулярная эпидемиология, NG-MAST генотипирование

*D.V.Vorobiev, V.S.Solomka, K.I.Plakhova, D.G.Deryabin, A.A.Kubanov*

## NG-MAST GENOTYPING OF *NEISSERIA GONORRHOEAE* STRAINS ISOLATED IN RUSSIAN FEDERATION IN 2012 — 2015

State Scientific Centre of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, Russia

*Aim.* Characteristics of contemporary strains of *N. gonorrhoeae* using NG-MAST genotyping (*Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing), isolation of dominating variants and analysis of their territorial distribution. *Materials and methods.* 440 strains of *N. gonorrhoeae* isolated in 2012 — 2015 in 19 subjects of the Russian Federation were used in the study. Genotyping was carried out based on sequencing of variable regions of *porB* and *tbpB* genes. Identification of alleles and sequence-types was carried out according to <http://www.ng-mast.net>. *Results.* 172 NG-MAST genotypes were identified, 100 of which — were described for the first time. 807, 1152, 1544, 5714 and 5941 were predominating sequence-types, typical for several subjects of the Russian Federation and some neighboring countries, as well as sequence-types 8583 and 9476 described for the first time, that were exclusively distributed in the regions of their emergence. Sequence-types 225, 1407 and 2992, that are epidemically significant in distant countries, were represented by single isolates in this study. *Conclusion.* A peculiar and significant genetic diversity of *N. gonorrhoeae* strains, circulating in the Russian Federation, with characteristic bond of several NG-MAST genotypes to one or several regions, was shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 42—51

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, molecular epidemiology, NG-MAST genotyping

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на устойчивую тенденцию к снижению заболеваемости гонореей в Российской Федерации (за последние 10 лет она сократилась на 49%, составив 23,5 случая на 100 тысяч населения) [1], данная инфекция сохраняет важную социальную значимость. Подобная ситуация делает актуальным создание и эффективное функционирование национальной системы эпидемиологического надзора за распространением инфекций, передаваемых половым путем, базирующейся на глобальных методических подходах [6].

Одним из современных и широко используемых инструментов эпидемиологического контроля за распространением гонококковой инфекции является NG-MAST генотипирование (*Neisseria gonorrhoeae* multi antigen sequence typing) [5]. В его основу положено сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов двух вариабельных генов: *porB*, кодирующего белок поринового канала, и *tbpB*, кодирующего бета-субъединицу трансферрин-связывающего белка [9]. По результатам секвенирования каждой из данных аллелей определяется их соответствие известной или впервые описываемой последовательности, на основании чего делается заключение о принадлеж-

ности изолята к определенному или ранее неизвестному молекулярному типу *N.gonorrhoeae*, регистрируемому в международной базе данных [www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net).

Использование данного подхода в США, Канаде и странах ЕС [3, 5, 10] позволило охарактеризовать распространение определенных сиквенс-типов гонококка по «эпидемическим сетям», определить основные генетические кластеры *N.gonorrhoeae*, а также оценить изменчивость возбудителя гонококковой инфекции в динамике эпидемического процесса. Одним из важных результатов подобных исследований явилось выявление сиквенс-типа 1407, проявляющего признаки мультирезистентности к антимикробным препаратам и в настоящее время получившего широкое распространение по всему миру [4, 5, 7].

На территории постсоветского пространства NG-MAST генотипирование ранее проводилось преимущественно на территории Российской Федерации [2, 11], а также в единичных исследованиях в Республике Беларусь [Lebedzeu F. et al., 2015] и Республике Казахстан [8]. При этом в наших предыдущих работах [2], [Kubanova A. et al., 2014] показано значительное генетическое разнообразие штаммов *N.gonorrhoeae*, циркулирующих на территории Российской Федерации, доминирующими из которых были сиквенс-типы 285, 228, 807, 1152, 5042, 5714, 5825 и др., отсутствующие или представленные единичными изолятами в странах Центральной и Западной Европы.

Полученные результаты подтвердили высокую дискриминирующую способность NG-MAST генотипирования, а также целесообразность его использования в системе пространственно-временного эпидемиологического мониторинга гонококковой инфекции. Однако опубликованные данные [Kubanova A. et al., 2014] ограничивались 2012 г. и не позволяли получить представление о характере распределения определенных сиквенс-типов в отдельных субъектах Российской Федерации, возможностях их трансграничного переноса, а также современном состоянии изменчивости *N.gonorrhoeae*, в том числе ведущей к возникновению новых NG-MAST генотипов.

В этой связи целью настоящего исследования явилось NG-MAST генотипирование штаммов *N.gonorrhoeae*, выделенных на территории Российской Федерации в 2012 — 2015 гг., с акцентом на выявление новых сиквенс-типов и анализом пространственного распределения ранее выявленных и впервые охарактеризованных молекулярных вариантов возбудителя гонококковой инфекции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 440 изолятов *N.gonorrhoeae* (2012 г. — 156 штаммов; 2013 г. — 160 штаммов; 2015 г. — 124 штамма), полученных из специализированных учреждений дерматовенерологического профиля 19 субъектов Российской Федерации. Первоначальный посев поступивших культур проводили на шоколадный агар с добавлением 1% ростовой добавки ISOVitalex и 1% селективной добавки VCAT (Becton Dickinson, США), после чего колонии микроскопировали и исследовали с использованием оксидазного теста. Окончательная верификация оксидазо-положительных грамтрицательных диплококков была проведена по совокупности биохимической активности с использованием карт идентификации NH на анализаторе VITEK 2 Compact (BioMérieux, Франция).

Выделение ДНК из чистых культур *N.gonorrhoeae* проводилось с исполь-

зованием набора «ДНК-Экспресс» (Литех, Россия). Амплификация вариабельных участков генов *rogV* и *tbpV* была проведена с использованием праймеров (ДНК-синтез, Россия), последовательность которых и условия амплификации указаны на сайте [www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net). Наличие продуктов амплификации подтверждали электрофорезом в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия и визуализировали на трансиллюминаторе (Bio-Rad, США) при 310 нм.

Полученные ДНК-фрагменты использовали в качестве матриц для повторного цикла амплификации, для чего их обрабатывали экзонуклеазой I (20 ед./мкл) и щелочной фосфатазой (1 ед./мкл) (Fermentas, Латвия), после чего проводили ПЦР с мечеными терминирующими нуклеотидами Big Dye Terminator v 3.1 Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, США). Полученные ампликоны разделяли методом капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) и первично анализировали с использованием программного обеспечения 3730 Data Collection v. 3.0 и Sequencing Analysis 5.3.1.

Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов генов *rogV* и *tbpV* сравнивали с известными последовательностями аллелей соответствующих генов и по комбинации номеров аллелей определяли сиквенс-тип штамма *N.gonorrhoeae*. При несовпадении результатов секвенирования с известными последовательностями их направляли в международную базу [www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net) для присвоения новых индивидуальных номеров аллелям и сиквенс-типам.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли в программе Statistica 10 (StatSoft, США), группируя региональные популяции *N.gonorrhoeae* с использованием модуля кластерный анализ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате секвенирования фрагментов генов 440 штаммов *N.gonorrhoeae*, циркулирующих на территории Российской Федерации в 2012 — 2015 годах, было идентифицировано 133 варианта аллели *rogV* и 54 варианта аллели *tbpV*, что подтверждает представления о высокой изменчивости первого из них [9], имеющего наиболее важное дискриминирующее значение при проведении масштабных молекулярно-эпидемиологических исследований [5]. Анализ нуклеотидных последовательностей названных генов позволил оценить 54 аллели *rogV* и 12 аллелей *tbpV* как ранее неизвестные, что явилось основанием для их депонирования в международной базе NG-MAST под новыми оригинальными номерами. Наиболее часто встречающимися в анализируемой выборке являлись аллели *rogV* 738 ( $n=35$ ) и *tbpV* 27 ( $n=107$ ).

Анализ комбинаций аллелей свидетельствовал о присутствии в составе анализируемой выборки 172 различных сиквенс-типов *N.gonorrhoeae*. При этом 72 NG-MAST генотипа (номера от 205 до 7435) были известны до проведения настоящего исследования, а 100 были описаны впервые, в связи с чем, в международной базе [www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net) им были присвоены оригинальные номера в диапазоне от 8099 до 13061 (за исключением сиквенс-типов 8579, 9834 и 11335, ранее выявленных в Нижнем Новгороде, Омске и Калуге соответственно). Доля впервые идентифицированных вариантов была достаточно высокой на протяжении всего периода исследования, составляя от 30% ( $n=20$ ) от всех NG-MAST генотипов в выборке 2012 года до 55% ( $n=45$ ) и 60,3% ( $n=35$ ) в 2013 и 2015 годах соответственно.

Таким образом, результаты проведенного исследования подтвердили представления о значительном генетическом разнообразии штаммов *N.gonorrhoeae*, циркулирующих на территории Российской Федерации [2], [Kubanova A. et al., 2014]. Возможно, одной из причин такого разнообразия являлась недостаточная изученность российской популяции гонококков, в связи с чем, каждая новая попытка анализа приводила к описанию «новых» NG-MAST генотипов, на самом деле являющихся длительно циркулирующими вариантами, ранее не попадавшими в поле зрения исследователей. Другой возможной причиной являлась объективно происходящая интенсивная дивергенция *N.gonorrhoeae*, действительно ведущая к появлению новых молекулярных вариантов возбудителя гонококковой инфекции.

С целью проверки этих предположений нами был проведен анализ численности штаммов *N.gonorrhoeae*, относящихся к «старым» и «новым» сиквенс-типам, а также частоты обнаружения одних и тех же NG-MAST вариантов на отдельных этапах проведенного исследования.

Полученный результат свидетельствовал о существовании принципиальных различий в подобных распределениях. Среди известных сиквенс-типов около половины штаммов (49,6%) были представлены значительными по численности (6 и более) кластерами, в то время как на долю одиночных штаммов (каждый NG-MAST генотип представлен только одним изолятом) приходилось только 12,6% культур. Напротив, среди впервые описанных сиквенс-типов преобладали одиночные штаммы (29,4%), а доля изолятов, входящих в значительные по численности кластеры, снижалась до 20,6%.

Среди 72 известных NG-MAST генотипов 7 обнаруживались на всех этапах проведенного исследования, а 14 выявлялись в течение двух лет. С другой стороны, впервые описанные сиквенс-типы наиболее типично (93 из 100) обнаруживались однократно, а на протяжении двух лет выявлялись только 7 из них, и полностью отсутствовали варианты, регистрируемые в течении всего проведенного исследования. Кроме того, 22 наиболее многочисленных «старых» сиквенс-типа (160 штаммов) присутствовали в двух и более субъектах Российской Федерации, в то время как среди впервые описанных вариантов типичным было присутствие только в одном регионе, а межрегиональное распространение получили только 4 сиквенс-типа (14 штаммов).

Тем самым, в отличие от первой попытки анализа генетического разнообразия *N.gonorrhoeae*, приведшей к выявлению 85,3% новых сиквенс-типов [Сидоренко С.В. и др., 2008] как следствия неизученности российской популяции гонококков, результаты настоящего исследования свидетельствуют в пользу объективного характера появления «новых» NG-MAST генотипов, непосредственно после своего возникновения имеющих относительно низкую численность, а также ограниченное распространение во времени и пространстве.

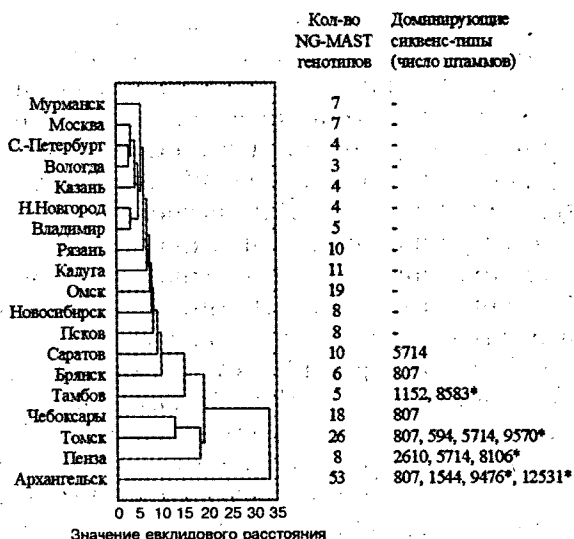
Среди наиболее многочисленных по числу штаммов NG-MAST генотипов лидирующее положение занимал известный сиквенс-тип 807, численность которого составила 10% от анализируемой выборки ( $n=44$ ). В нашем предыдущем исследовании [7] доля штаммов с данным сиквенс-типом составляла 7,9%, что указывает на его стабильно высокое присутствие в российской популяции *N.gonorrhoeae*, в настоящем исследовании обнаруживаемое на протяжении всего периода наблюдений в 5 из 19 обследованных субъектов Российской Федерации. Второй по численности сиквенс-тип 5714 ( $n=21$ ) также регистрировался в течение всего периода наблюдений и был выявлен в



6 из 19 обследованных регионов. Третьим по численности был «новый» сиквенс-тип 9476, при этом его распространение ограничивалось только одним регионом, в котором он был впервые описан в 2013 году (n=4) и к 2015 году там же получил достаточно широкое распространение (n=14). Другими наиболее многочисленными NG-MAST генотипами являлись 1152 (n=12; 2012-2013 гг.; 3 региона), 5941 (n=12; 2012—2015 гг.; 5 регионов), 1544 (n=12; 2013—2015 гг.; 1 регион), а также впервые описанный 8583 (n=10; 2012 г., 1 регион). Большинство названных эпидемически значимых сиквенс-типов были характерны именно для Российской Федерации, а некоторые из них (807, 1544, 5714) ранее обнаруживались в Беларуси и Казахстане, что свидетельствует об их представительстве на значительной части всего постсоветского пространства. С другой стороны, наиболее часто регистрируемые в странах Западной и Центральной Европы сиквенс-типы 225, 2992 [5], а также имеющий высокое эпидемиологическое значение сиквенс-тип 1407 [6] в обследованных регионах Российской Федерации были представлены единичными изолятами и к настоящему моменту в Российской Федерации не получили широкого распространения.

Проведенный в завершение данного исследования кластерный анализ (рис.), учитывающий представительство отдельных сиквенс-типов в региональных популяциях *N.gonorrhoeae*, позволил определить степень подобия между ними и на этой основе сформировать представления о современных тенденциях эпидемиологии гонореи.

Для 12 из 19 обследованных территорий типичным оказывалось существенное генетическое разнообразие выявляемых гонококков без значимого превалирования каких-либо сиквенс-типов (от 3 до 19 по отдельным регионам), представленных как известными, так и впервые выявляемыми NG-MAST вариантами. При этом подобная ситуация может объясняться внутривнутрироссийскими миграционными потоками, «размывающими» региональные популяции возбудителя гонококковой инфекции и обеспечивающими их распространение по всей территории Российской Федерации. Помимо Москвы и Санкт-Петербурга в данную группу входили ряд центральных (Калужская, Рязанская, Владимирская), северо-западных (Мурманская, Вологодская, Псковская), приволжских (Нижегородская, Республика Татарстан) и сибирских (Новосибирская, Омская) областей.



Результаты кластерного анализа, характеризующие взаимосвязь между популяциями *N.gonorrhoeae* в обследованных регионах Российской Федерации, а также данные о количестве выявляемых NG-MAST генотипов и доминирующих сиквенс-типах.

- Нет доминирующего сиквенс-типа; \* впервые выявленные сиквенс-типы.

С другой стороны, в 7 регионах были выявлены превалирующие NG-MAST генотипы, позволяющие сгруппировать популяции *N.gonorrhoeae* по степени их подобия (рис.). Так, для Брянской области и Республики Чувашия типичным являлось доминирование сиквенс-типа 807, для Саратовской области — 5417, а для Томской области одновременное значительное представительство сиквенс-типов 807, 5714 и 5941, каждый из которых относился к «старым» NG-MAST вариантам. С другой стороны, для 3 областей и республик оказывалась типичной ситуация одновременного доминирования известных и широко распространенных сиквенс-типов, а также одного или двух «новых» NG-MAST вариантов. В частности, в Пензенской области наряду с существенным представительством сиквенс-типов 2610 и 5714 до 15% анализируемой выборки занимали впервые описанные здесь сиквенс-типы 8106 и 9570. В Тамбовской области «новый» сиквенс-тип 8583 по частоте распространения даже занял лидирующее положение (41,7% от общей численности анализируемой выборки), в то время как на долю «старого» сиквенс-типа 1152 приходилось только 29,2%. Наконец, в Архангельской области также зафиксировано совместное присутствие «старых» (807, 1544) и «новых» (9476, 12531) сиквенс-типов, среди которых описанный нами в 2013 году NG-MAST генотип 9476 в динамике исследования занял в регионе доминирующее положение. Подобная ситуация может быть интерпретирована как результат одновременного действия двух тенденций, первая из которых определяется межрегиональным распространением эпидемически значимых «старых» NG-MAST генотипов, а вторая — возникновением «новых» сиквенс-типов, уже достигших значительной численности в исследуемых регионах, но еще не вышедших за их пределы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Методы молекулярной эпидемиологии получают все большее распространение в системе эпидемиологического надзора за распространением гонококковой инфекции на территории Российской Федерации, осуществляемого с 2007 — 2008 гг. [5, 6, 11]. Настоящее исследование является развитием этого направления: за период 2012 — 2015 гг. в 19 субъектах Российской Федерации собрана представительная выборка из 440 штаммов *N.gonorrhoeae*, охарактеризованных по NG-MAST генотипам.

Полученные результаты подтвердили ранее сформированные представления о высоком генетическом разнообразии популяции гонококков, циркулирующих на территории Российской Федерации [2], в настоящем исследовании отнесенных к 172 различными сиквенс-типам. Среди них наиболее выраженное эпидемиологическое значение, определяемое высокой частотой встречаемости, представительством в нескольких регионах, а также устойчивым присутствием на этапах проведенного исследования, имели NG-MAST генотипы 807, 1152, 1544, 5714 и 5941, ряд из которых также типичен для ближнего зарубежья [8], но спорадически встречается в странах Западной и Центральной Европы [5]. С другой стороны, получившие европейское или всемирное распространение эпидемические сиквенс-типы 225, 2992 и 1407 [5, 6], в настоящем исследовании были представлены единичными изолятами, что свидетельствует об отсутствии интенсивного трансграничного переноса *N.gonorrhoeae* из стран дальнего зарубежья. Одновременно результаты проведенного исследования указывают на существование интенсивной миграции

между обследованными субъектами Российской Федерации, приводящей к формированию в большинстве из них генетически разнообразных популяций *N.gonorrhoeae* без доминирующих сиквенс-типов или с преобладанием указанных выше эпидемически значимых NG-MAST генотипов.

Другим важным результатом проведенного исследования является выявление значительного количества ранее неизвестных сиквенс-типов *N.gonorrhoeae*, анализ количественного состава, сроков и ареалов обнаружения которых позволяет констатировать объективный характер происходящей внутривидовой дивергенции в популяции *N.gonorrhoeae*. При этом ряд из впервые описанных сиквенс-типов (8583, 9476 и др.) в динамике настоящего исследования получили достаточно широкое распространение в регионах своего возникновения, что указывает на их высокий эпидемический потенциал и в дальнейшем позволяет ожидать распространения соответствующих NG-MAST генотипов на другие территории Российской Федерации.

Отметим, что значительное количество ранее неизвестных сиквенс-типов в российской популяции гонококков отмечалось в целом ряде предыдущих работ [2, 11] и сохранялось на достаточно высоком уровне в динамике всего настоящего исследования. При этом преимущественная изменчивость по гену *porB*, кодируемый которым белок поринового канала принимает участие в транспорте антибиотиков [9], позволяет рассматривать подобное разнообразие в качестве одного из вероятных механизмов адаптации популяции *N.gonorrhoeae* в условиях сохранения эффективных средств антибиотикотерапии гонококковой инфекции.

Указанные обстоятельства, а также растущий риск возникновения неизлечимых форм гонореи, определяемой формированием дополнительных механизмов резистентности *N.gonorrhoeae* к используемым антимикробным препаратам, явились основанием для включения ВОЗ данного заболевания в проект Глобальной стратегии сектора здравоохранения на 2016 — 2021 гг. с приданием ей статуса стратегического приоритета (<http://www.who.int/>). В этой связи, представленная в настоящем исследовании национальная система пространственно-временного молекулярно-эпидемиологического мониторинга, основанная на NG-MAST генотипировании *N.gonorrhoeae*, должна стать одним из элементов этой стратегии, позволяющим своевременно выявлять и предупреждать распространение мультирезистентных вариантов возбудителя гонококковой инфекции.

*Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России на 2015 год и плановый период 2016 и 2017 гг. по Государственному контракту 114/БУ-2015-051 от 16.01.2015 г.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е., Богданова Е.В. Дерматовенерология в Российской Федерации. Итоги 2014 г. Успехи, достижения, основные пути развития. Вестник дерматологии и венерологии. 2015, 4: 13-26.
2. Соломка В.С., Чупров-Неточин Р.Н., Фриго Н.В., Кубанов А.А. Опыт молекулярного типирования и филогенетического анализа штаммов *N.gonorrhoeae* в Российской Федерации. Вестник дерматологии и венерологии. 2012, 2: 13-20.
3. Vuono S., Wu A., Hess D.C. et al. Using the *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence-typing method to assess strain diversity and antibiotic resistance in San Francisco, California. *Microb. Drug Resist.* 2012, 8 (5): 510-517.
4. Chen C.C., Yen M.Y., Wong W.W. et al. Tracing subsequent dissemination of a cluster of gono-

- coccal infections caused by an ST1407-related clone harbouring mosaic penA alleles in Taiwan. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013, 68 (7): 1567-1571.
5. European centre for disease prevention and control. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* — results from a pilot study 2010-2011. Stockholm, ECDC, 2012.
  6. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections. Geneva, WHO, 2012.
  7. Jeverica S., Golparian D., Maticic M. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Slovenia, 2006–12: rise and fall of the multidrug-resistant NG-MAST genogroup 1407 clone? *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, 69: 1517-1525.
  8. Kushnir A.V., Muminov T.A., Bayev A.I. et al. Molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Almaty, Kazakhstan, by VNTR analysis, Opa-typing and NG-MAST. *Infection Genetics Evolution.* 2012. 12: 570-576.
  9. Martin I.M., Ison C.A., Aanensen D.M. et al. Rapid sequencing-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J. Infect. Dis.* 2004, 189 (8): 1497-1505.
  10. Thakur S.D., Levett P.N., Horsman G.B. et al. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Saskatchewan, Canada: utility of NG-MAST in predicting antimicrobial susceptibility regionally. *Sex. Transm. Infect.* 2014, 90 (4): 297-302.
  11. Unemo M., Vorobieva V., Firsova N. et al. *Neisseria gonorrhoeae* population in Arkhangelsk, Russia: phenotypic and genotypic heterogeneity. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007, 13 (9): 873-878.

Поступила 04.03.16

Контактная информация: Дерябин Дмитрий Геннадьевич, д.м.н., проф., 107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6, р.т. (499)785-20-40

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Н.К.Ахматова<sup>1</sup>, В.Г.Хоменков<sup>1</sup>, Е.В.Волкова<sup>2</sup>, Э.А.Ахматова<sup>1,3</sup>,  
И.А.Семочкин<sup>1</sup>, Т.С.Перепанова<sup>2</sup>, В.В.Зверев<sup>1,3</sup>

## БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛИЗАТЫ *ESCHERICHIA COLI* СТИМУЛИРУЮТ ПРОДУКЦИЮ ДЕФЕНСИНОВ НЕЙТРОФИЛАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>НИИ урологии и интервенционной радиологии, Москва; <sup>3</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

**Цель.** Изучение влияния препарата микробного происхождения на основе лизата бактерий *Escherichia coli* (Уро-Ваксом) на продукцию дефенсинов (HNPI-3, лактоферрин — LF) и IgM/IgA у больных с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей (РИНМП). **Материалы и методы.** В исследование включены 40 женщин с РИНМП в возрасте от 18 до 68 лет, которые получали монотерапию препаратом «Уро-Ваксом» (бактериальный лизат 18 штаммов *E. coli*), и 26 здоровых женщин. Уровень дефенсинов и иммуноглобулинов в крови определяли с помощью твердофазной ИФА тест-системы (HNPI-3, LF, Elisa Kit, Hucult biotech, Netherlands; Serazym Human IgA, IgM, Germany). **Результаты.** У больных РИНМП отмечался сниженный уровень дефенсинов HNPI-3 и LF, свидетельствующий о хроническом течении воспалительного процесса в организме. Применение лизата *E. coli* приводило к нормализации данных показателей в сыворотке крови женщин. Уровень IgM и IgA в крови больных оставался в пределах нормальных значений, и применение бактериального лизата не влияло на эти показатели. **Заключение.** Препарат «Уро-Ваксом» на основе лизата бактерий *E. coli* обладает иммунокорректирующим действием при лечении больных РИНМП.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 50—55

Ключевые слова: рецидивирующая инфекция нижних мочевых путей, лизат *Escherichia coli*, HNPI-3, лактоферрин, иммуноглобулины

N.K.Akhmatova<sup>1</sup>, V.G.Khomenkov<sup>1</sup>, E.V.Volkova<sup>2</sup>, E.A.Akhmatova<sup>1,3</sup>,  
I.A.Semochkin<sup>1</sup>, T.S.Perepanova<sup>2</sup>, V.V.Zverev<sup>1,3</sup>

## BACTERIAL LYSATES OF *ESCHERICHIA COLI* STIMULATE PRODUCTION OF DEFENSINS BY PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Research Institute of Urology and Intervention Radiology, Moscow; <sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

**Aim.** Study effect of a microbial-origin preparation based on *Escherichia coli* bacteria lysate (Uro-Vaksom) on defensin production (HNP1-3, lactoferrin — LF) and IgM/IgA in patients with recurring infections of lower urinary tract (RILUT). **Materials and methods.** 40 women with RILUT aged 18 — 68 years, who received monotherapy with Uro-Vaksom (bacterial lysate of 18 *E. coli* strains), and 26 healthy women were included into the study. Levels of defensins and immunoglobulins in blood were determined using ELISA (HNP1-3, LF, Elisa Kit, Hycult biotech, Netherlands; Serazym Human IgA, IgM, Germany). **Results.** A reduced level of defensins HNP1-3 and LF was noted in patients with RILUT, that gives evidence on chronical course of the inflammatory process on the organism. Use of *E. coli* lysate resulted in normalization of these parameters in blood sera of women. IgM and IgA levels in blood of the patients remained within normal values, and use of the bacterial lysate did not affect them. **Conclusion.** Use of Uro-Vaksom based on *E. coli* bacteria lysate has immune-correcting effect during therapy of patients with RILUT.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 50—55

**Key words:** recurring infection of lower urinary tract, *Escherichia coli* lysate, HNP1-3, lactoferrin, immunoglobulins

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы отмечается неуклонный рост хронических воспалительных заболеваний, в том числе рецидивирующей инфекции нижних мочевых путей (РИНМП). Это, прежде всего, связано с появлением антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, в частности уропатогенной *Escherichia coli*, которая является основным возбудителем инфекции мочевых путей. Учитывая невысокую эффективность антибактериальной терапии РИНМП, большое значение приобретают методы, направленные на активацию защитных механизмов иммунной системы.

Показано, что *in vitro* препарат «Уро-Ваксом», который представляет лизат бактерий *E. coli*, стимулирует активность макрофагов и нейтрофилов, активизирует созревание дендритных клеток и увеличивает экспрессию адгезивных молекул нейтрофилами [1]. Поэтому представляет интерес изучение влияния данного препарата на некоторые звенья иммунитета у пациентов с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей.

Первым барьером на пути инфекции являются врожденные эффекторы иммунного ответа. Альфа-дефенсины HNP1-3 нейтрофилов человека принадлежат к семейству катионов трисульфид-содержащих микробицидных пептидов [5, 6]. Кроме микробицидной активности пептиды оказывают хемотаксическое, иммуномодулирующее и цитотоксическое действие и участвуют в защитной и воспалительной реакции [6].

Человеческий лактоферрин (LF) является гликопротеином, который обнаруживается во вторичных гранулах нейтрофилов. Кроме того, лактоферрин содержится в эпителии и большинстве жидкостей организма и секретах, он играет важную роль в иммунной системе, помогая бороться с инфекциями [2]. Данный гликопротеин обладает способностью связывать железо и обладает

широким спектром ферментативной активности: ДНКазы, РНКазы, АТФазы, фосфатазы и мальто-олигосахарид гидролазы. Лактоферрин является естественным антибактериальным, противогрибковым и противовирусным белком, антиоксидантом, а также обладает иммуномодулирующими свойствами [2].

Моча или грудное молоко здоровых лиц содержит ~ 30 нг/мл и ~ 500 мкг/мл LF, соответственно [7]. При инфекции концентрация LF может повыситься в 10 — 100 раз. В фекалиях здоровых людей может быть обнаружено ~ 1 мкг/г LF, в то время как в фекалиях пациентов с раком толстой кишки или воспалительными заболеваниями кишечника (IBD), уровень LF находится в диапазоне ~ 75 — 310 мкг/г. Фекальный лактоферрин можно использовать в качестве чувствительного и специфического маркера кишечного воспаления [8, 10]. Сочетание нескольких маркеров, таких как калпротектин, дефенсин, эластаза, МРО, I-FABP и MAdCAM может быть информативным для классификации IBD, а также для определения степени дифференцировки опухоли и для подтверждения ремиссии/ответа на лечение. Таким образом, человеческий лактоферрин является чувствительным неинвазивным инструментом для мониторинга активности заболевания [Jang Y.S. et al., 2014].

Цель работы — изучение влияния лизата бактерий *E. coli* (препарат «Уро-Ваксом») на продукцию дефенсинов (HNP1-3, LF) и IgM/IgA у больных с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А.Лопаткина и НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова с 2013 по 2015 гг. В исследование были включены 66 женщин, из них 40 женщин с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей в возрасте от 18 до 68 лет. Средняя продолжительность заболевания — 3,8 лет. В контрольную группу вошли 26 практически здоровых женщин.

В исследование не включали пациенток с циститом, имеющих сопутствующие хронические заболевания в фазе обострения, инфекции, передаваемые половым путем (хламидиоз, микоплазмоз, гоноррея, трихомониаз, папилломавирусная инфекция), а также беременных женщин. Все исследования выполнены после получения информированного согласия пациенток.

Оценка клинических и лабораторных данных помимо клинических анализов мочи и крови включала бактериологический анализ мочи и характеристику врожденного и адаптивного иммунного ответа в сыворотке крови до включения в исследование (исходный), через 1 — 6 мес. после начала лечения.

Бактериологические исследования проводились в микробиологической лаборатории Национального агентства по клинической фармакологии.

Ранее все пациентки получали антимикробную терапию. В основном, в качестве монотерапии пациентки использовали фосфомицина трометамол, норфлоксацин, фуразидин и ципрофлоксацин. Мы проводили монотерапию препаратом «Уро-Ваксом», который представляет лиофилизированный бактериальный лизат 18 штаммов *E. coli*.

«Уро-Ваксом» назначали утром натощак по одной капсуле в день (6 мг) в течение 90 дней в соответствии со стандартной схемой приема.

Забор крови для иммунологических исследований осуществляли натощак в утренние часы. Полученную сыворотку хранили при минус 70°C до проведения анализа. Гуморальный профиль иммунной системы определяли в от-

ношении эффекторов врожденного (HNP1-3, лактоферрин) и адаптивного (IgM, IgA) иммунитета.

Уровень дефенсинов и иммуноглобулинов определяли с помощью твердофазной ИФА тест-системы (HNP1-3, LF, Elisa Kit, Hycult biotech, Netherlands; Serazym Human IgA, IgM, Germany). Анализ результатов проводили с использованием программы Statistica 10. Статистическая значимость различий уровня цитокинов между группами оценивали непараметрическими методами исследования с помощью критерия Манна-Уитни. Статистически достоверными считали различия при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У больных с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей отмечался сниженный уровень HNP1-3 в 3,45 раза (32,23 пг/мл,  $p < 0,05$ ) по сравнению со здоровыми лицами (55,8 пг/мл). Через месяц после терапии препаратом на основе лизата *E. coli* отмечено резкое повышение уровня HNP1-3, превышающее значения нормативных показателей в 1,48 раза (82,9 пг/мл). Спустя еще месяц данный показатель был сопоставим с данными контрольной группы (здоровые женщины), и в течение последующих сроков наблюдения (6 мес.) уровень этого дефенсина еще оставался на уровне нормы.

Азурофильные гранулоциты нейтрофилов содержат человеческий нейтрофильный пептид (HNP)-1-4, который является высоко гомологичным [Bagoncelli S. et al., 2007]. Три важные дефенсина человека (HNP1-3) являются уникальными для нейтрофилов и составляют около 99% от общего количества дефенсинов этих клеток.

Активация нейтрофилов ведет к быстрому высвобождению дефенсинов [Agratti C. et al., 2009]. Только один клеточный тип, нейтрофилы, может быть источником HNP1-3 в плазме или других биологических жидкостях организма при инфекции и воспалении [Keller M. et al., 2012]. В нормальной плазме наблюдается низкий уровень (от недетектируемого уровня до 50 — 100 нг/мл) HNP1-3, в то время как при септических состояниях его уровень может возрасти до 10 мг/мл и даже более [Ramma W. et al., 2012]. Как видно из наших исследований, изначально низкий уровень данного дефенсина может свидетельствовать о наличии хронического воспалительного процесса в организме женщин и характеризовать истощенные ресурсы нейтрофилов, тем самым, отражая несостоятельность системы врожденного звена иммунитета.

В наших исследованиях у больных до лечения содержание лактоферрина было снижено в 2,75 раза (75,8 пг/мл) по сравнению с контролем (208,57 пг/мл), что также свидетельствовало о низкой функциональной активности лейкоцитов у женщин с рецидивирующей инфекцией нижних мочевых путей. Этот показатель после проведения курса лечения постепенно стал повышаться и только к 3 месяцу достиг уровня нормы. Однако через 5 месяцев он снова стал снижаться, и к 6 месяцу этот показатель был ниже показателей у здоровых лиц в 1,3 раза (150 пг/мл) ( $p < 0,05$ ). При этом следует отметить, что уровень LF в эти сроки у пациенток все же был значимо выше уровня исходных значений (до лечения) в 2 раза ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, у больных отмечался низкий уровень HNP1-3 и LF, свидетельствующий о наличии вялотекущего инфекционного процесса в организме с низкой функциональной активностью эффекторов врожденного иммунитета. Применение «Уро-Ваксома» приводило к нормализации данных показателей в сыворотке крови женщин.

Кроме указанных выше функций, лактоферрин играет ключевую роль в

поддержании кишечного микробаланса, тем самым, благоприятно влияя на желудочно-кишечный тракт. Лактоферрин секретируется в плазму нейтрофилами, и его содержание в плазме здоровых людей составляет около 190 — 500 пг/мл LF. Концентрация лактоферрина в плазме представляет собой положительное соотношение общего пула нейтрофилов и скорости их оборота. При воспалении лактоферрин высвобождается из вторичных гранул нейтрофилов во внеклеточную среду. Поэтому концентрация внеклеточного лактоферрина может быть использована в качестве индекса активации нейтрофилов [6].

Свойство лактоферрина связывать железо представляет важную антимикробную функцию [5]. Человеческий лактоферрин связывается с бактериальными продуктами при помощи своего высоко положительного заряженного аминокислотного остатка. При этом происходит гибель различных бактерий за счет индукции в них внутриклеточных изменений без влияния на проницаемость мембраны. Расщепление лактоферрина пепсином приводит к высвобождению лактоферрицина Н. Этот пептид обладает большей антимикробной активностью, чем его предшественник, и он может ингибировать классический, но не альтернативный путь комплемента [5].

Следующим этапом наших исследований явилось определение иммуноглобулинов в сыворотке крови больных с РИНМП. Около 40% молекул IgA обнаруживаются внутри сосудов. IgA нейтрализует вирусные антигены и бактериальные токсины, и в виде агрегированных молекул они активируют комплемент по альтернативному пути. IgA является преобладающим иммуноглобулином секреторных жидкостей. Секреторный IgA (sIgA) обладает протективной активностью в отношении слизистых оболочек [4]. IgA не может проникнуть через плацентарный барьер и, следовательно, отсутствует в крови плода. Сывороточная концентрация IgA у детей достигает уровня взрослых к 12-летнему возрасту [3].

IgM (в 75 — 80%) встречается внутри сосудов. Молекулы IgM являются полиреактивными и продуцируются как первичная В-клеточная реакция в ответ на антигенное стимулирование. В течение В-клеточного онтогенеза мономерный IgM появляется как первый В-клеточный рецептор (sIgM) [9].

IgM молекулы связывают комплемент гораздо более эффективнее, чем IgG, и активнее усиливают фагоцитоз дополнительно к их агглютинирующим и преципитатным свойствам. Фетальный IgM начинает продуцироваться на 20 неделе беременности. Концентрации IgM более 0,2 г/л в пуповинной крови характерны для внутриутробного инфицирования. Концентрация IgM у новорожденных составляет лишь 10% от значений взрослых, но они повышаются ко второму году жизни [9].

В наших исследованиях сывороточный уровень IgA и IgM у здоровых людей соответственно составил 423 и 466,5 мкг/мл, у больных до лечения — 708 и 463 мкг/мл, при этом существенной разницы в показателях после применения бактериального лизата не происходило. На 6 месяцев наблюдения содержание IgA находилось в пределах 727 мкг/мл, а IgM — 473,8 мкг/мл. Таким образом, у больных с РИНМП уровень IgM и IgA оставался в пределах нормальных значений, и применение «Уро-Ваксома» не изменяло эти показатели.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bessler W.G., vor dem Esche U., Zgaga-Griesz A. et al. Immunostimulatory properties of the bacterial extract OM-89 in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung*. 2010, 60 (6): 324-329.
2. Breakey A.A., Hinde K., Valeggia C.R. et al. Illness in breastfeeding infants relates to concentra-



tion of lactoferrin and secretory immunoglobulin A in mother's milk. *Evol. Med. Public. Health.* 2015, 20 (1): 21–31.

3. Brusca I. Overview of biomarkers for diagnosis and monitoring of celiac disease. *Adv. Clin. Chem.* 2015, 68: 1–55.
4. Gibbins H.L., Proctor G.B., Yakubov G.E. et al. SIgA binding to mucosal surfaces is mediated by mucin-mucin interactions. *PLoS One.* 2015, 20; 10 (3): e0119677.
5. Gupta I., Sehgal R., Kanwar R.K. et al. Nanocapsules loaded with iron-saturated bovine lactoferrin have antimicrobial therapeutic potential and maintain calcium, zinc and iron metabolism. *Nanomedicine (Lond).* 2014, 2: 1–26.
6. Hao J., Wang C., Yuan J. et al. A pro-inflammatory role of C5L2 in C5a-primed neutrophils for ANCA-induced activation. *PLoS One.* 2013, 13; 8 (6): e66305.
7. Koning N., Kessen S.F., Van Der Voorn J.P. et al. Human milk blocks DC-SIGN-pathogen interaction via MUC1. *Front. Immunol.* 2015, 13; 6: 112.
8. Lehmann F.S., Burri E., Beglinger C. The role and utility of faecal markers in inflammatory bowel disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2015, 8 (1): 23–36.
9. Panda S., Ding J.L. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* 2015, 1; 194 (1): 13–20.
10. Yamamoto T. The clinical value of faecal calprotectin and lactoferrin measurement in postoperative Crohn's disease. *United European Gastroenterol. J.* 2015, 3 (1): 5–10.

Поступила 20.01.16

Контактная информация: Ахматова Н.К., д.м.н.,  
105064, Москва, М.Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*В.Б.Полищук<sup>1</sup>, А.А.Рыжов<sup>1</sup>, М.П.Костинов<sup>1</sup>, О.О.Магаршак<sup>1</sup>,  
А.Д.Шмитько<sup>1</sup>, И.В.Лукачев<sup>1</sup>, Г.В.Васильева<sup>1</sup>, Д.А.Благовидов<sup>1</sup>,  
А.Г.Чучалин<sup>2</sup>, С.Н.Авдеев<sup>2</sup>, Н.А.Карчевская<sup>2</sup>*

## СОСТОЯНИЕ ПРОТИВОКОРЕВОВОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ ЛИСТА ОЖИДАНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЛЕГКИХ

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, <sup>2</sup>НИИ пульмонологии, Москва

**Цель.** Определение напряженности иммунитета к кори у пациентов листа ожидания трансплантации легких. **Материалы и методы.** Исследовали уровень IgG к вирусу кори в сыворотках крови 80 взрослых пациентов (средний возраст  $35,8 \pm 11,4$  лет) листа ожидания трансплантации легких, ранее не болевших корью. Определение уровня IgG к вирусу кори проводили методом ИФА с использованием стандартного набора реагентов фирмы «Вектор-Бест» (ВекторКорь-IgG). **Результаты.** Защитный уровень IgG к вирусу кори (более 0,18 МЕ/мл) был зарегистрирован у 83,8% обследованных пациентов. Средний уровень противокоревых антител был в пределах защитных значений и составил 1,53 МЕ/мл (95% доверительный интервал 1,17 — 1,89). В большинстве проанализированных образцов (55,2%) был зарегистрирован средний уровень (от 1 до 5 МЕ/мл) противокоревых антител. Была выявлена положительная корреляция между значениями антител и возрастом пациентов ( $r=0,43$ ). Не было выявлено зависимости между уровнем антител и проводимой ранее гормональной и цитостатической терапией. **Заключение.** Пациенты листа ожидания трансплантации солидных органов являются группой риска по развитию тяжелого течения коревой инфекции, что диктует необходимость проведения вакцинации в короткие сроки до или после постановки в лист ожидания.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 55–60

**Ключевые слова:** вакциноуправляемые инфекции, корь, трансплантация легких, антитела к вирусу кори, иммунокомпрометированные пациенты

V.B.Polischuk<sup>1</sup>, A.A.Ryzhov<sup>1</sup>, M.P.Kostinov<sup>1</sup>, O.O.Magarshak<sup>1</sup>,  
A.D.Shmitko<sup>1</sup>, I.V.Lukachev<sup>1</sup>, G.V.Vasileva<sup>1</sup>, D.A.Blagovidov<sup>1</sup>,  
A.G.Chuchalin<sup>2</sup>, S.N.Avdeev<sup>2</sup>, N.A.Karchevskaya<sup>2</sup>

## CONDITION OF ANTI-MEASLES IMMUNITY IN PATIENTS ON WAITING-LIST FOR LUNG TRANSPLANTATION

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Research Institute of Pulmonology, Moscow, Russia

*Aim.* Determination of intensity of immunity against measles in patients on waiting-list for lung transplantation. *Materials and methods.* IgG levels against measles virus were studied in blood sera of 80 adult patients (mean age  $35.8 \pm 11.4$  years) on waiting-list of lung transplantation, without history of this disease. Determination of IgG levels against measles virus was carried out by ELISA using a standard kit from «Vektor-Best» (VectoMeasles-IgG). *Results.* Protective level of IgG against measles virus (above 0.18 IU/ml) was registered in 83.3% of examined patients. Mean level of anti-measles antibodies was within protective values — 1.53 IU/ml (95% confidence interval 1.17 — 1.89). Medium level of anti-measles antibodies (1 — 5 IU/ml) was registered in most of the analyzed samples (55.2%). A positive correlation between values of antibodies and age of patients ( $r=0.43$ ) was detected. Dependence between levels of antibodies and previously executed hormonal and cytostatic therapy was not detected. *Conclusion.* Patients on waiting-list of solid organ transplantation are a group of risk for development of severe course of measles infection, that dictates the necessity of execution of vaccination at short terms before or after registration on the waiting-list.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 55—60

Key words: vaccine-controlled infections, measles, lung transplantation, anti-measles antibodies, immune-competent patients

### ВВЕДЕНИЕ

Для пациентов, которым планируется трансплантация легких, профилактика вакциноуправляемых инфекций (ВУИ) является важной и неотъемлемой частью предупреждения инфекционных осложнений в целом. У данного контингента больных отмечается более тяжелое и осложненное течение таких ВУИ как корь, ветряная оспа, грипп, инвазивные формы пневмококковой инфекции. Это обусловлено тем, что в лист ожидания трансплантации включаются больные с тяжелой бронхолегочной патологией, у которых исчерпаны другие методы лечения, в том числе, обладающие иммуносупрессивным действием, и данный контингент пациентов необходимо расценивать как иммунокомпрометированных.

Оценка вакцинального статуса кандидатов на трансплантацию с последующим составлением индивидуального графика вакцинации с целью достижения максимального уровня защиты против ВУИ до проведения ТСО является одной из важнейших задач предтрансплантационного периода.

Вопрос о необходимости проведения вакцинации пациентов с тяжелой органной патологией должен решаться как можно раньше после их постановки в лист ожидания трансплантации. Прогрессирование основного заболевания и, как следствие, интенсификация терапии в предтрансплантационном периоде может отрицательно сказываться на способности иммунной системы пациента к выработке адекватной защиты против вирусных и бактериальных инфекционных агентов [10]. Проводимая после трансплантации пожизненная иммуносупрессивная терапия с целью предупреждения отторжения аллографта вызывает дальнейшее угнетение иммунной системы [10]. Одновременно с

этим у пациентов, включенных в лист ожидания, важным моментом является определение уровня специфических антител к ВУИ, так как даже проведенная в полном объеме вакцинация не гарантирует их значений на протективном уровне, особенно у пациентов с длительным анамнезом и прогрессированием основного заболевания.

Хотя достигаемый уровень антител против вакциноуправляемых инфекций у кандидатов на трансплантацию часто бывают субоптимальными, их уровень обычно еще более снижен, если вакцина вводится в посттрансплантационном периоде. Кроме этого, в посттрансплантационном периоде более сильный антительный ответ отмечается на введение бустерной дозы вакцины, чем если пациент прививается впервые [6].

Несмотря на то, что вакцинопрофилактика является наиболее эффективным способом предупреждения ВУИ и их осложнений, необходимо отметить низкий охват вакцинацией данного контингента больных как взрослых, так и детей, на что указывают публикации многих авторов [7, 9, 12]. Так, согласно [7], на момент проведения ТСО вакцинация в полном объеме была проведена только у 71% детей, несмотря на тот факт, что они находились под постоянным наблюдением в профильных медицинских центрах. Среди причин низкого охвата вакцинацией отмечают акцентирование внимания на лечении основного заболевания, частые госпитализации пациентов. Кроме того, лечащие врачи часто расценивают состояние пациента как тяжелое для проведения вакцинации [7]. Низкий охват вакцинацией отмечается также среди взрослых пациентов, например, против пневмококковой инфекции [12]. Часто пациенты недостаточно информированы о необходимости проведения вакцинации [9].

Особое внимание уделяется вакцинации в предтрансплантационном периоде живыми вакцинами. Необходимо учитывать, что заболевание такими вирусными инфекциями, как корь или ветряная оспа, на фоне проведения иммуносупрессивной терапии может принимать очень тяжелое течение [7]. Проведение ТСО рекомендуется не ранее чем через 1 — 2 месяца после введения живых вакцин [10, 11]. В посттрансплантационном периоде их введение не рекомендуется, так как это может привести к безудержной пролиферации аттенуированного штамма [7]. В связи с этим, вакцинацию против кори, краснухи, эпидемического паротита и ветряной оспы необходимо проводить как можно раньше после постановки пациента в лист ожидания трансплантации.

Важно отметить, что в настоящее время отмечается ухудшение эпидемической ситуации по кори в мире и России. Массовая вакцинация против коревой инфекции, которая проводилась в рамках программы элиминации кори, способствовала значительному снижению инфекции. Однако в последние годы во многих регионах Европы и России были отмечены крупные вспышки коревой инфекции [5, 8]. При этом отмечается рост заболеваемости среди взрослых с преобладанием среднетяжелых и тяжелых форм заболевания [5]. Цель работы — определение напряженности иммунитета к кори у пациентов листа ожидания трансплантации легких.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали уровень антител к вирусу кори в сыворотках крови 80 пациентов (средний возраст  $35,8 \pm 11,4$  лет) с тяжелой бронхолегочной патологией, включенных в лист ожидания трансплантации легких, ранее не болевших корью. Определение уровня IgG к вирусу кори проводили методом ИФА с использованием стандартного набора фирмы «Вектор-Бест» (ВектоКорь-IgG).

Результат анализа считали положительным, если концентрация IgG к вирусу кори в исследуемом образце была равна или превышала 0,18 МЕ/мл. Уровень антител в диапазоне от 0,18 МЕ/мл до 1 МЕ/мл расценивался как низкий, от 1 МЕ/мл до 5 МЕ/мл и более 5 МЕ/мл — как средний и высокий соответственно. Забор крови проводился в стационарных или амбулаторных условиях.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 7 для непараметрических выборок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень противокоревых антител был определен в сыворотках крови 80 пациентов с различными заболеваниями бронхолегочной системы в возрасте от 17 лет до 65 лет, которые проходили обследование по поводу включения в лист ожидания трансплантации легких. Среди обследованных больных было 46 (57,5%) женщин и 34 (42,5%) мужчины. У 28 (35%) пациентов имели место обструктивные заболевания легких, у 9 (11,3%) больных — сосудистые заболевания легких, у 14 (17,5%) человек — муковисцидоз и у 29 (36,3%) больных — рестриктивные заболевания легких; 43 (53,8%) пациента до проведения обследования не получали гормональную и цитостатическую терапию; 24 обследованным (30%) ранее проводилась только гормональная, а 13 — (16,3%) гормональная и цитостатическая терапия.

Исследование сывороток крови пациентов на наличие IgG к вирусу кори показало, что из 80 обследованных 13 (16,3%) человек были серонегативными. Среди 67 (83,8%) серопозитивных пациентов низкий уровень антител к вирусу кори был выявлен у 25 (37,3%) пациентов, средний и высокий — у 37 (55,2%) и 5 (7,5%) обследованных соответственно.

Сравнительный анализ не выявил достоверных различий в уровне антител (АТ) к вирусу кори у пациентов различных нозологических групп ( $p=0,28$ ).

Детальный анализ полученных результатов показал, что наибольшее число серонегативных пациентов было отмечено в молодых возрастных группах — 22,2% в группе больных с сосудистыми заболеваниями легких и 28,6 в группе больных муковисцидозом. Среди пациентов с обструктивными и рестриктивными заболеваниями серонегативных к вирусу кори было значительно меньше — 14,3 и 10,3% соответственно. Была выявлена положительная корреляция между уровнем противокоревых антител и возрастом обследованных пациентов ( $r=0,43$ ).

Во всех группах обследованных, кроме группы пациентов с муковисцидозом, преобладали больные со средним уровнем противокоревых антител (от 44,4 до 55,2%). Самый большой процент обследованных (35,7) с низким уровнем антител был в группе больных муковисцидозом.

Исследование уровня антител к вирусу кори в зависимости от назначенной терапии показало, что в группе пациентов, не получавших гормональную и цитостатическую терапию, средний уровень антител составил 1,47 МЕ/мл (95% доверительный интервал 0,98 — 1,96), а в группе пациентов, получавших ранее иммуносупрессивные препараты — 1,6 МЕ/мл (95% доверительный интервал 1,06 — 2,14).

Сравнительный анализ не выявил статистически значимых различий в уровне противокоревых антител между группами пациентов, получавших в анамнезе только гормональную терапию и без нее и тех обследованных, которым ранее проводилась как гормональная, так и цитостатическая терапия ( $p=0,34$ ).

В создавшихся условиях неблагоприятной эпидемической ситуации по

возникновению коревой инфекции среди населения, особенно среди подростков и взрослых, в том числе ранее привитых, сохраняется риск заболевания у пациентов, страдающих различными хроническими заболеваниями, в том числе у кандидатов на трансплантацию легких.

В проведенном исследовании процент серопозитивных к вирусу кори пациентов составил 83,8%, что сопоставимо с аналогичными данными у здоровых лиц [4]. При этом, по данным других авторов удельный вес серонегативных к вирусу кори лиц может достигать более 30% [2]. Полученные результаты не достигают показателя критерия эпидемиологического благополучия при кори, при котором число серонегативных лиц не должно превышать 7% [3]

Несмотря на отсутствие различий в сохранении противокоревых антител среди кандидатов на трансплантацию легких и здоровых, в процессе исследования была выявлена положительная корреляция между значениями противокоревых антител и возрастом пациентов. В ряде других исследований также было отмечено, что среди здорового взрослого населения серонегативными к вирусу кори в большинстве случаев являются молодые люди. Так, по данным [4], среди 94 здоровых обследованных серонегативные были выявлены только в возрастной группе 20 — 29 лет. Аналогичные результаты отмечены и среди женщин детородного возраста [1]. Обращает на себя внимание тот факт, что наибольшее число серонегативных лиц было зарегистрировано в группе пациентов с муковисцидозом, которые находятся в большинстве случаев под многолетним медицинским наблюдением.

Следовательно, группой восприимчивых к вирусу кори являются как здоровые, так и пациенты с тяжелой бронхо-легочной патологией. Однако исход заболевания в случае инфицирования может быть разным, с тяжелыми осложнениями у иммунокомпрометированных пациентов. В связи с этим, больные из списка кандидатов на трансплантацию являются приоритетной группой по вакцинации при кори, особенно при создавшейся эпидемической ситуации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Костинов М.П., Шмитько А.Д., Бочарова И.И., Черданцев А.П., Сависько А.А., Полищук В.Б. Уровень IgG-антител к вирусу кори в пуповинной крови новорожденных с учетом возраста матерей. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014, 3: 30-34.
2. Семененко Т.А., Русакова Е.В., Щербаков А.Г., Гайдаренко А.Д., Готвянская Т.П., Евсеева Л.Ф. Состояние популяционного иммунитета в отношении управляемых инфекций (по материалам банка сывороток крови). Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2012, 6: 10-15.
3. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В). Методические указания. МУ 3.1.2943-11, 2011.
4. Сылка О.И., Харсеева Г.Г., Леонова И.А. Напряженность иммунитета к вирусу кори у населения г. Ростова-на-Дону. Журн. фундаментальной медицины и биологии. 2013, 1: 41-43.
5. Эсауленко Е.В., Перадзе Х.Д., Дмитриева М.И., Сухорук А.А. Клинико-эпидемиологическая характеристика кори у взрослых. Лечение и профилактика. 2012, 3 (4): 90-92.
6. Blumberg E. A., Brozena S. C., Stutman P. et al. Immunogenicity of pneumococcal vaccine in heart transplant recipients. Clin. Infect. Dis. 2001, 32: 307-310.
7. Burroughs M., Moscona A. Immunization of pediatric solid organ transplant candidates and recipients. Clin. Infect. Dis. 2000, 30 (6): 857-869.
8. Centers for disease control and prevention. Increased Transmission and Outbreaks of Measles — European Region. MMWR. 2011, 6 (47): 1605-1610.
9. Chesi C., Gunter M., Huzly D. et al. Immunization of liver and renal transplant recipients: a

- seroepidemiological and sociodemographic survey. *Transpl. Infect. Dis.* 2009, 11 (6): 507-512.
10. Chow J., Golan Y. Vaccination of solid-organ transplantation candidates. *Clin. Infect. Dis.* 2009, 49 (10): 1550-1556.
  11. Danzinger-Isakov L., Kumar D. AST Infectious Diseases Community of Practice. Guidelines for vaccination of solid organ transplant candidates and recipients. *Am. J. Transplant.* 2009, 9 (Suppl 4): 258-262.
  12. Gasink L. B., Wurcell A.G., Kotloff R.M. et al. Low prevalence of prior streptococcus pneumoniae vaccination among potential lung transplant candidates. *Chest.* 2006, 130 (1): 218-221.

Поступила 20.02.16

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

© М.П.КОСТИНОВ, И.В.ЛУКАЧЕВ, 2016

*М.П.Костинов, И.В.Лукачев*

## **ВОЗМОЖНОСТИ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ В СОВРЕМЕННОЙ РОССИИ**

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

Обсуждая ситуацию по охвату профилактическими прививками взрослого населения на современном этапе, предлагаем новые пути усовершенствования прививочного дела с учетом реалий настоящего времени. Возможно использование дополнительных ресурсов для организации вакцинации взрослого населения при амбулаторном посещении лечебно-профилактических учреждений, госпитализациях, в родильных домах, миграционных пунктах, а также совместной вакцинации детей и взрослых при посещении детских поликлиник. Пересмотр разнообразных резервных возможностей для повышения уровня охвата взрослого населения профилактическими прививками позволяет эффективно реализовать профилактическое направление здравоохранения государства.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 60—65

Ключевые слова: вакцинация, охват прививками, организация вакцинопрофилактики

*M.P.Kostinov, I.V.Lukachev*

## **POSSIBILITIES OF ENHANCEMENT OF VACCINE PROPHYLAXIS IN CONTEMPORARY RUSSIA**

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Discussing the situation regarding coverage of adult population with prophylaxis vaccines at contemporary stage, we propose novel approaches of enhancement of vaccination, taking into consideration realities of the present day. Use of additional resources for organization of vaccination of adult population is possible during outpatient visits to health care facilities, hospitalizations, in maternity hospitals, migration points, as well as joint vaccination of children and adults during visits to child health centers. Re-evaluation of diversity of reserve possibilities for increase of coverage among adult population by prophylaxis vaccines allows to effectively realize prophylaxis approach of country healthcare.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 60—65

Key words: vaccination, vaccine coverage, vaccine prophylaxis organization

В Советском Союзе государство вносило серьезный вклад в реализацию различных программ иммунизации населения, что позволило значительно снизить смертность населения от вакциноуправляемых инфекций. Система организации здравоохранения, в том числе, проведение массовой вакцинопрофилактики, в период существования Советского Союза имела преимущества в универсальном охвате иммунизацией как детей, так и взрослого населения, поскольку все были заняты в государственном секторе. Изменения в социальном, политическом, экономическом строе в государстве на рубеже конца XX начала XXI веков диктуют необходимость поиска новых мер в усовершенствовании системы здравоохранения как в лечебных, так и в профилактических подходах поддержки здоровья нации, принимая во внимание приоритет превентивной медицины и вакцинопрофилактики как одной из основных ее частей. Об этом свидетельствуют и последние изменения в национальном календаре прививок по внедрению новых вакцин для профилактики гепатита В, краснухи, гриппа, для всех уязвимых групп населения и, особенно, пневмококковой инфекции (2014 г.) для младенцев с 2-месячного возраста. Существенных проблем для осуществления вакцинации детей и подростков нет, поскольку они в большинстве случаев посещают организованные коллективы, что позволяет отслеживать и своевременно проводить вакцинацию в рамках национального календаря прививок.

Для взрослого трудоспособного населения появились новые возможности, с одной стороны, заниматься предпринимательской деятельностью, с другой, осуществлять медицинское обслуживание в негосударственных (частных) медицинских клиниках, которые выполняют тот спектр услуг, который предусмотрен договорными обязательствами, не предавая значения вакцинопрофилактике взрослых в декретированные сроки, тогда как в Советском Союзе на предприятиях и в организациях была развита система диспансеризаций и профилактических осмотров взрослого населения, которая позволяла отслеживать и проводить своевременную вакцинацию сотрудников.

В настоящем возможность контроля и своевременной иммунизации сотрудников государственных и муниципальных учреждений представляется более реальной, чем охват вакцинацией в рамках национального календаря прививок работников, занятых в частном секторе экономики. При этом, согласно данным Федеральной службы государственной статистики за 2012 год число занятых в сегменте частной собственности составило 40,6 млн человек (59,7% от общего числа занятых в экономике) [5] (табл. 1).

Процент взрослого населения, занятого в частном секторе, существенно выше работающих в государственном сек-

Таблица 1. Численность занятых в экономике по формам собственности

Всего (млн человек)	68,0
в том числе, по формам собственности:	
Государственная и муниципальная	19,5
Частная	40,6
Собственность общественных и религиозных организаций (объединений)	0,3
Смешанная российская	4,1
Иностранная, совместная (российская и иностранная)	3,5
Всего (%)	100
в том числе, по формам собственности:	
Государственная и муниципальная	28,7
Частная	59,7
Собственность общественных и религиозных организаций (объединений)	0,5
Смешанная российская	6,0
Иностранная, совместная (российская и иностранная)	5,1

торе, что усложняет контроль над своевременным проведением вакцинации в данной когорте людей.

Несмотря на результат анализа привитости населения страны по состоянию на 01.01.2013, свидетельствующий, что в среднем в России в течение многих лет остается высоким уровень охвата вакцинацией (на примере иммунизации против дифтерии детей в декретированные сроки — от 96,3 до 97,9%, подростков — 99,8%, взрослых — 95,0% и выше), тем не менее, остаются непривитыми против данной инфекции в России 2 388 736 человек, которые могут составлять группу риска по возникновению инфекции [4]. Всегда имеется потенциальная опасность эпидемии в случае снижения противодифтерийного иммунитета у населения. Если проследить за уровнем заболеваемости дифтерией в течение последних 50 лет, то отмечается четкая связь между качеством работы по вакцинопрофилактике и эпидобстановкой [3]. Так, первая и вторая волны эпидемии дифтерии в 80-е и 90-е гг. соответственно были связаны, по данным ряда авторов, в первом случае — с недостаточной иммунизацией взрослого населения, а во втором — с неполным охватом вакцинацией детей, обусловленным многочисленными медицинскими отводами от прививок. Заболеваемость дифтерией в России колеблется от 1,68 до 46,9 на 100 тыс. населения, смертность — 1,67 на 100 тыс. [2].

Можно предположить, что не меньшие показатели имеет иммунная прослойка и по столбняку, тем более, что уровень антител к столбнячному анатоксину регистрируется в больших значениях, чем к дифтерийному анатоксину. Обнаружение высокого уровня иммунитета к дифтерии во всех возрастных группах в пределах 74 — 78% случаев в большей степени связано с массовой дополнительной вакцинацией всего населения по эпидемической ситуации в 1994 — 1996 гг. Однако в настоящее время, спустя 20 лет, появилось новое поколение в возрасте 18 — 20 лет. У этой когорты обнаруживаются высокие показатели напряженности иммунитета к дифтерии (приблизительно 93,9%) как результат проводимой третьей ревакцинации против дифтерии и столбняка примерно 4 — 5 лет тому назад (декретированный возраст введения АДС-М анатоксина — 14 лет) [4]. Учитывая, что для поддержания специфических антител в протективных значениях необходима ревакцинация четвертой дозой в 24 — 28 лет, когда эта когорта в сфере своей деятельности будет находиться преимущественно в негосударственных структурах, где иммунизация не предусмотрена, можно предположить иную структуру защищенности от данной инфекции.

Существуют дополнительные ресурсы по увеличению охвата вакцинацией населения. При этом можно выделить несколько путей реализации данной проблемы.

*1 путь — вакцинация при диспансерном осмотре.* В настоящее время обязательной диспансеризации и, как следствие, возможности контроля соблюдения индивидуального календаря профилактических прививок, подлежат лишь работники по профессиональной вредности. Процент осмотренных работников из общего количества, подлежащего осмотру, достаточно высок (2011 г. — 94,8%; 2012 г. — 95,1%; 2013 г. — 94,2%), то есть имеется возможность вакцинации в декретированные сроки [6].

*2 путь — вакцинация при посещении лечебно-профилактических учреждений.* Возможность отслеживания и проведения плановой вакцинации остальных групп работников, практически, возможна лишь при посещении ими лечебно-профилактических учреждений, которое, в свою очередь, достаточно редко, нерегулярно и связано, как правило, с тем или иным нарушением здоровья,



что также может ограничивать возможность проведения вакцинации. Тем не менее, лечащие врачи могут не только рекомендовать, но и соответственно проводить прививки при закрытии больничных листов или при выписке пациента из стационара. Такие способы увеличения охвата вакцинацией предусмотрены в документах ВОЗ, и были использованы в России и странах СНГ в период эпидемии дифтерийной инфекции (1994 — 1996 гг.)

*3 путь — вакцинация родителей в период посещения детских врачей с детьми.* На первом году жизни ребенка необходим регулярный осмотр детей педиатром. Охват детей неонатальным скринингом в различных субъектах Российской Федерации достаточно высок [7] (табл. 2)

В этой связи, возможность вакцинации взрослого детородного населения при плановых посещениях поликлиник с детьми достаточно перспективна с

точки зрения увеличения охвата взрослого населения прививками. С одной стороны, это дает дополнительную возможность для информирования населения о необходимости и сроках проведения вакцинации, с другой — создает более удобный механизм ее проведения. В частности, возможно проведение одновременной вакцинации в поликлиниках детей (в рамках национального календаря прививок) и их родителей. При этом, для проведения иммунизации взрослого населения можно использовать кабинеты вакцинопрофилактики детских поликлиник, что целесообразно экономически.

*4 путь — вакцинация женщин при посещении женских консультаций или при выписке из родильных домов.* Важно отметить, что вакцинация женщин детородного возраста в будущем может способствовать трансплацентарной передаче специфических антител младенцам.

Это направление является перспективным, поскольку при планировании беременности женщины более серьезно относятся к своему здоровью. Часто им рекомендована вакцинация против краснухи, при этом недостаточно обращено внимание на другие, необходимые для профилактики инфекции, такие как корь, ветряная оспа, грипп и другие. Вероятно, знания врача акушера-гинеколога позволят расширить спектр профилактических прививок для данной категории населения.

Также можно проводить иммунизацию рожениц при выписке из роддома, особенно актуальна вакцинация против гриппа и других, не менее важных инфекций. Эта позиция важна при возникновении неблагоприятной эпиде-

Таблица 2. Охват детей неонатальным скринингом по субъектам РФ в 2013 г. (данные Минздрава России)

Субъекты федерации	Обследовано (всего) (абс.)	Доля от общего числа новорожденных, поступивших под наблюдение медицинских организаций (%)
Российская Федерация	1 706 281	97,6
Центральный федеральный округ	380 507	98,1
Северо-Западный федеральный округ	151 915	97,1
Южный федеральный округ	157 190	98,7
Северо-Кавказский федеральный округ	135 111	89,7
Приволжский федеральный округ	371 514	99,2
Уральский федеральный округ	167 521	98,1
Сибирский федеральный округ	262 729	98,0
Дальневосточный федеральный округ	79 794	98,2

мической ситуации (как, например, наблюдаемый в различных регионах Российской Федерации рост заболеваемости корью).

Следует подчеркнуть, что даже в период беременности вакцинация может быть осуществима, при этом приоритетной является иммунизация против гриппа. Хотя в других странах мира в третьем триместре беременности проводится вакцинация против дифтерии, столбняка, коклюша с использованием ацеллюлярной вакцины (Англия), пневмококковой инфекции (Бангладеш и др. страны).

*5 путь — вакцинация при заключении брака.* Такой подход к увеличению иммунной прослойки среди людей молодого возраста имеет право на существование. Этот метод использовался ранее в других странах. Например, очевидна необходимость вакцинации против краснухи, как наиболее опасной инфекции с тератогенным действием для плода. Вероятно, принятие такого подхода к вакцинации при подаче заявления о заключении брака будет рассмотрено как один из первых серьезных шагов на пути к совместной жизни. Если анализировать заключенные браки по возрасту, то видно преобладание 25 — 30-летних лиц обеих полов [8]. В это время необходимо проводить очередные ревакцинации дифтерии, столбняка и других инфекций, например, гепатита В, кори, краснухи.

*6 путь — вакцинация мигрантов.* При оценке изменения общей численности населения установлено, что в большей степени прирост населения определяется миграцией [9] (при общем приросте за 2013 г. в 319,8 тыс. чел. миграционный прирост составил 295,8 тыс. чел.). Эта категория населения — относительно молодого возраста, чаще из бывших республик Советского Союза, в которых в настоящее время охват вакцинацией оставляет желать лучшего. Возможно внесение изменений в правила оформления документов для получения временного или постоянного гражданства РФ о проведении необходимой вакцинации в зависимости от возраста и эпидемической ситуации, тем более, что практика показывала, что первыми источниками возникновения коревой, полиомиелитной инфекций являлись мигранты.

*7 путь — вакцинация населения при посещении различных учреждений в зависимости от возраста.* Данный путь охватывает различные сферы деятельности человека на определенных этапах его жизни. Для реализации необходимо взаимоотношение многих юридических структур, с которыми человек сталкивается в течение жизни. Так, в возрасте от 0 до 19 лет система организации вакцинопрофилактики наиболее развита и определяет в последующем защиту от таких инфекций, как полиомиелит, гепатит В, корь, эпидпаротит, краснуха, туберкулез.

В возрасте 20 — 29 лет для проведения вакцинации в большой степени «задействованы» Вооруженные силы России. При этом вакцинация молодых людей в высших и средних заведениях, особенно, для лиц женского пола, оставляет желать лучшего.

Возраст 25 — 54 — период нахождения людей в местах своей трудовой деятельности, в большинстве случаев — негосударственных структур. Здесь необходимо усилить внимание и осуществить вакцинацию при любых посещениях медицинских учреждений (женских консультаций, детских поликлиник, стационарное лечение). Особенное внимание следует уделить организации диспансерных осмотров.

В возрасте 55 — 64 года можно рекомендовать вакцинацию при оформлении пенсионных пособий. При этом на данном этапе целесообразно про-

водить вакцинацию не только против дифтерии и столбняка, но и против пневмококковой инфекции и гриппа

В период жизни 65 — 70 лет и старше отмечается более частое посещение различных медицинских учреждений, поэтому рекомендации врачей по проведению профилактических прививок против гриппа и пневмококковой инфекции с целью улучшения качества жизни является своевременным и выполнимым.

Таким образом, в XXI веке у органов здравоохранения РФ существует многообразие резервных возможностей в части эффективной борьбы с инфекционными заболеваниями как одним из приоритетных направлений профилактической медицины [1]. В частности, комплекс мер по увеличению охвата населения иммунизацией, таких, как отслеживание и проведение вакцинации при диспансерных осмотрах, при посещениях родителями женских консультаций, заключении браков, получения гражданства Российской Федерации или временного трудоустройства. Немаловажным является и реорганизация прививочного дела по осуществлению совместной вакцинации детей и их родителей в детских поликлиниках.

На данный момент существует оправданная временем система организации прививочного дела, эффективная, но нуждающаяся в корректировке с учетом реальных ситуаций и предвиденных обстоятельств. Разнообразные меры для повышения уровня охвата взрослого населения профилактической иммунизацией представляются весьма перспективными.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Брико Н.И. О специфике эпидемической ситуации в России, особенностях отечественной вакцинопрофилактики, МГУУ Правительства Москвы, 01.04.2014. Available at: <http://mguu.ru/nikolaj-briko-v-rossii-khoroshij-okhvat-naseleniya-privivkami-95-97>.
2. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации. Информация Роспотребнадзора: <http://rospotrebnadzor.ru> 2012.
3. Корженкова М.П., Чистякова Г.Г., Малышев Н.А. Роль массовой иммунизации в прекращении эпидемии дифтерии 90-х гг. в Москве. Биопрепараты. 2005, 1: 4-10.
4. Письмо Роспотребнадзора «О заболеваемости дифтерией и состоянии антитоксического иммунитета населения России в 2012 году» от 9 декабря 2014 года N 01/14530-14-27. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/420242720>.
5. Федеральная служба государственной статистики. Труд и занятость в России. Трудовые ресурсы, затраты труда и производительность труда. Среднегодовая численность занятых в экономике — 2013 г. Available at: [http://www.gks.ru/bgd/regl/b13\\_36/Doc.gif](http://www.gks.ru/bgd/regl/b13_36/Doc.gif).
6. Федеральная служба государственной статистики. Здравоохранение. Лечебно-профилактическая помощь. Профилактические осмотры населения, подлежащего периодическим осмотрам. Available at: [http://www.gks.ru/free\\_doc/new\\_site/population/zdrav/zdr1-7.xls](http://www.gks.ru/free_doc/new_site/population/zdrav/zdr1-7.xls).
7. Федеральная служба государственной статистики. Семья, материнство и детство. Здравоохранение, дружественное к детям, и здоровый образ жизни. охват неонатальным скринингом. Available at: [http://www.gks.ru/free\\_doc/new\\_site/population/family/3-5.xls](http://www.gks.ru/free_doc/new_site/population/family/3-5.xls).
8. Федеральная служба государственной статистики. Демография. Браки и разводы. Браки по возрастам жениха и невесты. Available at: [http://www.gks.ru/free\\_doc/new\\_site/population/demo/demo33.xls](http://www.gks.ru/free_doc/new_site/population/demo/demo33.xls).
9. Федеральная служба государственной статистики. Демография. Численность и состав населения. Компоненты изменения численности населения Российской Федерации. Available at: [http://www.gks.ru/free\\_doc/new\\_site/population/demo/komp-chisl.xls](http://www.gks.ru/free_doc/new_site/population/demo/komp-chisl.xls).

*Поступила 20.01.16*

Контактная информация: Лукачев Игорь Викторович,  
105064, Москва, М.Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-41-49

## ДИСКУССИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Е.Д.Савилов<sup>1,2</sup>, С.И.Колесников<sup>1,4</sup>, Н.И.Брико<sup>3</sup>*

### КОМОРБИДНОСТЬ В ЭПИДЕМИОЛОГИИ — НОВЫЙ ТРЕНД В ИССЛЕДОВАНИЯХ ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ

<sup>1</sup>НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск; <sup>2</sup>Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования; <sup>3</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова; <sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Обсуждаются эпидемиологические аспекты проблемы коморбидности. Показано, что в настоящее время на популяционном уровне совместное протекание различных заболеваний ограничено лишь изучением взаимодействия инфекционных болезней и практически не рассматриваются вопросы сосуществования этих заболеваний с другими нозологическими формами. Рассмотрены примеры одновременного воздействия инфекционных и соматических заболеваний на макроорганизм под влиянием третьей силы (экологическое неблагополучие в виде техногенного загрязнения окружающей среды), относящейся к факторам, влияющим на развитие коморбидности. Такой подход позволил по-иному осмыслить полученные ранее материалы и ввести дополнительные переменные в цепь причинно-следственных связей между инфекционной патологией и экологической составляющей.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 66—75

Ключевые слова: коморбидность, организменный уровень, популяционный уровень, инфекционная и соматическая патология, техногенное загрязнение атмосферного воздуха

*E.D.Savilov<sup>1,2</sup>, S.I.Kolesnikov<sup>1,4</sup>, N.I.Briko<sup>3</sup>*

### THE COMORBIDITY IN EPIDEMIOLOGY — NEW TREND IN PUBLIC HEALTH RESEARCH

<sup>1</sup>Scientific Center of the Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk; <sup>2</sup>Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education; <sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University; <sup>4</sup>Lomonosov Moscow State University, Russia

Comorbidity epidemiological aspects discussed in the article. At the present time most common on the population level are research of the impact of infectious diseases on the macroorganism at the population level, or investigations of dynamics of noninfectious diseases under influence of several risk factors. The problem of coexistence (comorbidity) of infectious diseases with other nosologic forms usually are not considered. Some examples of simultaneous effect (comorbidity) of infectious and somatic diseases on the macroorganism under the influence of anthropogenic pollution are shown in the article. Environmental pollution is usually not taking into consideration third force which affects the development of comorbidity. Proposed new approach allowed differently interpret previously obtained materials and introduce additional variable risk factors in the chain of causal relationships between infectious disease and environmental pollution

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 66—75

Key words: comorbidity, organismal level, population level, infectious and somatic diseases, air technogenic pollution

В течение многих столетий врачи использовали комплексный подход к лечению больного (не болезни), однако развитие и усложнение медицины потребовало конкретизации усилий и узкой специализации врачей. В конечном итоге, такой редукционизм не только несомненно обогатил медицину, но и в определенной степени завел ее в тупик («с водой выплеснули ребенка»), в связи с чем, назрела необходимость возвращения к персонализированной медицине («лечить больного, а не конкретную болезнь»).

Одним из важнейших шагов в этом направлении явилось формирование понятия «коморбидность» (от лат. со — вместе + morbus — болезнь), впервые предложенного американским врачом-эпидемиологом Алваном Фенштейном [34], который вкладывал в этот термин представление о дополнительной клинической картине, которая уже существует или может появиться самостоятельно помимо текущего заболевания и всегда отличается от него. Примером коморбидности, исследованной Фенштейном, стало соматическое (терапевтическое) заболевание — острая ревматическая лихорадка, которая ухудшала прогноз у больных, страдающих рядом других заболеваний.

В отечественных работах совместное протекание болезней обычно описывалось как сопутствующие, ассоциированные, сочетанные заболевания и состояния. В настоящее время все более активно используется термин «коморбидные заболевания и состояния». В дальнейшем в понятие «коморбидность» стали включать также сосуществование двух и/или более синдромов (транссиндромальная коморбидность) или заболеваний (транснозологическая коморбидность) у одного пациента, патогенетически взаимосвязанных между собой или совпадающих по времени (хронологическая коморбидность). Появились и другие многочисленные родственные понятия, но суть их остается прежней. Тем не менее, несмотря на обилие определений и синонимов, единая классификация и общепринятая терминология коморбидности до сих пор отсутствуют.

А.Л.Верткин и др. [6] выделили некоторые причины коморбидности: анатомическая близость пораженных органов, единый патогенетический механизм нескольких болезней, а также причинно-следственная связь и совокупные осложнения болезней. Факторами, влияющими на развитие коморбидности, могут являться хроническая инфекция, воспаление, инволютивные и системные метаболические изменения, ятрогения, социальный статус, экология и генетическая предрасположенность, которые в этом контексте следует отнести к факторам риска.

Остановимся лишь на одном примере, характеризующем актуальность рассматриваемой проблемы в медицинской практике. Эпидемиологические исследования показали, что распространенность коморбидности у больных в возрасте 18 — 44 года составляет 69%, а в старшей возрастной группе (более 65 лет), этот показатель достигает 98%. При этом число одновременно протекающих хронических заболеваний варьирует от 2,8 у молодых пациентов до 6,4 у пожилых [35].

Так что же характеризует это важнейшее, но все еще несколько пока размытое понятие «коморбидность»? Становится понятным, что это не просто сумма нескольких болезней, а их определенное взаимодействие, формирующее в итоге новые варианты течения каждого из интегрированных заболеваний. Причем это вносит существенные искажения в статистику заболеваемости и особенно смертности, поскольку регистрируется лишь т.н. ведущая, или основная, причина.

Следовательно, эта новая категория должна иметь присущие только ей

особенности. Например, Ф.И.Белялов [1] выделяет и обосновывает 12 основных блоков коморбидности, а А.Л.Верткин [6] вычленил пять основных признаков этого понятия.

Учитывая направленность представленного сообщения и формализованные рамки настоящей статьи, не будем останавливаться на частностях и постараемся свести имеющиеся данные в сжатом виде в один блок.

Итак, коморбидные пациенты составляют большинство больных (особенно в пожилом возрасте), у которых имеет место изменение клиники заболеваний и ухудшается прогноз, что влечет за собой вынужденную полипрагмазию (одновременное назначение большого количества лекарственных препаратов) с увеличением риска побочных эффектов, что в совокупности приводит к существенному увеличению стоимости терапии и является значимым фактором риска летальных исходов.

Одним из наиболее демонстративных и достаточно простых примеров для понимания коморбидности может являться сочетание перелома шейки бедра у лиц пожилого возраста с присоединением застойной гиподинамической пневмонии. Каждое из этих патологических состояний в отдельности, тем более в молодом возрасте, не относится к достаточно серьезным проблемам. Однако при их сочетании в пожилом возрасте появляются новые свойства заболевания, определяющие тяжесть течения и способствующие появлению выраженного фактора риска развития летального исхода.

Изучение коморбидности выделилось как отдельное направление в разных отраслях медицины. Наиболее широко это представлено в психиатрии при изучении сочетания соматических и душевных заболеваний, а также в практической деятельности врачей терапевтов и врачей общей практики. Понятно, что с этой проблемой часто сталкиваются и врачи узких специальностей, которые однако достаточно редко обращают внимание на сосуществование у одного больного разных болезней и преимущественно занимаются лечением профильного заболевания [7]. Рассматриваемая проблема нашла широкое распространение в зарубежных исследованиях [32, 33, 36 — 39] и в настоящее время начинает активно развиваться в отечественных клинических работах [8, 10, 14, 15, 17, 23].

Не осталась в стороне от этого «столбового» пути развития медицины и эпидемиология. Несмотря на то, что в популяционных исследованиях практически вплоть до настоящего времени эпидемический процесс отдельных болезней традиционно рассматривается изолированно, тем не менее, уже в 1980 г. (через 10 лет после А. Фенштейна) Г.П. Надарая [11] ввел в научный обиход такое понятие как «интеграционный метод в эпидемиологии». Теоретическим обоснованием этого метода стало сложившееся у автора представление о том, что эпидемический процесс есть единое целостное явление — процесс одновременного распространения различных инфекций и существуют всеобщие согласованные закономерности совместного их распространения, которые являются атрибутом их далекого эволюционного прошлого. При этом, по мнению Г.П. Надарая, каждая инфекция имеет изначально заданный ритм развития, отраженный в динамике заболеваемости, что, в частности, направлено и на предупреждение формирования микст-инфекций.

В настоящее время это перспективное направление в отечественной эпидемиологии наиболее активно развивается в трудах А.А. Яковлева, его учеников и коллег [16, 25 — 30], выдвинувших концепцию интеграционно-конкурентного развития эпидемического процесса [25, 30], а также другими исследователями [2, 3, 12].

В соответствии с концепцией интеграционно-конкурентного развития эпидемического процесса инфекции, имеющие общую локализацию и механизм передачи, могут прямо или опосредованно влиять на развитие эпидемического процесса друг друга. Суть рассматриваемого интеграционного метода заключается в проведении скоординированного ретроспективного анализа заболеваемости разными инфекциями по одним и тем же параметрам и в один временной период, что позволяет не только определить, как указанные взаимодействия отражаются на проявлениях эпидемического процесса, но и выявить вероятность предполагаемых взаимодействий между паразитарными системами даже при отсутствии соответствующих микробиологических данных.

Об этом, в частности, могут свидетельствовать исследования по изучению взаимодействия вируса гриппа и других респираторных вирусов с бета-гемолитическим стрептококком группы А (БГСА), приводящим к усилению его вирулентности и последующей активизации эпидемического процесса [9]. Следует вспомнить и о кумулирующем эффекте при инфицировании двумя гепатотропными вирусами, приводящему к более быстрому прогрессированию по сравнению с моноинфекцией патологического процесса в печени [31]. Кроме того, риск передачи парентеральных вирусных гепатитов вертикальным и половым путями существенно увеличивается при наличии сочетанной инфекции с другими агентами, передающимися половым путем, особенно вирусом иммунодефицита человека. Например, передача вируса гепатита С от матери плоду наблюдается в 15 — 36% случаев при одновременном инфицировании ВИЧ и не более чем в 5% случаев при моноинфекции [41].

Интересной иллюстрацией к вопросу о коморбидности в инфектологии может являться выдвинутая в свое время М.В. Супотницким [24] гипотеза о том, что пандемическое распространение ВИЧ-инфекции в 80-х годах прошлого века было обусловлено ликвидацией натуральной оспы, которая, по его мнению, сдерживала эту возможность, поражая в эндемических очагах, прежде всего, лиц с иммунодефицитом. Если исходить из этой концепции, то можно предположить [30], что в современный период эту роль берет на себя туберкулез? Правомочность этого допущения основывается на том, что на территориях, неблагоприятных по обеим инфекциям, туберкулез развивается у 50 — 75% больных ВИЧ-инфекцией и становится проблемой государственного масштаба, определяя наибольшее негативное влияние на динамику эпидемического процесса [43]. Более того, больные ВИЧ-инфекцией заболевают туберкулезом и умирают от него в 29 — 31 раз чаще, чем постоянные жители России, не болеющие ВИЧ-инфекцией [13]. Следовательно, поскольку возбудители туберкулеза и ВИЧ-инфекции являются облигатными паразитами, то взаимодействовать они могут только в организме человека, и с этих позиций сочетанные инфекции можно рассматривать как фактор, способствующий саморегуляции микроорганизмов в биоценозе.

Продолжая представленное сообщение, отметим, что, несмотря на приведенные факты совместного протекания заболеваемости инфекционных болезней, конкретные подходы к изучению этой проблемы далеки еще от завершения и не вошли в повседневную практику эпидемиологов. Анализ литературы свидетельствует, что приоритет в изучении проблемы сочетанных инфекций принадлежит, прежде всего, клиническим и микробиологическим исследованиям, тогда как эпидемиологические (проявления заболеваемости) — весьма немногочисленны.

Ни в коей мере не подвергая сомнению важность разрабатываемых вопро-

сов коморбидности в инфекционной патологии (как совместное протекание этой группы болезней) на популяционном уровне, следует все же отметить, что в инфектологии это направление исследований до сих пор не включило в сферу своего анализа сопутствующие разнообразным неинфекционным заболеваниям. С учетом же комплексного подхода к оценке человека (популяции) имеется настоятельная необходимость оценивать коморбидность как целостное явление, не исключая при этом и дополнительного воздействия факторов риска, влияющих на развитие этого явления.

Учитывая, что данный аспект проблемы может быть в равной степени связан с проявлениями инфекционной и соматической патологии, такой подход может быть перспективным направлением в эпидемиологических исследованиях и профилактической работе, тем более, что неблагоприятные экологические (в т.ч. техногенные) факторы риска оказывают выраженное воздействие на макро- и микроорганизм. Это, тем более, очевидно, что реализация генома в фенотип как у макро-, так и микробиома (вирусов) происходит в реальных условиях обитания, а взаимоотношения макроорганизма и микроорганизма и влияние на них техногенных и климато-географических факторов формируют возможные нарушения генома, метаболизма и регуляторных процессов, а следовательно, уровень и варианты заболеваемости.

Приведенный материал побудил нас рассмотреть клинко-эпидемиологические проявления коморбидности в инфекционной патологии в условиях неблагоприятных экологических факторов (техногенного загрязнения атмосферного воздуха), что практически не нашло своего отражения в современной литературе. При этом следует отметить, что Совет Безопасности ООН в 2000 г. признал, что инфекционные заболевания переросли из проблемы здравоохранения в глобальную политическую проблему (цит. по [4]).

Влияние неблагоприятных экологических факторов (и прежде всего, техногенного загрязнения окружающей среды) на соматическую патологию достаточно широко освещено в специальной литературе и не нуждается в специальном обосновании. Вместе с тем, подобный анализ для инфекционных заболеваний все еще во многом остается *terra incognita*, что, в конечном итоге, явилось основанием для того, чтобы в 2000 году на сессии общего собрания РАМН (Москва) исследования по проблеме «Изучение закономерностей эволюции эпидемического процесса и изменение экологии патогенов под влиянием антропогенных и техногенных факторов» были включены в важнейшие приоритетные направления в области фундаментальных исследований в инфектологии.

Но лишь в последние годы появились обобщающие эпидемиологические исследования в этом направлении. Было выявлено выраженное негативное влияние неблагоприятных экологических условий (техногенного загрязнения окружающей среды) на проявления инфекционной патологии для взрослого и детского населения как на организменном, так на популяционном уровне [18 — 22]. Однако все эти исследования были проведены без учета совместного протекания инфекционных болезней с соматическими заболеваниями.

Изложенное выше явилось основанием рассмотреть на популяционном уровне одновременное протекание (коморбидное состояние) инфекционных (основное заболевание) и хронических соматических заболеваний (сопутствующая патология) под влиянием третьей силы (экологическое неблагоприятное воздействие техногенного загрязнения окружающей среды), относящейся к факторам, влияющим на развитие коморбидности.

Представленный клинко-эпидемиологический анализ включал в себя



следующие основные виды и (или) группы инфекционной патологии: острые респираторные вирусные инфекции, парентеральные вирусные гепатиты А, В и С, дизентерия Зонне и Флекснера, сальмонеллезы, коклюш, дифтерия. В настоящем сообщении приведены исследования [20, 21], выполненные по единой схеме у детского населения, относящегося к своеобразному индикатору, отражающему реакцию организма человека на вредные воздействия окружающей среды. Указанные исследования проведены в Ангарске и Иркутске, которые, являясь городами-соседями, значительно отличались как уровнем, так и качественным составом техногенных загрязнителей атмосферного воздуха. Проведенный эколого-гигиенический анализ позволил отнести Ангарск к основной территории, а Иркутск к территории сравнения. В свою очередь, территория Иркутска была условно разделена на более загрязненную (основная подгруппа) и относительно чистую (подгруппа сравнения) зоны сравнения. Последний подход имеет важное методическое значение в связи с тем, что в этом случае все больные «проходили» через один стационар, через одни «врачебные руки», при этом загрязнение атмосферного воздуха носило не качественные, а лишь количественные отличия.

С учетом приведенных выше положений рассмотрим воздействие техногенного загрязнения атмосферного воздуха на клинические проявления сопутствующей патологии (коморбидный фон). Такие заболевания способствуют возникновению или неблагоприятному течению основного заболевания (в нашем случае — инфекционная патология), повышают его опасность и способствуют развитию осложнений.

На примере вирусного гепатита В отчетливо видно, что доля детей, имеющих хронические сопутствующие заболевания, закономерно снижается от интенсивно загрязненного района (Ангарск) до относительно благополучного («условно чистые» районы Иркутска). В Ангарске величина этого показателя достигала  $60,2 \pm 0,05\%$  случаев, а в Иркутске лишь  $34,3 \pm 0,03\%$  ( $p < 0,05$ ). В районах Иркутска с низким уровнем загрязнения атмосферного воздуха этот показатель составил  $26,5 \pm 0,04\%$ , а в районах с высоким уровнем загрязнения —  $41,1 \pm 0,05\%$  ( $p < 0,05$ ).

Аналогичное распределение сопутствующей хронической соматической патологии получено и для других взятых в разработку инфекционных заболеваний. Например, для острых инфекционных болезней верхних дыхательных путей коморбидный фон хронических заболеваний отмечен у  $63,9 \pm 3,9\%$  детей из Ангарска и у  $49,6 \pm 4,2\%$  детей из Иркутска ( $p < 0,05$ ). Для дизентерии Флекснера в «условно чистом» районе Иркутска доля детей с сопутствующей патологией составила  $31,0 \pm 0,05\%$ , а в «условно грязном» —  $70,0 \pm 0,05\%$  ( $p < 0,001$ ).

Проведенные исследования показали, что коморбидный фон у детей в районах с высоким уровнем загрязнения атмосферного воздуха отягощен хронической патологией внутренних органов, которая представлена в основном хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта, ЛОР-органов, сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем, а также аллергической патологией.

Рассмотрим на популяционном уровне проявления коморбидности (инфекционная патология и хронические соматические заболевания) под влиянием третьей силы (экологического неблагополучия) по наиболее обобщенным клиническим показателям.

Полученные материалы свидетельствуют, что течение инфекционных заболеваний у детей в сравниваемых городах, для всех взятых в разработку групп

и (или) нозологических форм патологии, в условиях экологического неблагополучия было более длительным и носило достоверный или высокодостоверный характер. Аналогичная закономерность имела место и при сравнении длительности течения заболевания у инфекционных больных из разных районов одного города. Однако эти расхождения носили менее выраженный характер и не всегда имели значимые различия.

Другим важнейшим интегральным показателем клинического течения любого заболевания является тяжесть его проявления, которая для всех рассмотренных инфекционных заболеваний на сравниваемых территориях, как и в случае с длительностью болезни, носила более неблагоприятный характер в условиях проживания населения под действием экологического прессинга.

Наглядным примером является распределение степени тяжести вирусного гепатита А у детей, проживающих в сравниваемых городах. В Ангарске преобладали среднетяжелые формы заболевания ( $74,0 \pm 4,7\%$ ) и имели место тяжелые случаи ( $2,7 \pm 1,9\%$ ). В Иркутске при отсутствии тяжелых форм отмечалось значительно меньшее число заболеваний со среднетяжелым течением ( $55,2 \pm 5,3\%$ ,  $p < 0,01$ ). Аналогичная закономерность имела место и для вирусного гепатита В. В Ангарске доля больных с тяжелой формой этого заболевания достигала  $23,2\%$ , а в Иркутске составляла лишь  $8,4\%$  ( $p = 0,006$ ). Более того, при вирусном гепатите В у больных, проживающих на территориях с высоким уровнем техногенного загрязнения, выявлен значительно более высокий уровень формирования хронического течения ( $p < 0,05$ ), чем у больных, проживающих в экологически более благоприятных условиях. Эти показатели для Ангарска и Иркутска составляли  $12,8$  и  $4,8\%$  соответственно, а между «грязными» и «чистыми» районами Иркутска —  $8,0$  и  $1,0\%$  соответственно.

Не меньший интерес в рассматриваемой проблеме представляет анализ имеющихся осложнений, способствующих неблагоприятному исходу основного заболевания и вызывающих ухудшение в состоянии больного, что позволяет их отнести к осложненной коморбидности. Не останавливаясь подробно на этом аспекте проблемы, отметим лишь наличие значительно большего их числа при инфекционных заболеваниях в зонах с высоким уровнем промышленного загрязнения атмосферного воздуха. Весьма демонстративным примером такой зависимости являются полученные данные по частоте поражения ЛОР-органов при острых инфекциях дыхательных путей. Нами показано, что в Иркутске наблюдается типичное распределение данного вида осложнений, то есть имеет место снижение этого показателя с возрастом. В Ангарске же отмечается противоположная тенденция.

Выявленные закономерности в изменениях клинических показателей имеют место и при других формах инфекционной патологии детского населения, проживающего в неблагоприятных условиях загрязнения атмосферного воздуха (Ангарск и «условно грязные» районы Иркутска).

Проведенные ранее клинико-эпидемиологические исследования позволили сформулировать следующее обобщенное положение: техногенное загрязнение окружающей среды является самостоятельным фактором риска в развитии инфекционного процесса, который в условиях экологического прессинга протекает на фоне отягощенного преморбидного фона и характеризуется более тяжелыми и длительными проявлениями клинического течения, а также более частым развитием осложнений и хронизации заболевания [20].

Дальнейшее развитие клинических и эпидемиологических исследований, а также осмысление полученных нами ранее материалов с позиции коморбидности позволили по-иному взглянуть на приведенное выше обобщение и сформулировать его следующим образом.

Техногенное загрязнение окружающей среды является первичным фактором риска для развития хронической соматической патологии, которая, в свою очередь, является для инфекционной патологии вторичным фактором риска, способствующим формированию отягощенных форм инфекционного процесса. Таким образом, новое понимание рассматриваемой проблемы позволило ввести дополнительные переменные в цепь причинно-следственных связей между инфекционной патологией и экологической составляющей.

Представленный анализ сложившейся ситуации свидетельствует о необходимости исследований, связанных с выявлением нового качества (мультипликации или уменьшения признаков) при совместном протекании болезней в условиях воздействия третьей силы (необычной, не встречавшейся ранее в эволюции, таких как антропо-техногенные факторы; либо необычной интенсивности; либо необычного сочетания известных факторов и т.п.). Это в значительной мере изменит взгляды на взаимодействие этиологического фактора заболевания и макроорганизма, которые мы привыкли мерить по функциональному (т.е. пропорциональному, линейному), а не возможному парадоксальному ответу и эффекту.

К этому следует также добавить, что изменение эпидемиологических и клинических проявлений инфекционных болезней на современном этапе определяется, с одной стороны, экологически обусловленными нарушениями иммунной защиты макроорганизма и, вследствие этого, снижением сопротивляемости инфекциям, а с другой — глубокими изменениями биологических свойств самих микроорганизмов. При этом, как указывают Н.И. Брико и В.И. Покровский [4], изменение свойств возбудителей инфекционных болезней (как фактор ускорения эволюции инфекционных болезней) идет особенно быстрыми темпами.

Относительно широко изученной стороной этого явления является отношение к антимикробным препаратам. Многочисленными исследованиями показано, что в условиях экологического неблагополучия имеет место значимое увеличение доли штаммов микроорганизмов с множественной устойчивостью к лекарственным препаратам [20]. Имеющиеся в настоящее время работы свидетельствуют, что загрязнение окружающей среды приводит к усилению персистентных характеристик патогена, способствуя увеличению частоты формирования реконвалесцентного бактерионосительства, что, в свою очередь, способствует развитию инфекционных заболеваний [5]. Нет необходимости продолжать этот перечень, ибо этот аспект коморбидности еще пока практически не нашел своего отражения в популяционных исследованиях и требует своего разрешения.

Завершить хотелось бы следующим обобщением. Профилактика и лечение хронических заболеваний определены ВОЗ как приоритетное направление, связанное с улучшением качества жизни населения, и в отличие от распространенных рекомендаций, ориентированных на болезнь, предлагается другой подход, основанный на целостном подходе к пациенту [40, 42]. Понятно, что решение столь амбициозной задачи невозможно без популяционных обобщений, популяционного подхода.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белялов Ф.И. Двенадцать тезисов коморбидности. Клиническая медицина. 2009, 87 (12): 69-71.
2. Болотин Е.И. Эпидемиология: новый взгляд на ее объект и предмет. Сибирский медицинский журнал. 2011, 2: 145-148.
3. Болотин Е.И., Федорова С.Ю. Пространственно-временная организация инфекционной заболеваемости населения юга Российского Дальнего Востока. Владивосток, Дальнаука, 2008.
4. Брико Н.И., Покровский В.И. Глобализация и эпидемический процесс. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010, 4: 4-10.
5. Бухарин О.В., Литвин В.Ю. Патогенные бактерии в природных экосистемах. Екатеринбург, УрО РАН, 1997.
6. Верткин А.А. Коморбидность: история, современное представление, профилактика и лечение. Кардиовакулярная терапия и профилактика. 2015, 14 (2): 74-79.
7. Верткин А.Л., Румянцев М.А., Скотников А.С. Коморбидность. Клиническая медицина. 2012, 90 (10): 4-11.
8. Дороженко И.Ю. Тревожные и болевые расстройства в общемедицинской практике (аспекты коморбидности и терапии). Доктор. Ру. 2012, 73 (5): 86-92.
9. Дубровина Т.Я., Грабовская К.Б., Иванова И.А. Летальный синергизм вирус-бактериальных инфекций (модель: грипп-стрептококк). Вестник АМН СССР. 1989, 11: 17-22.
10. Ефремова Е.В., Шутов А.М., Сабитов И.А. Коморбидность и приверженность к лечению при хронической сердечной недостаточности. Журнал сердечная недостаточность. 2013, 1 (75): 40-46.
11. Надарая Г.П. Проблема одновременного распространения различных инфекций (Интеграционная эпидемиология). Тбилиси, Сабгота Сакартавелла, 1980.
12. Нечаев В.В., Иванов А.К., Пантелеев А.М. Социально-значимые инфекции. Ч. II (микст-инфекции). ООО Береста, 2011.
13. Нечаева О.Б. Ситуация по туберкулезу и ВИЧ-инфекции в России. Туберкулез и болезни легких. 2014, 6: 9-16.
14. Нургазизова А.К. Происхождение, развитие и современная трактовка понятий «коморбидность» и «полиморбидность». Казанский медицинский журнал. 2014, 95 (2): 292-296.
15. Оганов Р.Г. Сосудистая коморбидность: общие подходы к профилактике и лечению. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2015, 11 (1): 4-7.
16. Поздеева Е.С., Яковлев А.А. Интеграционный метод в эпидемиологической диагностике гепатитов В и С (на модели Приморского края). LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012.
17. Романова Е.В. Влияние коморбидности на эффективность лечения у пациентов с множественной миеломой. Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2015, 134 (3): 54-57.
18. Савилов Е.Д. Теоретические аспекты управления инфекционной заболеваемостью в условиях техногенного загрязнения окружающей среды. Сибирский научный медицинский журнал. 2008, 28 (1): 43-46.
19. Савилов Е.Д. Эволюция эпидемического процесса в современных условиях. Вестник Российской академии медицинских наук. 2011, 3: 14-18.
20. Савилов Е.Д., Ильина С.В. Инфекционная патология в условиях техногенного загрязнения окружающей среды: клинико-эпидемиологические исследования. Новосибирск, Наука, 2010.
21. Савилов Е.Д., Ильина С.В., Брико Н.И. Проявление инфекционной заболеваемости в условиях экологического неблагополучия. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2009, 5: 34-38.
22. Савилов Е.Д., Колесников С.И., Красовский Г.Н. Инфекция и техногенное загрязнение: подходы к управлению эпидемическим процессом. Новосибирск, Наука, 1996.
23. Самородская И.В., Никифорова М.А. Терминология и методы оценки влияния коморбидности на прогноз и исходы лечения. Бюллетень НЦСХХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания. 2013, 14 (4): 18-26.

24. Супотницкий М.В. Микроорганизмы, токсины и эпидемии. М., Вузовская книга, 2000.
25. Яковлев А.А. Концепция интеграционно-конкурентного развития эпидемического процесса. Тихоокеанский медицинский журнал. 2006, 3: 10-15.
26. Яковлев А.А. О необходимости интеграционного подхода к изучению проблемы клещевого энцефалита и иксодового клещевого боррелиоза. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2007, 11: 106-108.
27. Яковлев А.А., Колпаков С.Л. Стрептококковые инфекции у моряков (морская эпидемиология). Владивосток, Медицина ДВ, 2013.
28. Яковлев А.А., Поздеева Е.С. Необходимость системного подхода к изучению сочетанных форм вирусных гепатитов. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010, 4: 54-56.
29. Яковлев А.А., Поздеева Е.С. Интеграционная эпидемиология гепатитов В и С в Приморском крае. Владивосток, Медицина ДВ, 2011.
30. Яковлев А.А., Савилов Е.Д. Проблемные вопросы общей эпидемиологии. Новосибирск, Наука, 2015.
31. Alexander J., Kowdley K.V. Epidemiology of hepatitis B — clinical implication. MedGenMed. 2006, 8 (2): 13.
32. Alibhai S.M.N., O'Neill M.E. Comorbidity and the risk of venous thromboembolism in prostate cancer. Cancer. 2015, 121 (20): 3574-3576.
33. Fadienko G.D., Nesen A.O. Comorbidity and integration role of internal disease. Украинский терапевтический журнал. 2015, 2 (45): 7-15.
34. Feinstein A.R. Pre-therapeutic classification of co-morbidity in chronic disease. J. Chron. Dis. 1970, 23 (7): 455-468.
35. Fortin M., Bravo G., Hudon C. et al. Prevalence of multimorbidity among adults seen in family practice. Ann. Fam. Med. 2005, 3: 223-228.
36. Graham C.S., Baden L.R., Yu E. et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. Clin. Infect. Dis. 2001, 91: 562-569.
37. Klein M.B., Lalonde R.G., Suisse S. The impact of hepatitis C virus coinfection on HIV progression before or antiretroviral therapy. J. Acquir. Immune Syndr. 2003, 33: 365-372.
38. Nesen A.O., Chernychof V.A., Grunchenko M.M. et al. Comorbidity of chronic non-infectious diseases in hospitalized patient with high cardiovascular risk. Украинский терапевтический журнал. 2015, 4 (47): 47-55.
39. Rozzini R., Frisoni G.B., Ferrucci L. et al. Geriatric index of comorbidity: validation and comparison with other measures of comorbidity. Age and Ageing. 2002, 31 (4): 277-285.
40. Starfield B., Lemke K.W., Bernhardt T. et al. Comorbidity: implications for the importance of primary care in «case» management. Ann. Fam. Med. 2003, 1 (1): 8-14.
41. Swati G., Sarman S. Hepatitis B and C virus coinfections in human immunodeficiency virus positive North Indian patients. Wld J. Gastroenterol. 2006, 42 (12): 6879-6883.
42. Van Weel C., Schellevis F.G. Comorbidity and guidelines: conflicting interests. Lancet. 2006, 367: 550-551.
43. WHO. Global tuberculosis report 2013. Geneva: World Health Organisation, 2015. [[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html)].

Поступила 23.02.16

Контактная информация: Савилов Евгений Дмитриевич, д.м.н., проф,  
664003, Иркутск, ул. Тимирязева, 16, р.т. (3952)33-34-25

© И.Б.СЕМЕНОВА, Н.А.МИХАЙЛОВА, 2016

*И.Б.Семенова, Н.А.Михайлова*

## СЕРОТИПНЕЗАВИСИМЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

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

Создание серотипнезависимых вакцин включает в себя четыре направления — конструирование белковых вакцин на основе рекомбинантных белков пневмококка, цельноклеточных убитых и аттенуированных вакцин, ДНК-вакцин и использование белков *Streptococcus pneumoniae* в качестве носителя для полисахаридных и конъюгированных вакцинных препаратов. Наиболее широко изученными являются белковые вакцины. У пневмококка описано около 20 белков — внутриклеточные, связанные с клеточной стенкой и секретируемые. Большинство исследователей останавливаются на конструировании вакцинного препарата, включающего набор нескольких белков, защищающих от колонизации, инвазии, пневмонии. Механизм действия белковых вакцин отличается от такового полисахаридных. Белковые препараты создают защиту от нескольких серотипов пневмококка. Актуальным для доклинических испытаний является исследование перекрестной активности белков-кандидатов в вакцинные препараты с тканями организма человека. Для вакцин из белков пневмококка необходимо подобрать адьюванты, так как гидроксид алюминия не является подходящим адьювантом для этих препаратов.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 76—85

Ключевые слова: серотипнезависимые вакцины, пневмококк, белки пневмококка, адьюванты вакцин

*I.B.Semenova, N.A.Mikhailova*

## SEROTYPE-INDEPENDENT VACCINES AGAINST PNEUMOCOCCAL INFECTION

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Creation of serotype-independent vaccines includes 4 directions — construction of protein vaccines based on recombinant pneumococcus proteins, whole-cell killed or attenuated vaccines, DNA-vaccines and use of *Streptococcus pneumoniae* as a carrier for polysaccharide and conjugated vaccine preparations. Protein vaccines are the most widely studied. Around 20 proteins are described for pneumococcus — intracellular, associated with cell wall and secreted. The majority of researchers stop at construction of a vaccine preparation including a set of several proteins, protecting from colonization, invasion, pneumonia. Mechanism of action for protein vaccines differs from that of polysaccharide vaccines. Protein preparations create protection from several pneumococcus serotypes. Study of cross-activity of protein-candidates for vaccine preparations with human organism tissues is actual for preclinical studies. Selection of adjuvants is necessary for these vaccines, because aluminium hydroxide is not a suitable adjuvant for these preparations.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 76—85

Key words: serotype-independent vaccines, pneumococcus, pneumococcus proteins, vaccine adjuvants

Для профилактики носительства и заболеваний, индуцированных *Streptococcus pneumoniae*, применяются полисахаридные и конъюгированные вакцины. К ним относятся представленные на рынке, в том числе в России, препараты Пневмо-23, Превенар-7, Превенар-13 и Синфлорикс. Основным недостатком этих вакцин, несмотря на формирование специфической защиты и популяционного иммунитета [22], является ограниченное количество серотипов, против которых развивается иммунитет, высокая стоимость и технологические трудности производства [27]. Кроме того, в процессе вакцинации этими препаратами происходит замещение вакцинных штаммов на невакцинные [10], а оставшиеся в популяции после применения вакцин штаммы проявляют повышенную резистентность к антибиотикам [19]. У части носителей и заболевших этиологически значимыми возбудителями являются некапсулированные штаммы [17]. В связи с вышеизложенным, ведутся работы по конструированию серотипнезависимых вакцинных препаратов. К таким подходам относится, прежде всего, создание вакцин, состоящих из тех или иных белков пневмококка, вакцин из смеси белков пневмококка, использование белков этого микроба в качестве носителя для полисахаридов, и конъюгированных препаратов, ДНК-вакцины и цельноклеточные вакцины [11, 27]. Следует отметить, что акцент на конструирование белковых вакцин и ДНК-вакцин против пневмококка делали уже в 1999 г. [7]. Актуальными эти направления остаются и сегодня.

В 2010 — 2011 гг. нами опубликованы обзоры преимущественно зарубежной литературы, посвященные роли белков пневмококка в патогенезе инфекции, вызванной этим патогеном, и разработке экспериментальных вакцинных препаратов на их основе [1, 2]. В данном сообщении мы подробно останавливаемся на подходах к конструированию серотипнезависимых вакцин против пневмококка и на проблемах создания белковых вакцин, акцентируя внимание на разработках последних пяти лет. В обзоре подробно описаны кандидаты в экспериментальные вакцины на основе поверхностного белка А, пневмококкового поверхностного белка С, пневмолизоида, белков гистициновой триады, поверхностных белков, относящихся к JC47 антигенам, белков пневмококковых ворсинок, холинсвязывающего белка, липопротеина SPO845, белка Dna J, белка теплового шока, металлопротеиназы цинка В.

В 2012 г. опубликована статья, в которой авторы [15] суммировали и проанализировали материалы конференции по проблемам и трудностям создания белковых вакцин против пневмококка. Участники симпозиума выделяют три направления работы: создание вакцин из белков пневмококка; использование белков *S. pneumoniae* в качестве белковых носителей для полисахаридов; комбинация белков пневмококка с конъюгированными противопневмококковыми вакцинами.

В настоящее время описано около 20 белков пневмококка [15], функции установлены лишь у некоторых. Большинство исследователей считают, что комбинация белков будет обладать наиболее выраженным защитным действием в клинике. Неясно, какие белки и в каких комбинациях будут обеспечивать наилучшую защиту от пневмококковой инфекции у человека. По мнению авторов вышеуказанных работ, не существует какого-либо одного белкового антигена, введение которого защитит макроорганизм от летальной дозы микроба даже при доклинических испытаниях на животных. Остается вопрос, присутствуют ли выбранные для вакцины белки во всех штаммах микроба и защищают ли они от колонизации и разных форм пневмококковых заболеваний. Считается, что необходима репрезентативная коллекция штаммов для

отбора белковых антигенов и выбран подходящий адъювант, усиливающий как В-клеточный, так и Т-клеточный ответ. Известно, что для усиления Th17-ответа нужны соединения более эффективные, чем гидроокись алюминия. При создании белковой пневмококковой вакцины необходимо изучить перекрестную активность белков микроба и человека. Об этом свидетельствуют данные о том, что у перспективного в эксперименте белка PspA (поверхностного пневмококкового белка) были обнаружены общие антигены с человеческим сердечным миозином, что послужило причиной остановки для рекомендации его в качестве основы вакцины.

Кандидаты в вакцины должны быть нетоксичными, и важно, чтобы они имели вторичную и третичную структуру. Горизонтальная передача генов (обмен генов) может повлиять на защитные свойства белковых вакцин [15]. Ginsburg A.S et al. подробно останавливаются на экспериментальных вакцинах из поверхностного белка А, пневмолизинде (ана-форма пневмолизина), пневмококковом гистиридиновом белке Д, поверхностных белках, относящихся к JC47 антигенам, белкам пневмококковых ворсинок (Rtg B). В то же время, Tarahomjoo S. в своем обзоре [41] демонстрирует таблицу, в которой приводится ряд изученных в качестве вакцинных препаратов белков. Автор указывает, что белки, приготовленные из разных серотипов пневмококка, защищают от различных серотипов микроба. В работе проанализирован 21 белок патогена. Особая роль уделена пневмококковым поверхностным белкам А, С, пневмококковому адгезину А, пневмококковому протективному белку А, металлопротеиназе цинка В, белку теплового шока, белкам семейства гистиридиновой триады. Представлены данные, согласно которым одни белки защищают от отита, другие от пневмонии, третьи от колонизации. Автор наряду с другими исследователями придерживается мнения, что комбинация пневмококковых белков более эффективна, чем отдельные пневмококковые белки [41]. Однако нельзя не учитывать опубликованные работы, свидетельствующие о защитном действии отдельных белков у экспериментальных животных и людей [20, 24, 37].

В последние годы осуществляются испытания белковых вакцин, состоящих из комбинации следующих белков пневмококка: белка гистиридиновой триады Д, холинсвязывающего белка А, детоксицированного деривата пневмолизина [45]; пневмококкового поверхностного белка А и пневмококкового поверхностного белка С [43].

Изучается также иммуногенность тривалентной рекомбинантной белковой вакцины, в состав которой входят пневмококковый холинсвязывающий белок А, белок гистиридиновой триады Д и генетически детоксицированный пневмолизин [46].

На стадиях клинических испытаний находится ряд кандидатных препаратов на основе пневмококковых белков. Например, вакцина, состоящая из анатоксина пневмолизина и белка гистиридиновой триады Д, вызывала нарастание титров антител к белкам, входящим в нее, у детей в возрасте от 1 до 3 лет. При этом общие и местные реакции на введение препарата были сравнимы с таковыми при применении конъюгированной вакцины, в которой в качестве носителя используется белок D *Haemophilus influenzae*. Испытания вакцины проводили в Чехии [34]. Вакцина, приготовленная из анатоксина пневмолизина и белка Д гистиридиновой триады, прошла I и II фазы клинических испытаний у взрослых [23]. Препарат был иммуногенным по отношению к белкам, входящим в его состав, и не обладал реактогенностью и побочными действиями.



Наряду с конструированием вакцин из нескольких белков пневмококка проводятся испытания моновакцин. Примером могут служить препараты, включающие только пневмолизин (пневмолизойд), липопротеин SPO845 и ряд других белков [20, 33, 37].

Установлено, что не все белки *S. pneumoniae* обладают защитным действием в отношении пневмококковой инфекции. Так, в работе Lu J. et al. показано, что мутированный пневмолизин способствует выработке провоспалительных цитокинов на уровне немутированного пневмолизина, в то время как антитела к мутанту не обеспечивают протективный эффект. Поэтому пневмолизин (его мутант) в составе вакцины, по-видимому, скорее будет адьювантом, чем активным началом [25]. Pore C. et al. обсуждают, что токсичный пневмолизин обладает меньшей иммуногенной активностью по сравнению с пневмолизойдом [33]. В этой же работе делается предположение, согласно которому конъюгация поверхностного пневмококкового белка А с нетоксичной формой пневмолизина облегчит доставку поверхностного белка А к поверхности антигенпредставляющих клеток.

Пневмолизин, который является агонистом TLR4, может быть как активным действующим компонентом вакцины, так и адьювантом для других белков микроба. Работами Liu Y. et al. продемонстрировано, что при применении слитого с пневмолизинном белка пневмококка Dna J зарегистрировано повышение уровня IgG, IgA против Dna J в сыворотке и слюне мышей, соответственно, а также продукции ИЛ-17 по сравнению с опытами, в которых изучаемый белок применяли без пневмолизина [24]. В литературе обсуждается вопрос об участии пневмолизина в формировании пневмококковых биопленок в организме хозяина. Штаммы патогена, дефицитные по этому параметру, не формируют биопленок. В связи с этим, считается перспективным включение пневмолизина в состав вакцины против *S. pneumoniae* [39]. Другими исследователями установлено защитное действие пневмолизойда. Так, детоксицированный пневмолизин, применяемый как моновакцина, оказался нереактогенным и иммуногенным при испытании на 100 пациентах [20]. Повторная вакцинация значительно увеличивала уровень противопневмолизинных антител. Функциональная антительная активность продемонстрирована при работе с сыворотками, полученными от вакцинированных людей. Иными словами, одними исследователями продемонстрирован защитный эффект пневмолизойда, а другие его не наблюдали.

Группой Saxena S. et al. в 2015 г. был предложен липопротеин SPO845 из штамма TIGR4 в качестве кандидата в вакцину против пневмококковой инфекции. Доказано перекрестное протективное действие этого белка в отношении гетерологичных штаммов микроба [37].

Для создания полноценного иммунного ответа на белковые пневмококковые вакцины идет поиск разных адьювантов. Применяются агонисты TOLL-подобных рецепторов (прежде всего, TLR7, TLR9) [44], цельноклеточная убитая коклюшная вакцина или токсин этого микроба [34], живые аттенуированные микробы [47]. Все предлагаемые адьюванты в опытах на животных сравнивают с классическим адьювантом — гидроксидом алюминия. В этих экспериментах показано преимущество новых предлагаемых подходов по сравнению с гидроксидом алюминия [36, 44, 47].

Еще одним направлением является добавление одного или нескольких пневмококковых белков к конъюгированным вакцинам. Доклинические испытания таких препаратов также ведутся [15].

Использование белков пневмококка в качестве носителя для полисахари-

дов позволит получить вакцину, способную создавать иммунитет не только в отношении полисахаридов использованных серотипов. Pichichero M.E. приводит данные об исследовании разных доз, схем введения на формирование иммунного ответа на повторное введение препаратов, в которых в качестве носителя используется один пневмококковый белок в сочетании с одним полисахаридом, один белок и несколько полисахаридов, несколько белковых носителей с несколькими полисахаридами [31]. В 2014 г. были также опубликованы данные об успешном доклиническом испытании вакцины, в которой в качестве носителя был применен пневмококковый поверхностный белок А, конъюгированный с капсульным полисахаридом серотипа 6В. Авторами работы зарегистрирован подъем антител против белкового носителя [6].

Ведущие исследователи в области разработки пневмококковых вакцин считают необходимым при создании вакцины определить функции белков, из которых будет состоять препарат. Интересные результаты в связи с этим опубликованы Schachern P.A. et al. [38]. Экспериментаторы изучали жизнеспособность и вирулентность трех штаммов пневмококка — дикого, дефицитного по поверхностному белку С, дефицитному по поверхностному белку А и двойного мутанта. Разницы между мутантом по поверхностному белку А и двойным мутантом обнаружено не было. Авторы сделали вывод, что нет необходимости исключать поверхностный белок С из поликомпонентной вакцины, содержащей поверхностный белок А. Белки гистидинового триады — PhtA, PhtB, PhtD, PhtE играют существенную роль в патогенезе пневмококка, осуществляют прикрепление микроба к клеткам хозяина. В связи с этим, данные белки весьма перспективны для разработки пневмококковой вакцины [32].

В обзоре [3] подробно разобраны факторы патогенности пневмококка (включая разнообразные белки патогена) и проанализирована их протективная активность. Авторы работы дискутируют по поводу использования белков микроба в качестве кандидатов в пневмококковые вакцины.

Как известно, поверхностный белок А пневмококка включает в себя 3 семейства и 6 клайдов. Анализируя накопленные данные о зависимости строения белков пневмококка и их отношение к 1 или 2 семейству, можно сделать вывод о том, что деление рода *S. pneumoniae* на семейства определяется, прежде всего, различием белков, а не разным строением капсулы. Хотя некоторые типы капсулы чаще встречаются у организмов 1 или у патогенов 2 семейства [18]. Важное наблюдение было сделано при работе с пневмококковыми поверхностными белками А, происходящими из разных семейств пневмококка и относящимися к разным клайдам. Белки из клайдов 3 и 2, но не 2 и 4 или 2 и 5 обладали перекрестной защитой по отношению к микробам 1 — 4 клайдов. Следует отметить, что этот белок не защищал от патогена клайда 5 [30]. В 2013 г. была опубликована работа, в которой рекомендуется использовать в качестве кандидатов в вакцины поверхностные белки А как 1, так и 2 семейств [32].

Новым направлением в области создания белковых пневмококковых вакцин является использование белков теплового шока этого микроба. Препарат показал выраженную защиту от колонизации носоглотки серотипами 6В, 14 и от колонизации легких серотипом 19F на мышинной модели. Сыворотки от иммунизированных мышей вызывали формирование пассивной защиты, причем использование сыворотки от животных, иммунизированных несколькими белками, оказалось более эффективным, чем моносыворотки [9].

Наряду с определением протективной активности белков пневмококка

ведется изучение молекулярных и клеточных механизмов их действия на иммунную систему. Примером может послужить работа Cao J. et al., в которой описывается воздействие рекомбинантного холинсвязывающего белка пневмококка на TLR4 на поверхности дендритных клеток, увеличение экспрессии на них поверхностных молекул и секреция этими клетками цитокинов и хемокинов по MAPKs и NFκB-зависимым путям [8]. Хорошо изучено воздействие белков клеточной стенки микроба на TLR2 [28]. Также обсуждается вопрос о том, является ли активность пневмолизина TLR4-зависимым или TLR4-независимым процессом.

К серотипнезависимым вакцинам можно отнести цельноклеточные убитые вакцины. Примером может служить убитая 70% этанолом вакцина, состоящая из микробных клеток капсулодефицитного штамма D39. Адьювантом этой вакцины служил холерный токсин. Препарат вводили интраназально мышам линии BALB/c. Продемонстрирована защита от колонизации штаммами серотипа 19F, а также от летальной инфекции, вызванной микробами серотипов 3 и 6B. Сыворотки от этих животных пассивно защищали мышей от инвазивных заболеваний, ассоциированных с заражением штаммом D39 [50].

В обзоре Feldman C. et al. внимание также сфокусировано на белковых и цельноклеточных вакцинах [12].

Goncalves V.M. et al. сконструирована пневмококковая цельноклеточная вакцина, защищающая мышей от внутрибрюшинного заражения [16]. Препарат оказался эффективным и стабильным на протяжении 12 — 18 месяцев после приготовления.

Перспективным направлением вакцинологии является разработка цельноклеточных аттенуированных вакцин. К достоинствам этих препаратов относится их низкая стоимость приготовления. Аттенуированные цельноклеточные вакцины не требуют адьювантов. Однако не все антигены, содержащиеся в убитых бактериях, участвуют в протекции против пневмококка. Некоторые из этих антигенов могут мешать формированию защиты. Иммуногенные поверхностные антигены варьируют от серии к серии цельноклеточной вакцины [41].

В последние годы ведутся интересные разработки по созданию живых аттенуированных вакцин против пневмококка. Эти препараты также являются серотипнезависимыми. Wu K. et al. продемонстрировали, что приготовленная из штамма SPY1 вакцина создает защиту мышей и людей от колонизации микробами серотипами 19F и штаммом TIGR4 и от инвазивной инфекции, вызванной штаммом D39 и клиническими штаммами серотипов 6B и 3. Протективный эффект был выражен сильнее, чем у коммерческих вакцин [49]. Штамм, применяемый для конструирования этой вакцины, имел дефекты по трем факторам вирулентности: капсуле, тейхоевым кислотам и пневмолизину. Rosch J.W. считает перспективным для защиты от мукозальной и системной инфекции, вызванной *S. pneumoniae*, применять живые аттенуированные вакцины [35].

Появились статьи, в которых обсуждается конструирование бивалентной рекомбинантной вакцины против гриппа и пневмококка. PB2-KO штамм вируса гриппа, экспрессирующий поверхностный пневмококковый белок А, вызывал продукцию высоких титров специфических противогриппозных антител и антител против белка А в сыворотке и дыхательных путях мышей и защищал животных от летальной инфекции, индуцированной двумя этими патогенами. Мыши были полностью защищены от первичной и вторичной пневмококковой пневмонии [21, 42].

Опубликована работа, в которой обсуждается вопрос о том, может ли колонизация пневмококком слизистых оболочек оказывать защитное действие и предупреждать легочную инфекцию [48]. Авторы установили потерю такой защиты у мышей, дефицитных по нейтрофилам и В-лимфоцитам, и показали, что колонизация не защищала от пневмококковой инфекции мышей, дефицитных по CD4+ и ИЛ-17. Полученные данные наводят на мысль о том, что вакцинация против пневмококка должна приводить к формированию как гуморального, так и клеточного иммунитета.

Следует отметить, что во всех работах по созданию белковых вакцин против пневмококка используют рекомбинантные белки. В статье Vadesilho C.F. et al. приводятся данные об отсутствии протективной активности у линейных эпитопов и наличии таковой при использовании конформационных структур поверхностного пневмококкового белка А и поверхностного пневмококкового белка С [43]. В то же время, иммунизация мышей фрагментом из 100 аминокислот, расположенным в N-концевой области поверхностного белка А пневмококка, вызывала защиту от заражения *S.pneumoniae*. Выработка антител против конформационных эпитопов, присутствующих в N-терминальной области поверхностного белка А пневмококка, может оказаться важной стратегией для защиты от широкого круга серотипов возбудителя [43].

Интересные данные получены при изучении пневмококковых белков методами BLASTn и BLASTp, т.е. при определении последовательности нуклеотидов и аминокислот. Было проанализировано 22 белка пневмококка. Кандидатами в вакцины выбрали *ravB* и пуллулазазу [40].

Преимуществом ДНК-вакцин против пневмококка является то, что они создают выраженный гуморальный и клеточный иммунитет, как и другие ДНК-вакцины. Однако был выявлен и основной недостаток этих препаратов. Они формируют защиту только против гомологичного клэйда [26] или нескольких клэйдов. Защитный эффект был сравним с таковым рекомбинантного белка [12]. Для ДНК-вакцин требуется специальная система доставки. Хитозан — одна из таких систем [41].

Возможно, ограниченная перекрестная активность ДНК-вакцин объясняется отсутствием альтернативного сплайсинга и эпигенетических изменений при транскрипции РНК с ДНК-вакцины. В сравнительных экспериментах на животных было установлено, что рекомбинантные белки пневмококка вызывают более выраженную защиту и индуцируют более высокий уровень гомологичных антител, чем ДНК-вакцины на основе нуклеиновых кислот того же белка. ДНК-вакцина на основе пневмолизоида в опытах Ferreira D.M et al. вообще оказалась не эффективной [13, 14]. Перспективным является использование комбинированных ДНК/белковых вакцинных препаратов [29].

В НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова ведется изучение перекрестной внутривидовой протективной и серологической активности белоксодержащих антигенов пневмококка. В 2013 году опубликована статья, в которой представлены данные по защите от заражения серотипами 3 и 6В пневмококка мышей, иммунизированных белоксодержащими антигенами, полученными из серотипов 6В и 10А методом водной экстракции. Препараты из штаммов серотипов 6А, 6В, 14, 19А, 19F, 23F в реакции с антимикробными сыворотками характеризовались перекрестной серологической активностью (титр IgG 1200 — 12800) [4]. Ранее Ниселевичем В.Ф. и др. установлено, что иммунизация мышей препаратами из серотипов пневмококка 3R, 6R, R-36A, 3, полученными методом экстракции цетавлоном (серотип 3) или методом дезинтеграции ультразвуком (бескапсульные штаммы), защищают животных

от заражения штаммами серотипов 3, 9N, 23F [5]. Однако ни один из препаратов не приводил к 100% защите от летальной инфекции. Максимальный протективный эффект составил 62%.

В заключении следует отметить, что создание серотипнезависимых вакцин включает в себя четыре основных направления — конструирование белковых вакцин на основе рекомбинантных белков пневмококка, цельноклеточные убитые и аттенуированные вакцины, ДНК-вакцины и использование белков *S. pneumoniae* в качестве носителя для полисахаридных и конъюгированных вакцинных препаратов. Наиболее широко изученными являются белковые вакцины. ДНК-вакцины изучали в первой половине 2000-х годов, и сейчас этому вопросу уделяется меньше внимания. На наш взгляд, для конструирования эффективной противопневмококковой вакцины необходимо дальнейшее изучение патогенетических механизмов действия пневмококковых белков на организм хозяина и молекулярно-генетических процессов их влияния на иммунную систему.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев Д.С., Семенова И.Б. Пневмококковый поверхностный белок А и новые подходы к разработке пневмококковых вакцин. Журн. микробиол. 2011, 6: 107-113.
2. Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Курбатова Е.А. Белки *Streptococcus pneumoniae*: перспективы для создания вакцины против пневмококковой инфекции. Журн. микробиол. 2010, 6: 98-103.
3. Костокова Н.Н., Бехало В.А. Факторы патогенности пневмококка и их протективные свойства. Журн. микробиол. 2014, 3:67-77.
4. Курбатова Е.А., Воробьев Д.С., Егорова Н.Б., Батуро А.П., Романенко Э.Е., Маркова М.Е., Елкина С.И., Волох Ю.В., Цветков Ю.Е., Сухова Е.В., Яшунский Д.В., Нифантьев Н.Э., Михайлова Н.А. Штаммовые различия внутривидовой иммуногенной активности антигенных компонентов *Streptococcus pneumoniae*. Журн. микробиол. 2013, 5: 60-69.
5. Нисилевич В.Ф., Пугачева Н.Л., Падюков Л.Н., Грубер И.М., Решилов Л.Н. Сравнительный анализ антигенных препаратов из некапсульных штаммов пневмококка. Журн. микробиол. 1987, 1: 8-12.
6. Barazzone G.C, Pinto V, Donnarumma D. et al. Identification of glycosylated regions in pneumococcal PspA conjugated to serotype 6B capsular polysaccharide. *Glycoconj. J.* 2014, 31 (3): 259-269.
7. Butler J.C, Shapiro E.D., Carlone G.M. Pneumococcal vaccines: history, current status, and future directions. *Am. J. Med.* 1999, 107 (1A): 69S-76S.
8. Cao J., Gong Y., Dong S. et al. Pneumococcal ClpP modulates the maturation and activation of human dendritic cells: implications for pneumococcal infections. *J. Leukoc. Biol.* 2013, 93 (5): 737-749.
9. Cao J., Zhang X., Gong Y. et al. Protection against pneumococcal infection elicited by immunization with multiple pneumococcal heat shock proteins. *Vaccine.* 2013, 31 (35): 3564-3571.
10. Croucher N.J., Chewapreecha C., Hanage W.P. et al. Evidence for soft selective sweeps in the evolution of pneumococcal multidrug resistance and vaccine escape. *Genome. Biol. Evol.* 2014, 6 (7): 1589-1602.
11. Darrieux M., Goulart C., Briles D., Leite L.C. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines. *Crit. Rev. Microbiol.* 2015, 41 (2): 190-200.
12. Feldman C., Anderson R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines. *J. Infect.* 2014, 69 (4): 309-325.
13. Ferreira D.M., Arêas A.P., Darrieux M. et al. DNA vaccines based on genetically detoxified derivatives of pneumolysin fail to protect mice against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 2006, 46 (2): 291-297.
14. Ferreira D.M., Miyaji E.N., Oliveira M.L. et al. DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein. *J. Med. Microbiol.* 2006, 55 (4): 375-378.

15. Ginsburg A.S., Nahm M.H., Khambaty F.M., Alderson M.R. Issues and challenges in the development of pneumococcal protein vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*. 2012, 11 (3): 279-285.
16. Gonçalves V.M., Dias W.O., Campos I.B. et al. Development of a whole cell pneumococcal vaccine: BPL inactivation, cGMP production, and stability. *Vaccine*. 2014, 32 (9): 1113-1120.
17. Hilty M., Wüthrich D., Salter S.J. et al. Global phylogenomic analysis of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* reveals a deep-branching classic lineage that is distinct from multiple sporadic lineages. *Genome Biol. Evol.* 2014, 6 (12): 3281-3294.
18. Hotomi M., Togawa A., Kono M. et al. PspA family distribution, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolated from upper respiratory tract infections in Japan. *PLoS One*. 2013, 8 (3): e58124.
19. Janoir C., Cohen R., Levy C. et al. Clonal expansion of the macrolide resistant ST386 within pneumococcal serotype 6C in France. *PLoS One*. 2014, 9 (3): e90935.
20. Kamtchoua T., Bologa M., Hopfer R. et al. Safety and immunogenicity of the pneumococcal pneumolysin derivative PlyD1 in a single-antigen protein vaccine candidate in adults. *Vaccine*. 2013, 31 (2): 327-333.
21. Katsura H., Piao Z., Iwatsuki-Horimoto K. et al. A bivalent vaccine based on a replication-incompetent influenza virus protects against *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus infection. *J. Virol.* 2014, 88 (22): 13410-13417.
22. Kim T.H., Johnstone J., Loeb M. Vaccine herd effect. *Scand. J. Infect. Dis.* 2011, 43 (9): 683-689.
23. Leroux-Roels G., Maes C., De Boever F. et al. Safety, reactogenicity and immunogenicity of a novel pneumococcal protein-based vaccine in adults: a phase I/II randomized clinical study. *Vaccine*. 2014, 32 (50): 6838-6846.
24. Liu Y., Wang H., Zhang S. et al. Mucosal immunization with recombinant fusion protein DnaJ- $\Delta$ A146Ply enhances cross-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice via interleukin 17A. *Infect. Immun.* 2014, 82 (4): 1666-1675.
25. Lu J., Sun T., Hou H. et al. Detoxified pneumolysin derivative Plym2 directly protects against pneumococcal infection via induction of inflammatory cytokines. *Immunol. Invest.* 2014, 43 (7): 717-726.
26. Miyaji E.N., Ferreira D.M., Lopes A.P. et al. Analysis of serum cross-reactivity and cross-protection elicited by immunization with DNA vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades. *Infect. Immun.* 2002, 70 (9): 5086-5090.
27. Miyaji E.N., Oliveira M.L., Carvalho E., Ho P.L. Serotype-independent pneumococcal vaccines. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2013, 70 (18): 3303-3326.
28. Moffitt K., Howard A., Martin S. et al. TH17-mediated protection against pneumococcal carriage by a whole cell vaccine is dependent on Toll-like receptor 2 and surface lipoproteins. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015, 22 (8): 909-916.
29. Moore Q.C., Bosarge J.R., Quin L.R., McDaniel L.S. Enhanced protective immunity against pneumococcal infection with PspA DNA and protein. *Vaccine*. 2006, 24 (29-30): 5755-5761.
30. Piao Z., Akeda Y., Takeuchi D. et al. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine*. 2014, 32 (43): 5607-5613.
31. Pichichero M.E. Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013, 9 (12): 2505-2523.
32. Plumtre C. D., Ogunniyi A. D., Paton J. C. Surface association of Pht proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2013, 81 (10): 3644-3651.
33. Pope C., Oliver E.H., Ma J. et al. Genetic conjugation of components in two pneumococcal fusion protein vaccines enhances paediatric mucosal immune responses. *Vaccine*. 2015, 30; 33 (14): 1711-1718.
34. Prymula R., Pazdiora P., Traskine M. et al. Safety and immunogenicity of an investigational vaccine containing two common pneumococcal proteins in toddlers: a phase II randomized clinical trial. *Vaccine*. 2014, 23; 32 (25): 3025-3034.
35. Rosch J.W. Promises and pitfalls of live attenuated pneumococcal vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014, 10 (10): 3000-3003.
36. Salcedo-Rivillas C., Debie A.S., Miyaji E.N. et al. Pertussis toxin improves immune re-

- sponses to a combined pneumococcal antigen and leads to enhanced protection against *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2014, 21 (7): 972-981.
37. Saxena S., Khan N., Dehinwal R. et al. Conserved surface accessible nucleoside ABC transporter component SP0845 is essential for pneumococcal virulence and confers protection in vivo. *PLoS One.* 2015, 17; 10 (2): e0118154.
  38. Schachern P.A., Tsuprun V., Ferrieri P. et al. Pneumococcal PspA and PspC proteins: potential vaccine candidates for experimental otitis media. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2014, 78 (9): 1517-1521.
  39. Shak J.R., Ludewick H.P., Howery K.E. et al. Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. *MBio.* 2013, 4 (5): e00655-13.
  40. Talukdar S., Zutshi S., Prashanth K.S. et al. Identification of potential vaccine candidates against *Streptococcus pneumoniae* by reverse vaccinology approach. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014, 172 (6): 3026-3041.
  41. Tarahomjoo S. Recent approaches in vaccine development against *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 24 (4): 215-227.
  42. Uraki R., Piao Z., Akeda Y. et al. A bivalent vaccine based on a PB2-knockout influenza virus protects mice from secondary pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.* 2015, 212 (12): 1939-1948.
  43. Vadesilho C.F., Ferreira D.M., Gordon S.B. et al. Mapping of epitopes recognized by antibodies induced by immunization of mice with PspA and PspC. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2014, 21 (7): 940-948.
  44. Vecchi S., Bufali S., Uno T. et al. Conjugation of a TLR7 agonist and antigen enhances protection in the *S. pneumoniae* murine infection model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014, 87 (2): 310-317.
  45. Verhoeven D., Perry S., Pichichero M.E. Contributions to protection from *Streptococcus pneumoniae* infection using the monovalent recombinant protein vaccine candidates PcpA, PhtD, and PlyD1 in an infant murine model during challenge. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2014, 21 (8): 1037-1045.
  46. Verhoeven D., Xu Q., Pichichero M.E. Vaccination with a *Streptococcus pneumoniae* trivalent recombinant PcpA, PhtD and PlyD1 protein vaccine candidate protects against lethal pneumonia in an infant murine model. *Vaccine.* 2014, 30; 32 (26): 3205-3210.
  47. Vintiñi E.O., Medina M. Immune response in nasopharynx, lung, and blood elicited by experimental nasal pneumococcal vaccines containing live or heat-killed lactobacilli as mucosal adjuvants. *J. Physiol. Pharmacol.* 2014, 92 (2): 124-131.
  48. Wilson R., Cohen J.M., Jose R.J. et al. Protection against *Streptococcus pneumoniae* lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. *Mucosal. Immunol.* 2015, 8 (3): 627-639.
  49. Wu K., Yao R., Wang H. et al. Mucosal and systemic immunization with a novel attenuated pneumococcal vaccine candidate confer serotype independent protection against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Vaccine.* 2014, 16; 32 (33): 4179-4188.
  50. Xu X., Meng J., Wang Y. et al. Serotype-independent protection against pneumococcal infections elicited by intranasal immunization with ethanol-killed pneumococcal strain, SPY1. *J. Microbiol.* 2014, 52 (4): 315-323.

*Поступила 20.01.16*

Контактная информация: Семенова Ирина Борисовна, д.м.н.,  
105064, Москва, М. Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-57-74

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МЕЛИОИДОЗА И САПА НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ И ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Представлен анализ публикаций результатов изучения влияния различных антигенов *Burkholderia pseudomallei* и *B. mallei* на операционные характеристики (чувствительность и специфичность) тестов для диагностики мелиоидоза и сапа на основе реакции пассивной гемагглютинации и твердофазного иммуноферментного анализа. Рассмотрены способы выделения двух типов антигенов: лизатных (получены путем лизиса клеток бактерий) и рекомбинантных (получены генно-инженерным способом, аналоги определенных антигенов возбудителя). Показаны перспективы получения универсальных антигенов *B. pseudomallei* и *B. mallei* для тест-систем на основе реакции пассивной гемагглютинации и твердофазного иммуноферментного анализа и применения их для эффективной диагностики мелиоидоза и сапа в эндемичных регионах.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 86—95

Ключевые слова: мелиоидоз, сап, *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, антигены, антитела, диагностика, реакция пассивной гемагглютинации, твердофазный иммуноферментный анализ, чувствительность, специфичность

А.А.Будченко

## EFFECTIVENESS OF A TEST-SYSTEM FOR DIAGNOSTICS OF MELIOIDOSIS AND GLANDERS BASED ON PASSIVE HEMAGGLUTINATION REACTION AND SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY

Volgograd Research Institute of Plague Control, Russia

Analysis of published results of studies of effect of various antigens of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* on operation characteristics (sensitivity and specificity) of tests for diagnostics of melioidosis and glanders based on reaction of passive hemagglutination and solid-phase enzyme immunoassay is presented. Methods of isolation of 2 types of antigens are examined: lysate (obtained by lysis of bacterial cells) and recombinant (obtained by genetic engineering, analogues of the determined antigens of the causative agent). Perspectives of production of universal antigens of *B. pseudomallei* and *B. mallei* for test-systems based on passive hemagglutination and solid-phase enzyme immunoassay and their application for effective diagnostics of melioidosis and glanders in endemic regions are shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 86—95

Key words: melioidosis, glanders, *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, antigens, antibodies, diagnostics, passive hemagglutination reaction, solid-phase enzyme immunoassay, sensitivity, specificity

Мелиоидоз и сап — опасные болезни человека и животных, возбудители которых, бактерии рода буркгольдерий *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*, относятся ко второй группе патогенности (опасности) [6]. Мелиоидоз — инфекция, эндемичная в районах Юго-Восточной Азии и Северной Австралии, в Российской Федерации не регистрировалась. Эпизотии сапа в последние годы отмечены в Монголии, Иране, Ираке, Турции. В Российской



Федерации сап ликвидирован в начале XX века [7]. Однако с увеличением миграции населения и развитием туризма в эти страны становится возможным завоз возбудителей сапа и мелиоидоза в Российскую Федерацию. Кроме того, эти возбудители с 40-х годов прошлого века являлись агентами бактериологического (биологического) оружия [35]. Мелиоидоз — инфекция из группы сапронозов, характеризуется острой или хронической септикопиемией. Заболевание может протекать в септической, легочной, латентной и рецидивирующей форме [15]. Без своевременного лечения летальность от заболевания часто близка к 100%. Ввиду полиморфизма клинических проявлений болезни диагностика мелиоидоза часто оказывается затруднительной. Несмотря на то, что «золотым стандартом» постановки диагноза мелиоидоза и сапа является выделение от больного культуры возбудителя, в эндемичных по этим заболеваниям регионах для ускоренной диагностики применяют реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА) и твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) [30, 33]. Эти же методы совместно с ПЦР составляют основную группу методов индикации возбудителей мелиоидоза и сапа [3].

Сенсибилизация эритроцитов и лунок полистироловых панелей антигенами (Ag) — один из основных этапов РПГА и ТИФА, при котором на эритроцитах и стенках лунок адсорбируются Ag [19]. После внесения в эти лунки образцов (сывороток) на поверхности эритроцитов и стенках лунок формируются иммунные комплексы, которые и выявляются в РПГА характерной агглютинацией эритроцитов, в ТИФА — изменением цвета смеси реагентов [4].

Основным требованием к диагностическим тест-системам является их способность со 100% чувствительностью и 100% специфичностью диагностировать инфекцию. В тест-системах на основе РПГА и ТИФА это достигается соблюдением требуемых условий прохождения реакций и подбором реагентов: Ag, антител (At), эритроцитов. При этом, основным реагентом, доступным для подбора, является Ag, который получают и очищают различными способами. В зависимости от используемых Ag рассматриваемые тест-системы делятся на три типа: 1) лизатные (используется Ag, полученный лизированием бактериальной массы возбудителя инфекции); 2) рекомбинантные (в качестве Ag используются полученные генно-инженерным способом протеины — аналоги белковых Ag возбудителя); 3) пептидные (в качестве Ag применяются синтезированные протеины) [2]. К настоящему времени основательно разработаны первые два типа тест-систем.

В обзоре проведен анализ опубликованных результатов изучения влияния Ag *B. pseudomallei* и *B. mallei*, полученных и очищенных, на эффективность лизатных и рекомбинантных тест-систем для диагностики мелиоидоза и сапа на основе РПГА и ТИФА.

После разработки в 50-х годах прошлого века метод РПГА успешно применялся для диагностики мелиоидоза у людей [12] и животных (свиней, овец, коз [19, 22, 32]) в эндемичных по данной инфекции районах. Ag получали по методике Rise C.E. et al. [28]. При этом изучались, в основном, чувствительность и специфичность метода в зависимости от взятых для анализа иммунных сывороток или сывороток больных. Однако уже в эти годы обратили внимание на зависимость чувствительности и специфичности РПГА от используемого для сенсибилизации Ag [15]. Большой вклад в разработку этой проблемы внесли отечественные исследователи. Ими в эти годы были получены для применения в РПГА цельноклеточный мелиоидозный Ag [Лозовой Н.В. и др., 1964], фракции этого Ag, выделенные высаливанием в сульфате аммония и

препаративным электрофорезом [8]. Весомый вклад в изучение этих проблем внесли Пивень Н.Н. и др., которые, изучив сыворотки зараженных мелиоидозом животных, показали, что синтез специфических Аг происходит на Аг b и Аг d из состава цельноклеточного мелиоидозного Аг [5]. В связи с отсутствием в Российской Федерации сывороток людей, больных мелиоидозом и сапом, изучение зависимости чувствительности и специфичности тест-систем для диагностики этих инфекций у людей на основе РПГА и ТИФА не проводилось.

Первое исследование использования РПГА с оценкой чувствительности и специфичности для диагностики мелиоидоза у людей выполнили американские ученые из военного медицинского центра в Вашингтоне в 1970 г. [9]. В этой работе Alexander A.D. et al. использовали три штамма *B.pseudomallei* (один из китайской коллекции, два изолированы от больных американских солдат из Вьетнама и Бирмы). Аг получали по методике Rise C.E. et al.: безбелковую жидкую среду, в которой выращивали бактерии в течение 2 недель при 37°C, стерилизовали нагреванием, фильтровали и концентрировали пятикратно испарением [28]. Было установлено, что при сенсибилизации эритроцитов Аг каждого штамма, смесью Аг двух и смесью Аг трех штаммов параметры РПГА не изменялись. В дальнейшем в исследовании в качестве сенсибилизирующего Аг использовали смесь Аг трех штаммов. Для оценки операционных характеристик тест-системы на основе РПГА тестировали 402 сыворотки от 112 больных мелиоидозом, 122 сыворотки больных другими инфекциями. Чувствительность тест-системы при диагностике мелиоидоза оказалась равной 95,53%, специфичность — 91,2%. Высокие значения операционных параметров тест-системы указывали на ее эффективность, что и позволило авторам сделать вывод о ценности РПГА в качестве инструмента для диагностики мелиоидоза у человека.

В 70-х годах прошлого века, был разработан для выявления и количественного определения Аг и Ат простой и чувствительный метод — твердофазный иммуоферментный анализ [18]. Этот метод вскоре был применен для диагностики мелиоидоза. Практически сразу же начались поиски Аг, который обеспечил бы наибольшие чувствительность и специфичность теста. РПГА с Аг, полученным по методике Rise C.E. et al., в этих работах чаще применялась для сравнения с ТИФА [28].

В 1989 г. Ashdown L.R. et al. сообщили о результатах сравнительного анализа применения ТИФА с выявлением IgG и IgM и традиционного РПГА при диагностике различных форм мелиоидоза [11]. В ТИФА использовали смесь клеточных Аг 8 штаммов *B.pseudomallei*. Аг получали из бактериальной массы, выращенной на триптиказо-соевом агаре в течение 24 часов при 35°C, стерилизованной прогреванием и обработанной ультразвуком. Для оценки тест-систем на основе ТИФА и РПГА были взяты 140 сывороток больных мелиоидозом и 149 сывороток больных другими болезнями. Чувствительность ТИФА с выявлением IgG при острой фазе мелиоидоза составила 93%, при конвалесцентной фазе — 95%, специфичность — 96%. При этом, чувствительность РПГА при выявлении этих же Ат в острой фазе составила 85%, в конвалесцентной фазе — 92%, специфичность — 100%. Авторы сделали вывод, что метод ТИФА быстр, надежен, достаточно прост и доступен.

В это же время, в целях получения тест-систем с 100% чувствительностью и 100% специфичностью, что является необходимым при диагностике острой формы мелиоидоза, которая приводит к летальному исходу в течение 48 часов после заражения [Chaowagul W. et al., 1989], использовали одновременно оба

метода — ТИФА и РПГА с выявлением IgG и IgM [21]. В ТИФА применяли клеточные Ag *B.pseudomallei*, выделенные из бактериальной массы суточной культуры на кровяном агаре, обработанной ультразвуком. В РПГА использовали Ag, полученные по методике Rise C.E. et al. [28]. Было установлено, что ТИФА с обнаружением IgM диагностирует мелиоидоз в острой форме. РПГА эффективнее обнаруживал Ат к Ag *B.pseudomallei* при хронической форме болезни. Комбинация ТИФА и РПГА обеспечивала, по мнению авторов, самую точную диагностику мелиоидоза. В этой работе для выявления более эффективной тест-системы был использован анализ операционной характеристической кривой, известный как ROC-анализ, изначально разработанный для анализа изображений на экранах радиолокационных станций и позже адаптированный для оценки чувствительности и специфичности диагностических тестов, в том числе тестов для диагностики мелиоидоза у животных и человека на основе РПГА и ТИФА [1, 21, 23].

Эндотоксин (липополисахарид) стал следующим Ag, который использовали в ТИФА для диагностики мелиоидоза Petkanjanapong V. et al. [25]. Ag выделяли из лизата бактериальной массы 5 штаммов *B.pseudomallei*, выращенной в течение 4 суток на твердой питательной среде, используя водно-фенольный метод по Вестфалу [34]. Для оценки иммуноферментной тест-системы для диагностики мелиоидоза с эндотоксином и тест-системы на основе РПГА использовали 47 сывороток больных мелиоидозом, 55 сывороток больных другими инфекциями. Чувствительность и специфичность ТИФА составили 95,7% и 94,2% соответственно. Чувствительность, специфичность РПГА имели значения соответственно 81,0% и 91,4%, что ниже значений аналогичных параметров ТИФА: Применив ROC-анализ, авторы сравнили полученные значения операционных характеристик ТИФА и РПГА при диагностике мелиоидоза и установили, что более эффективной оказался ТИФА [25].

Важным шагом в изучении зависимости операционных характеристик иммуноферментной тест-системы для диагностики мелиоидоза от используемого Ag стала работа Anuntagool N. et al. [11]. Авторами были получены и протестированы 5 иммуноферментных тест-систем с Ag, выделенными из бактериальной массы штамма *B. pseudomallei*, выращенной на кровяном агаре и стерилизованной кипячением. Это были: грубый экстракт — полный набор клеточных Ag; вероналовый экстракт — выделенный из грубого экстракта; две иммуногенные фракции 19,5 kDa и 39,0 kDa, элюированные из ПААГ после электрофореза грубого экстракта; Ag, выделенный из грубого экстракта аффинной хроматографией на Sepharose 4B с моноклональным Ат, специфичным Ag *B. pseudomallei*. Для оценки этих тест-систем использовали 37 сывороток больных септическим мелиоидозом, 25 сывороток больных другими болезнями. Наибольшая специфичность (94%) была достигнута при использовании в ТИФА аффинно очищенного Ag, чувствительность при этом составляла 81%. Однако наиболее эффективной оказалась ТИФА с очищенным 19,5 kDa Ag: чувствительность составляла 92%, специфичность — 91%. При этом фракция 19 kDa была выявлена на иммуноэлектрофореграмме *B.ceracia*, что уменьшило значение специфичности этой тест-системы. Авторы сочли этот факт не столь важным, так как инфекции, вызванные *B.ceracia*, в их регионе встречаются редко [11].

Поиск оптимального Ag, получаемого лизисным путем, продолжили Phung L.V. et al., которые в 1995 году использовали в качестве сенсibiliзирующего Ag для ТИФА очищенный гликолипид штамма *B.pseudomallei* [26]. Этот вариант ТИФА выявлял IgG к Ag *B.pseudomallei* в сыворотках больных мелиоидозом

зом с чувствительностью 98% и специфичностью 98,9%. Совместное применение ТИФА и РПГА обеспечивало обнаружение иммуноглобулинов с чувствительностью 100% и специфичностью 97,8%.

В том же году Rugdech P. et al. охарактеризовали выделенный с помощью аффинной хроматографии поверхностный Ag *B.pseudomallei* с молекулярной массой 200 kDa [29]. Было показано, что ТИФА с этим Ag эффективен для обнаружения IgG к Ag *B.pseudomallei*. Следует отметить исследование, в котором Dharakul T. et al. выяснили, что применение ТИФА с аффинно очищенным 200 kDa Ag позволяло ускоренно обнаружить в сыворотках больных мелиоидозом IgG и IgM к Ag *B.pseudomallei* с чувствительностью 85,7% и 63,7% и со специфичностью 82,5% и 81,8% соответственно [17]. Параметры этой тест-системы были выше, чем параметры РПГА, которая выявляла Ag к Ag *B.pseudomallei* в сыворотках больных с чувствительностью равной 71% и специфичностью — 74,7%. Вариант ТИФА с 200 kDa Ag и с обнаружением IgG позволил диагностировать септический мелиоидоз и его локализованные формы с чувствительностью 87,8% и 82,6% соответственно. Авторы рекомендовали применять этот вариант ТИФА для диагностики мелиоидоза в эндемичных областях.

Sirisinha S. et al. в 2000 г. провели сравнительный анализ пяти методов диагностики мелиоидоза, использующихся в практической медицине в Таиланде: бактериологический, иммунохроматографический, ТИФА, РПГА, иммуноблоттинг [31]. В ТИФА применяли Ag *B.pseudomallei*: аффинно очищенный 200 kDa компонент клеточных Ag; ЛПС; культуральный фильтрат (основной компонент — протеин 30 kDa). В РПГА использовали ЛПС, фенольно-водный экстракт по Вестфалу [34] и мелиоидин, полученный по методике Rise C.E. et al. [28]. Для оценки чувствительности и специфичности тест-систем использовали 57 сывороток больных мелиоидозом и 44 сыворотки больных другими инфекциями. Максимальной чувствительностью обладал РПГА с мелиоидином — 93%. Однако специфичность при этом была минимальной — 34%. Наиболее эффективной оказалась ТИФА с культуральным фильтратом, выявляющая IgG с чувствительностью 82% и специфичностью 80%. Основываясь на этих результатах, авторы сделали вывод: бактериологический метод, несмотря на новые технологии и недостатки (длительное время постановки окончательного диагноза — до 4 суток), остается методом выбора из-за своей надежности, простоты и низкой стоимости. Для ускорения диагностики авторы предложили использовать комбинацию методов: бактериологического (в течение 18 часов микроорганизмы выращивать на питательной среде) и ПЦР или одного из иммунологических методов для установки окончательного диагноза. Такой вариант тестов ускорял постановку диагноза с 3 — 4 дней до 18 — 36 часов [31].

В другом исследовании Chenthamarakshan V. et al. выявляли IgG и IgM к Ag *B.pseudomallei*, предложенной ими ТИФА с Ag — фильтратом бульонной культуры возбудителя мелиоидоза [16]. В работе использовали 95 сывороток больных мелиоидозом, 225 сывороток больных другими инфекциями. Авторы установили, что чувствительность и специфичность ТИФА с выявлением IgG составили 96% и 94%. ТИФА с выявлением IgM — 74% и 99% соответственно. Авторы сделали вывод: обнаружение IgG — лучший индикатор болезни мелиоидозом.

Спустя 6 лет Chantratita N. et al. сообщили о результатах изучения диагностики мелиоидоза в Таиланде с применением 5 вариантов ТИФА, в которых использовались 5 различных Ag штаммов *B.pseudomallei* K96243 и *B.thailand*

densis E32: грубый экстракт из бактериальной массы штаммов, липополисахарид (LPS) и экзополисахарид (EPS), выделенные фенольно-хлороформным методом и аффинно очищенный Ag [13, 29, 34]. Для сравнения применяли РПГА с Ag по Rise C.E. et al. [28]. Тестировали 120 сывороток больных мелиоидозом, 202 сыворотки больных другими инфекциями. Наибольшая чувствительность была показана в ТИФА с аффинно очищенным Ag (82%), а наибольшая специфичность — в ТИФА с ЭПС — 81%. РПГА выявлял IgG с чувствительностью равной 73%, специфичностью — 64%. Авторы сделали вывод, что диагностика мелиоидоза ТИФА значительно совершеннее диагностики РПГА.

Таким образом, к настоящему времени изучено применение тест-систем для диагностики мелиоидоза на основе РПГА и ТИФА с лизатными Ag *V. pseudomallei*: фильтратом жидкой культуры, эндотоксином, цельноклеточными Ag, ЭПС, ЛПС, очищенным гликолипидом, аффинно очищенными Ag, белковыми Ag с молекулярной массой 19,5 и 39 kDa. Выявлены наиболее эффективные тест-системы.

В начале XXI века публикуются первые сообщения об изучении применения в ТИФА для диагностики мелиоидоза в качестве Ag рекомбинантных белков. Эти авторы считают, что их применение не только повысит чувствительность и специфичность тест-систем, но сделает работу персонала в лабораториях более безопасной от заражения [14].

В 2003 г. Chen Y.-S. et al. сообщили о получении двух рекомбинантных белков: аналога флагеллина (состоит из 387 аминокислот) и укороченного на 80 аминокислот варианта этого белка и создании на их основе иммуноферментной тест-системы для диагностики мелиоидоза [14]. Ранее ими было установлено, что аминокислотная последовательность белка флагеллина имеет гомологию 33—46% с аналогичными последовательностями *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* и др. В то же время, и N- и C-концевые аминокислотные последовательности (аминокислоты 1—40 и 300—387) имеют гомологию 50—67% с аналогичными последовательностями вышеназванных бактерий. Авторы получили ДНК укороченного варианта гена флагеллина без фрагментов ДНК, соответствующих названному концевым аминокислотным последовательностям. Затем были получены и очищены протеины — аналог флагеллина и его укороченный вариант, которые и были использованы в ТИФА для диагностики мелиоидоза. Для оценки операционных характеристик этих тест-систем тестировали 32 сыворотки больных септическим мелиоидозом (16 больных), 100 сывороток больных другими инфекциями. Наибольшей чувствительностью (93,8%) и специфичностью (96,3%) обладала иммуноферментная тест-система с укороченным флагеллином, которую авторы рекомендовали применять для диагностики мелиоидоза в Тайване.

Тремя годами позже Allwood E.M. et al. сообщили о получении трех рекомбинантных протеинов (BPSL0972, BipD и OmpA), аналогов соответствующих белков штамма *V. pseudomallei* K96243, и создании на их основе иммуноферментных тест-систем для диагностики мелиоидоза [10]. Для оценки операционных характеристик этих тест-систем тестировали 74 сыворотки больных мелиоидозом и 20 сывороток больных другими инфекционными болезнями. Было установлено, что из полученных трех тест-систем ТИФА с OmpA диагностирует мелиоидоз с наибольшими чувствительностью (95%) и специфичностью (98%). Авторы сделали вывод, что белок OmpA оптимальный Ag для иммуноферментных тест-систем, создаваемых для диагностики мелиоидоза.

Следует отметить современное исследование, в котором Puah S.M. et al. выделили 6 рекомбинантных белков и применили их в ТИФА для диагностики мелиоидоза [27]. На первом этапе, используя 4 штамма *V.pseudomallei* и систему NovaTopeSystem (Novagen, USA), авторы получили геномную библиотеку: набор фрагментов ДНК размером 50 — 200 bp. Затем получили набор рекомбинантных полипептидов с молекулярными массами 46 — 48 kDa, из которых по результатам тестирования на иммуногенность в иммуноблоттинге с иммунными сыворотками к Ag *V.pseudomallei* были отобраны, очищены и идентифицированы 6 иммуногенных полипептидов. Для оценки операционных характеристик иммуноферментных тест-систем с полученными 6 Ag тестировали 60 сывороток больных мелиоидозом, 60 сывороток больных другими инфекциями.

Результаты показали, что наибольшими значениями операционных характеристик обладали тест-системы с протеинами BPSS1904 (чувствительность 78,9%, специфичность 79,4%) и BPSL3130 (чувствительность 79,4%, специфичность 94,8%). Авторы сделали вывод: пептиды BPSS1904 и BPSL3130 являются оптимальными Ag для сенсibilизации пластин в ТИФА при диагностике мелиоидоза. Недостаточную же чувствительность предлагаемых тест-систем рекомендовалось компенсировать использованием комбинации двух рекомбинантных Ag или рекомбинантного и лизатного [27].

Рассмотренные исследования в большей степени касались создания тест-систем для диагностики мелиоидоза. В последние годы были опубликованы результаты работ по разработке иммуноферментных тест-систем для диагностики сапа и дифференциации его от мелиоидоза. Так, Kumar S. et al. в 2011 г. сообщили об изучении применения полученного рекомбинантного белка гVimA в тест-системе для диагностики сапа [20]. В процессе получения часть из vimA гена была амплифицирована PCR, клонирована в pET векторе и экспрессирована в *Escherichia coli*. Иммуногенность очищенного протеина гVimA с молекулярной массой 12,2 kDa установлена в иммуноблоттинге с His-моноклональным Ag. Тестирование 21 сыворотки больных лошадей и 10 сывороток больных людей методом ТИФА с белком гVimA позволило диагностировать сап с чувствительностью равной 100%. Для оценки специфичности полученной тест-системы с белком гVimA использовали 1524 сыворотки лошадей, больных другими инфекциями. Специфичность составила 98,88%. При этом, тестирование этой тест-системой 10 сывороток людей, больных мелиоидозом, не выявило перекрестных реакций. Авторы, охарактеризовав иммуноферментную тест-систему с гVimA как простую, чувствительную и специфичную при диагностике сапа, рекомендовали ее для применения в эндемичных районах. В 2012 г. Pal V. et al. сообщили о результатах дальнейшей работы по поиску рекомбинантных протеинов — аналогов иммуногенных белков *V.mallei* [24]. Для этого были сравнены с помощью программы BLAST около 3000 генов (секвенированных последовательностей штамма *V. mallei* NTCC 10229), сиквенсов штаммов *V. pseudomallei*, *V.thailandensis* и др. бактерий, взятых из Pathema-Burkholderia Bioinformatics Resource Center (<http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Burkholderia/PathemaHomePage.cgi>). В результате этого анализа были отобраны для оценки возможности использования при создании специфичных диагностических препаратов три гена штамма *V.mallei* NCTC 10229: VMA10229\_0375, VMA10229\_0376, VMA10229\_A3050. Они были представлены во всех штаммах *V.mallei* и отсутствовали в большинстве штаммов *V.pseudomallei* и *V.thailandensis* и других бактерий. Затем были экспрессированы, очищены и

тестированы на иммуногенность в иммуноблоттинге с His-моноклональным антителом 4 рекомбинантных белка с молекулярными массами 18, 10, 17, 22 kDa, соответствующие этим генам. Операционные характеристики тест-систем ТИФА, использующих эти протеины в качестве Аг, оценивали, тестируя 21 сыворотку больных мелиоидозом лошадей и 102 сыворотки лошадей, больных другими инфекциями. Было установлено, что ТИФА с белками 0375Н, 0375ТН выявлял Аг к *Ag. V. mallei* со 100% чувствительностью и 100% специфичностью. Тест-системы ТИФА с рекомбинантными белками 0376ТН и А3050Н имели более низкие чувствительность (71,4% и 80,9%) и специфичность (96% и 92%). Авторы, протестировав 10 сывороток людей, больных мелиоидозом, доказали способность тест-системы ТИФА с белками 0375Н и 0375ТН дифференцировать заболевания людей мелиоидозом и сапом. Эти публикации позволяют сделать вывод о высокой эффективности тест-систем ТИФА с рекомбинантными белками для диагностики мелиоидоза и сапа.

В рассмотренных сообщениях представлены сконструированные тест-системы для диагностики сапа и мелиоидоза на основе РПГА и ТИФА как с лизатными, так и с рекомбинантными Аг, разработанные методики и результаты тестирования их на чувствительность и специфичность. Большинство авторов отмечали эффективность предлагаемых ими тест-систем для диагностики мелиоидоза и сапа. Однако в настоящее время определить самую эффективную тест-систему затруднительно, так как результаты этих исследований сложно сравнить из-за отсутствия требований к количеству тестируемых сывороток больных мелиоидозом и сапом при расчете чувствительности и требований к количеству сывороток больных другими инфекционными болезнями при расчете специфичности. Ряд авторов, отмечая, что поиск Аг до настоящего времени носит случайный характер, призывают к скорейшему переходу к выбору Аг через изучение свойств пептидов, структуры и функций антигенных эпитопов [27, 31]. Все это предопределяет такое положение с тест-системами для диагностики мелиоидоза, которое отметили Puah S.M. et al.: отсутствие известного универсального Аг *V. pseudomallei* делает серологический диагноз мелиоидоза трудным и спорным [27]. Аналогичное положение и с тест-системами для диагностики сапа. А это значит, что требуется дальнейшая работа по поиску таких универсальных Аг. Нельзя не отметить на основании последних публикаций, что все-таки более эффективны тест-системы с рекомбинантными протеинами в качестве Аг. Однако дороговизна препаративного выделения этих Аг ограничивает их применение. Следовательно, какие Аг в итоге станут основными в тест-системах ТИФА и РПГА для диагностики мелиоидоза и сапа, используемых в районах, эндемичных по этим инфекциям, еще далеко не определено.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Будченко А.А., Мазурова И.Ю., Илюхин В.И., Храпова Н.П. ROC-анализ результатов выявления антигенов возбудителей мелиоидоза и сапа твердофазным иммуноферментным методом. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 2: 37-41.
2. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М., Высшая школа. 1991.
3. Илюхин В.И., Сенина Т.В. Мелиоидоз: итоги столетнего изучения, современные проблемы и зримые перспективы. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012, 5: 41-46.
4. Кэти Д. (ред.) Антитела. Методы. М., Мир. 1991.
5. Пивень Н.Н., Илюхин В.И., Замарин А.Е., Алексеев В.В., Васильев В.П. Адекватный

выбор антигенов при серодиагностике экспериментального мелиоидоза. Журн. микробиол. 2007, 2: 49-53.

6. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I – II групп патогенности (опасности). СП 1.3.1285-03», утв. 12.03.2003.
7. Тихонов Н.Г., Липницкий А.В., Илюхин В.И. История открытия и изучения возбудителя сапа. В: Тихонов Н.Г. (ред.) Сап. Сборник научных трудов. Волгоград, Нижневолжское книжное, 1995, с. 4-6.
8. Ширяев Д.Т., Рассудов С.М., Гольдберг А.М., Лозовой Н.В., Родионова А.В. Эритроцитарные диагностикумы в реакции пассивной гемагглютинации при мелиоидозе и сапе. В: Диагностика особо опасных инфекций. Ростов Н/Д, 1968: 42-47.
9. Alexander A.D., Huxsoll D.L., Warner A.R. et al. Serological diagnosis of human melioidosis with indirect hemagglutination and complement. *Appl. Microbiol.* 1970, 20: 825-833.
10. Allwood E.M., Logue C.-A., Hafner G.J. et al. Evaluation of recombinant antigens for diagnosis of melioidosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008, 54: 144-153.
11. Anuntagool N., Rugdech P., Sirisinha S. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. *J. Clinical Microbiol.* 1993, 31: 1232-1236.
12. Chambon L., Fournier J., Lajudie P. et al. La reaction d'hémagglutination dans la melioidose. *Ann. Inst. Pasteur.* 1953, 85 (4): 530-534.
13. Chantratita N., Wuthiekanun V., Thanwisai A. et al. Accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using crude and purified antigens for serodiagnosis of melioidosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007, 14: 110-113.
14. Chen Y.-S., Shiuan D., Chen S.-C. et al. Recombinant truncated flagellin of *Burkholderia pseudomallei* as a molecular probe for diagnosis of melioidosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003, 10: 423-425.
15. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18 (2): 383-416.
16. Chenthamarakshan V., Vadivelu J., Puthuchery S.D. Detection of immunoglobulins M and G using culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2001, 39 (1): 1-7.
17. Dharakul T., Songsivilai S., Anuntagool N. et al. Diagnostic value of an antibody enzyme-linked immunosorbent assay using affinity-purified antigen in an area endemic for melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997, 56: 418-423.
18. Engvall E., Perlmann G. P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971, 8 (9): 871-874.
19. Ileri S.Z. The indirect haemagglutination test in the diagnosis of melioidosis in goats. *Br. Vet. J.* 1965, 121: 164-170.
20. Kumar S., Malik P., Kumar Verma S. et al. Use of a recombinant *Burkholderia intracellular motility A* protein for immunodiagnosis of glanders. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011, 18: 1456-1461.
21. Kunakorn M., Boonma P., Khupulsup K. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28: 1249-1253.
22. Laws L. Melioidosis in animals in North Queensland. Serological methods for the diagnosis in goats, pigs, cattle, horses and man. *Queensland J. Agric. Sci.* 1967, 24 (2): 223-234.
23. Limmathurotsakul D., Chantratita N., Teerawattanasook N. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of melioidosis: better than we thought. *Clin. Infect. Dis.* 2011, 52: 1024-1028.
24. Pal V., Kumar S., Malik P. et al. Evaluation of recombinant proteins of *Burkholderia mallei* for serodiagnosis of glanders. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012, 19: 1193-1198.
25. Petkanjanapong V., Naigowit P., Kondo T. et al. Use of endotoxin antigens in enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *P. pseudomallei* infections (melioidosis). *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 1992, 10 (2): 145-150.
26. Phung L.V., Han Y., Oka S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a glycolipid antigen for the serodiagnosis of melioidosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1995, 12 (3-4): 259-264.
27. Puah S.M., Puthuchery S.D., Chua K.N. Potential immunogenic polypeptides of *Burkholderia pseudomallei* identified by shotgun expression library and evaluation of their efficacy for serodiagnosis of melioidosis. *Int. J. Med. Sci.* 2013, 10 (5): 539-547.



28. Rice C.E., Konst H., Duthie R.C. Studies by complement-fixation methods of malleins produced in broth and synthetic media. I. Relative immunizing activities in horses and rabbits copyright and license information. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 1951, 15 (12): 284-291.
29. Rugdech P., Anuntagool N., Sirisinha S. Monoclonal antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* and their potential for diagnosis of melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* March. 1995, 52: 231-235.
30. Sermswan R.W., Wongratanacheewin S., Anuntagool N. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000, 63: 146-149.
31. Sirisinha S., Anuntagool N., Dharakul T. et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. *Acta Tropica.* 2000, 74: 235-245.
32. Strauss A., Alexander A.D., Rapmaund G. Melioidosis in Malaysia. Antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* in human population. 1969, 18 (1): 703-707.
33. Tiyawisutsri R., Peacock S.J., Langa S. et al. Antibodies from patients with melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43: 4872-4874.
34. Westphal O., Jan K. Bacterial lipopolysaccharides; extraction with phenol-water and further applications of the procedures. *Methods Carbohydr. Chem.* 1965, 5: 83-91.
35. Wheelis M. First shots fired in biological warfare. *Nature.* 1998, 395: 213.

*Поступила 2002.16*

Контактная информация: Будченко Анатолий Александрович, к.б.н.,  
400087, Волгоград, ул. Голубинская 7, р.т. (8442)36-37-43

© А.Л.КРАВЦОВ, 2016

*А.Л.Кравцов*

## **РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ПРИ ОСОБО ОПАСНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ**

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Приводятся новые сведения о нейтрофильных внеклеточных ловушках (НВЛ), осуществляющих захват и киллинг патогенных микроорганизмов с большей эффективностью, чем при фагоцитозе. Представлен современный взгляд на то, каким образом нейтрофилы выбирают внутриклеточный (фагоцитоз) или внеклеточный (нетоз) механизм бактерицидности при взаимодействии с патогенными микроорганизмами. Проанализированы экспериментальные данные о наличии у возбудителей чумы, холеры и мелиоидоза механизмов защиты от бактерицидного эффекта НВЛ, а также о роли НВЛ в регуляции иммунного ответа и развитии сепсиса.

*Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 95—104*

Ключевые слова: нейтрофильные внеклеточные ловушки, чума, сибирская язва, холера, мелиоидоз

*A.L.Kravtsov*

## **ROLE OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS IN ESPECIALLY DANGEROUS BACTERIAL INFECTIONS**

Russian Research Institute of Plague Control «Microbe», Saratov, Russia

Novel data on neutrophil extracellular traps (NET), carrying out capture and killing of pathogenic microorganisms with higher effectiveness than during phagocytosis, are presented. A contemporary view on how neutrophils choose intracellular (phagocytosis) or extracellular

(NETosis) mechanism of bactericidity during interaction with pathogenic microorganisms is given. Experimental data on the presence in causative agents of plague, cholera and melioidosis of mechanisms of protection from bactericidal effect of NET, as well as NET's role in regulation of immune response and sepsis development are analyzed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 95—104

Key words: neutrophil extracellular traps, plague, anthrax, cholera, melioidosis

Долгие годы традиционно полагали, что нейтрофильные гранулоциты (НГ) — это примитивные микрофагоциты, которые после выхода из костного мозга становятся конечно дифференцированными клетками, способными к осуществлению только фагоцитарной функции и не способными к трансформации, дифференцировке, экспрессии генов и белковому синтезу. Эти представления оказались ошибочными, и результаты современных фундаментальных исследований убедительно свидетельствуют, что НГ являются одними из ключевых эффекторных и регуляторных клеток, участвующих в реализации как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Они играют важную роль в иммунопатогенезе широкого спектра заболеваний инфекционной и неинфекционной этиологии [8].

Взгляды на роль нейтрофилов при особо опасных бактериальных инфекциях (ООБИ) существенно изменились за последнее десятилетие [21, 30, 36, 37, 39] во многом благодаря открытию в 2004 г. немецкими учеными из Института инфекционной биологии ранее неизвестного механизма киллинга бактерий, в основе которого лежит способность НГ формировать во внеклеточном пространстве бактерицидные ДНК-содержащие сетевидные структуры, названные нейтрофильными внеклеточными ловушками (НВЛ) (NETs — Neutrophil Extracellular Traps)[13].

В нашем обзоре за 2012 г., посвященном вопросу формирования внеклеточных ловушек при взаимодействии клеток врожденного иммунитета с патогенными микроорганизмами [6], не было сведений об эффективности киллинга возбудителей ООБИ в НВЛ, поскольку такая информация стала появляться в зарубежной печати лишь с декабря 2010 г. [15]. Этих сведений нет и в других недавно опубликованных русскоязычных обзорах [2, 3], посвященных участию НВЛ в защитных и патологических реакциях организма.

Целью настоящей работы явился анализ литературных данных об эффективности обезвреживания возбудителей ООБИ в НВЛ, а также о роли НВЛ в регуляции иммунного ответа и развитии характерных для сепсиса инфекционных осложнений.

Уже через год после открытия ДНК-содержащих нейтрофильных ловушек Mayer-Scholl A. et al. отмечают в своей публикации [30], что выяснение причин различной степени тяжести течения у пациентов кожной и респираторной форм сибирской язвы зависит от дальнейшего исследования недостаточно изученных механизмов бактерицидности, используемых клетками первой линии врожденной антибактериальной защиты при этом особо опасном инфекционном заболевании. Изучая *in vitro* взаимодействие *Bacillus anthracis* с нейтрофилами крови человека, эти исследователи установили, что НГ активно поглощают и внутриклеточно обезвреживают споры возбудителя сибирской язвы, в то время как киллинг крупных вегетативных клеток *B. anthracis* осуществляется с участием внеклеточного механизма бактерицидности. Этот механизм функционировал в присутствии ингибитора фагоцитоза цитохала-

зина D, и эффективность внеклеточного киллинга клеток возбудителя сибирской язвы не зависела от экспрессии ими капсулы и/или токсина. Представленный в работе результат электронно-микроскопического анализа свидетельствовал, что крупные вегетативные клетки *V. anthracis* захватываются ДНК-сетями НВЛ, что НВЛ принимают участие в обезвреживании устойчивых к фагоцитозу клеток возбудителя сибирской язвы.

Процесс образования экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами принято называть нетозом (NETosis), и считается, что нетоз — это резервная форма убийства бактерий, запускаемая при неудачном фагоцитозе, когда фагоцитоз крупных частиц не удается [3]. В работе Branzk N. et al. [12] впервые убедительно было доказано, что у НГ фагоцитоз играет роль сенсорного механизма, который определяет размер патогенных микроорганизмов с помощью поверхностного клеточного рецептора дектина-1. Нейтрофилы активно поглощали отдельные мелкие бактерии или мелкие дрожжевые клетки, и фагоцитоз подавлял процесс транслокации лейкоцитарной эластазы из первичных гранул в ядра НГ. В случаях контакта с поверхностью НГ крупных внеклеточных конгломератов *Mycobacterium bovis* или крупных клеток *Candida albicans* фагоцитоз отсутствовал. Это приводило к попаданию высвобождаемой из гранул эластазы не в фагосомы, а в ядра нейтрофилов и, как следствие [34], к расщеплению ядерных гистонов, к деконденсации ядерного хроматина, а затем к секреции ядерной ДНК, «декорированной» бактерицидными катионными белками и антибактериальными пептидами (НВЛ), во внеклеточное пространство. Включался, таким образом, альтернативный фагоцитозу механизм обезвреживания патогенных микроорганизмов, что объясняло важную роль НГ в защите от *S. albicans*, несмотря на их неспособность фагоцитировать крупные клетки этого патогенного микроорганизма. Кроме того, полученная информация объясняет, по мнению авторов [12], способность ингибиторов микробной агглютинации предотвращать развитие характерных для сепсиса инфекционных осложнений [31].

Известно, что отдельные мелкие бактерии с относительно низким уровнем содержания на клетку суммарного белка и ДНК (менее двух полных копий хромосом) преобладают в оптически плотных микробных взвешах, приготовленных в экспериментальных условиях из стационарных бактериальных культур с очень высокой клеточной концентрацией. При переходе микробной популяции в быструю экспоненциальную фазу роста в условиях *in vivo* или *in vitro* такие бактерии из нее исчезают и заменяются на более крупные с повышенным относительным содержанием ДНК (от двух до четырех и более полных копий хромосом) и белка [18]. Более того, для выживания в организме хозяина или в объектах внешней среды патогенные бактерии образуют биопленки [20, 38, 46]. В плазме крови и тканях организма они могут формировать устойчивые к фагоцитозу крупные микробные конгломераты либо нитевидные структуры, состоящие из нескольких бактерий [20, 31, 35]. В виде крупных конгломератов в чувствительный организм хозяина попадают вирулентные *Yersinia pestis* из пищеварительного тракта блох [7] и холерные вибрионы из природных водоемов [38]. Поскольку при контакте с НГ крупные микробные конгломераты запускают процесс формирования НВЛ [12], необходимо изучение роли НВЛ в обезвреживании биопленок, образуемых клетками возбудителей ООБИ.

Некоторые исследователи считают, что в защите кровотока от патогенных бактерий роль НВЛ не очень велика, так как в своих экспериментах *in vitro* они регистрировали в цельной крови способность к формированию НВЛ лишь

у 6 — 7% нейтрофилов [3]. Однако в данном случае использовались микробные клетки из оптически плотных стационарных бактериальных культур, а они и не должны быстро запускать процесс формирования НВЛ. Кроме того, присутствующий в пробе антикоагулянт мог подавлять процесс взаимодействия бактерий с клетками крови. Результаты наших проточно-цитофлуориметрических исследований свидетельствуют, что если использовать цельную дефибринированную кровь (без антикоагулянта), обсемененную живыми клетками суточной культуры *Staphylococcus aureus*, то в интервале времени от 3 до 4 ч инкубации можно наблюдать, как при исходных микробных нагрузках более  $5 \times 10^6$  м.к./мл крови развивается полная азурофильная дегрануляция около 100% нейтрофилов в суммарной лейкоцитарной популяции [26]. То есть, когда бактерий в крови было больше, чем лейкоцитов (нагрузки более 1 бактерии/лейкоцит) и все они вступали в контакт с клетками врожденного иммунитета, содержащее первичных гранул, необходимое для формирования НВЛ (эластаза и миелопероксидаза) [34], высвобождалось *in vitro* из всех присутствующих в крови нейтрофилов. По данным литературы [22], именно в промежутке времени от 3 до 4 ч подавляющее число нейтрофилов начинает формировать НВЛ в ответ на контакт с живыми клетками золотистого стафилококка в условиях *in vitro*. Образование НВЛ в крови — это очень сложный и еще недостаточно изученный процесс, в регуляции которого участвуют, как известно, тромбоциты [28], активированные эндотелиальные клетки [24], и продукты лизиса эритроцитов [16]. При выявлении НВЛ методами микроскопического анализа необходимо учитывать, что эритроциты и тромбоциты в огромном количестве адсорбируются в ДНК-содержащих сетях, формируемых НГ [23], а это существенно затрудняет визуальное обнаружение ловушек в образцах цельной крови.

Nickey H.J. и Kubes P. [25], анализируя в своей обзорной статье современные достижения в области изучения «внутрисосудистого» иммунитета при инфекциях, отмечают, что хотя реализуемый при фагоцитозе внутриклеточный механизм бактерицидности достаточно хорошо изучен и описан в литературе, роль данного механизма с точки зрения обезвреживания бактерий в кровяном русле до конца не ясна. По их мнению, в динамической системе, где нейтрофилы и бактерии быстро движутся в потоке крови, фагоцитоз может быть не эффективен, в отличие от внеклеточного механизма бактерицидности, который реализуется с помощью ДНК-сетей, забрасываемых в поток крови для вылавливания и обезвреживания патогенных бактерий на расстояниях, значительно превышающих размеры самих НГ.

В связи с вышеизложенным, очень важна информация о роли НВЛ в антибактериальной защите, полученная McDonald B. et al. [32] на модели мышей, внутрибрюшинно зараженных *Escherichia coli*. В этих исследованиях впервые убедительно было доказано, что *in vivo* нейтрофилы высвобождают экстрацеллюлярные сети, состоящие из ДНК и бактерицидных продуктов цитоплазматических гранул, для захвата бактерий в потоке крови и повышения эффективности киллинга их в кровяном русле при развитии бактериемии, предотвращая, таким образом, микробную диссеминацию. При сепсисе и эндотоксемии НГ секретировали внутрисосудистые НВЛ во внутридольковых синусоидных гемокапиллярах печени в результате взаимодействия с активированными инфекционным агентом тромбоцитами. Когда в кровотоке формировались НВЛ, эффективность захвата и киллинга бактерий в условиях *in vivo* повышалась в 4 раза, в сравнении с базовым уровнем, обеспечиваемым макрофагальным фагоцитозом.

Ранее способность НГ к быстрому (30 мин) формированию НВЛ в кровяном русле была зарегистрирована Clark S.R. et al. [17] при изучении взаимодействия нейтрофилов крови с тромбоцитами, активированными липополисахаридом (ЛПС) *E. coli* через TLR4 на клеточной поверхности. Было установлено, что TLR4 на тромбоцитах в 100 — 1000 раз чувствительнее к активирующему эффекту ЛПС, чем TLR4 нейтрофилов, и предложена гипотеза, согласно которой тромбоциты выполняют в крови роль барометра, показывающего высокую степень клеточной активации с интенсивным образованием НВЛ под влиянием бактериальных ЛПС только при наиболее опасных системных бактериальных инфекциях. Чрезмерное образование НВЛ, играющее важную роль в развитии тромбгеморрагических осложнений и полиорганной недостаточности, наблюдается при эндотоксическом шоке, вызванном у животных летальными дозами ЛПС [42], а также при сепсисе у пациентов, зараженных ООБИ (мелиоидозом) [19].

По данным Eisele N.A. et al. [21] через хемокиновый рецептор CXCR2 активируется не только хемотаксис нейтрофилов к очагу воспаления, но и запускаются *in vivo* уникальные защитные иммунологические механизмы, участвующие в обезвреживании вирулентных возбудителей чумы при аэрогенном заражении, что меняет представление о роли процесса функциональной активации нейтрофилов при чумной инфекции. Клетки приобретали чувствительность к CXCR2-независимому клиренсу в результате делеции локуса пигментации (*pgm*). Это означало, что *pgm* locus кодирует факторы вирулентности *Y. pestis*, которые ингибируют функциональную активацию нейтрофилов, важную для обезвреживания вирулентных возбудителей чумы, но при этом не зависящую от миграции НГ из кровяного русла. Ссылаясь на работу Marcos V. et al. [29], американские ученые отмечают, что известен пока только один из таких механизмов активации НГ, который связан с секрецией НВЛ в ответ на контакт нейтрофилов с живыми инфекционными агентами. Поэтому не исключено, что экстрацеллюлярные ДНК-сети играют определенную роль в обезвреживании *Y. pestis*. Интересно, что уникальной способностью образовывать в пищеварительном тракте блох комков микробной массы, состоящий из очень крупных бактериальных конгломератов, обладают клетки *Y. pestis* с фенотипом *Pgm*<sup>+</sup>. Бактерии с *Pgm*<sup>-</sup> фенотипом растут в желудке переносчика в виде рыхлой бактериальной массы, которая состоит из отдельных микробных клеток и легко смывается стружкой крови, поглощаемой насекомым при повторном кровососании [7]. На участие НВЛ в обезвреживании *Y. pestis* косвенно указывают также данные о ключевой роли лейкоцитарной эластазы в расщеплении факторов вирулентности (*Yops*), кодируемых плазмидой кальцийзависимости *Yersinia spp.* (*Yops*) [45].

Особый интерес представляют выводы исследований Casutt-Meyer S. et al. [15] о наличии у *Y. pestis*, как у возбудителя «кровяной» инфекции, уникального механизма защиты от бактерицидного эффекта НВЛ, которого нет у *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*. Суть данного механизма заключается в существенном снижении при температуре организма хозяина уровня адсорбции *Y. pestis* в НВЛ за счет утраты в процессе эволюции гена *yadA*, кодирующего продукцию адгезина А (*YadA*). В опытах со штаммами *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* было установлено, что при контакте с нейтрофилами все они запускают нетоз, но только те из них, которые продуцировали *YadA*, адсорбировались в экстрацеллюлярных ДНК-сетях и поэтому были чувствительны к бактерицидному эффекту НВЛ. Причем высокая чувствительность к киллингу в НВЛ сочеталась с повышенной устойчивостью

к фагоцитозу и защищенностью от бактерицидного эффекта комплемента. Введение функционального гена *yadA* в клетки *Y. pestis* приводило к повышению их чувствительности к киллингу в экстрацеллюлярных ДНК-сетях, формируемых нейтрофилами. При этом вирулентность *Y. pestis* существенно снижалась.

Считается, что роль НВЛ чрезвычайно важна в антибактериальной защите слизистых оболочек, так как нейтрофилы в значительном количестве выходят из циркуляции в слизистый секрет бронхоальвеолярного, кишечного и урогенитального эпителия, где под влиянием резидентной микрофлоры и растворимых медиаторов они выбрасывают внеклеточные ловушки, которые, встраиваясь в муциновый биослой, создают на поверхности эпителиоцитов сеть, непроницаемую и губительную для бактерий. Слизистая пробка шейки матки, например, буквально пронизана ДНК-содержащими сетями. Однако сперматозоиды легко проникают сквозь эти сети, так как в составе эякулята для этого присутствует в необходимой концентрации нуклеаза (ДНКаза I) [3]. За счет продукции специальных нуклеаз преодолевать защитный барьер НВЛ в слизистых оболочках могут и патогенные бактерии. Например, клетки *Streptococcus pneumoniae* [11].

При колонизации кишечника клетки *Vibrio cholerae* продуцируют во внеклеточное пространство две нуклеазы (Dns и Xds), необходимые по данным Serep A. et al. [37] для разрушения ДНК-содержащих ловушек, формируемых нейтрофилами в слизистом секрете кишечного эпителия. Ранее эти исследователи установили важную роль двух нуклеаз *V. cholerae* в формировании биопленок во внешней среде, в использовании внеклеточной молекулы ДНК как источника фосфата при дефиците питательных веществ в водоемах [38]. Они обратили внимание на тот факт, что штаммы, утратившие способность продуцировать нуклеазы, не колонизируют кишечник мышей с нормальным функционированием клеток иммунной системы, в отличие от мышей с врожденной нейтропенией. Был сделан важный вывод, что колонизация кишечника клетками холерного вибриона является процессом, зависящим от НГ, от функции клеток первой линии врожденной антибактериальной защиты, тесно связанной с секрецией их молекулы ДНК во внеклеточное пространство. Проведенные исследования экспериментально доказали [37], что при контакте выделенных из крови нейтрофилов с клетками *V. cholerae* высвобождаются НВЛ. Причем, попавшие в ДНК-сети холерные вибрионы выживали только тогда, когда в присутствии НВЛ они начинали секретировать во внешнюю среду нуклеазы Dns и Xds. Все штаммы, дефектные по продукции нуклеаз, быстро погибали в НВЛ и не колонизировали кишечник.

Анализ литературы свидетельствует, что при ООБИ роль НВЛ еще только начинает изучаться, а наиболее интенсивные исследования в этом направлении ведутся в настоящее время с возбудителем мелиоидоза — *Burkholderia pseudomallei* [19, 36]. Видимо, по той причине, что ДНК-содержащие ловушки, являясь связующим звеном между инфекцией, воспалением и тромбозом [23], играют важную роль в развитии сепсиса [14, 28, 32, 42], а мелиоидоз — это хорошая клиническая модель для изучения сепсиса, индуцированного особо опасными грамотрицательными бактериями [41].

В исследованиях Riyara D. et al. [36] впервые была установлена способность нейтрофилов осуществлять киллинг клеток *B. pseudomallei* путем секреции НВЛ. Нейтрофилы крови человека при контакте с живыми клетками возбудителя мелиоидоза формировали НВЛ в зависимости от исходной микробной

нагрузки и времени инкубации. Повышенный уровень образования и секреции ДНК-содержащих сетей регистрировали при контакте нейтрофилов с мутантами *B. pseudomallei*, дефектными по синтезу полисахаридной капсулы и/или по продукции факторов вирулентности (Bsa), относящихся к секреторной системе III типа (T3SS — type III protein secretion system). Взаимодействие НГ с такими мутантами ассоциировалось с увеличенной интенсивностью киллинга бактерий, что позволило сделать вывод о существовании у возбудителя мелиоидоза молекулярных механизмов защиты от бактерицидного эффекта НВЛ, связанных с продукцией капсулы и белков вирулентности.

Более детально роль нетоза при ООБИ была изучена de Jong H.K. et al. на моделях мелиоидозного сепсиса у людей и лабораторных животных [19]. Эти исследования подтвердили, что НВЛ проявляют антибактериальную активность по отношению к *B. pseudomallei*, а также впервые экспериментально доказали факт секреции нейтрофилами в плазму крови ядерной ДНК и эластазы при взаимодействии с клетками возбудителя мелиоидоза в условиях *in vivo*. Формирование внутрисосудистых НВЛ приводило к эмболии мелких сосудов конгломератами ДНК-содержащих сетей, к повреждению клеток печени и других органов при экспериментальном мелиоидозном сепсисе. После введения животным нуклеазы, разрушающей НВЛ, степень этого повреждения снижалась, что коррелировало с понижением в плазме крови концентрации нуклеосом и лейкоцитарной эластазы. Нетоз не предотвращал бактериальную диссеминацию при экспериментальном мелиоидозе, и в клинических условиях регистрировали чрезмерное формирование НВЛ при мелиоидозном сепсисе, которое играло важную роль в развитии инфекционных осложнений и имело прогностическое значение. Степень тяжести этих осложнений, оцениваемая по комплексу традиционных клинических показателей, строго коррелировала с уровнем повышения концентрации в плазме крови нуклеосом и лейкоцитарной эластазы.

Хорошо известно, что при сепсисе, когда нарушается баланс в системе эластаза — ингибиторы, эта протеаза представляет огромную опасность для организма, так как является ключевым эндогенным медиатором повреждения эндотелия сосудов и индуктором развития системного воспалительного процесса [43]. Однако необходимо отметить, что при инфекциях уровень содержания в крови эластазы и других опасных для организма продуктов распада НГ (DAMPs — damage-associated molecular patterns) может существенно повышаться не только при нетозе, но и при индуцируемом патогенными бактериями постапоптотическом (вторичном) некрозе [40].

Защитить организм от чрезмерного воспаления и предотвратить септический шок при инфекциях позволяют, как известно, иммунологические механизмы, лежащие в основе феномена толерантности к ЛПС [33], которые изложены в современной концепции быстрой иммунологической защиты от патогенов [9]. Однако вклад различных механизмов бактерицидности в обеспечение повышенной эффективности киллинга бактерий в организме толерантных животных впервые был оценен экспериментально лишь в 2012 г. в фундаментальных исследованиях Landoni V.I. et al. [27]. Толерантные мыши, у которых характерную иммунологическую перестройку организма создавали путем длительного внутривенного введения малых доз ЛПС (в течение первых 2 суток по 5 мкг, а затем еще 2 суток по 10 мкг на мышь), приобретали способность к более эффективной борьбе с полимикробной внутрибрюшинной инфекцией, причем как в присутствии, так и в отсутствии перитонеальных макрофагов. Ключевую роль в антибактериальной защите играл в данном

случае не фагоцитоз, а внеклеточный киллинг патогенных бактерий в ДНК-содержащих ловушках, формируемых при гибели (нетозе) активированных нейтрофилов, быстро мигрирующих из сосудистого русла (из маргинального пула НГ) в брюшную полость лабораторных животных.

Таким образом, при повторном контакте организма с инфекционным агентом включается очень важный иммунологический механизм антибактериальной защиты, основанный на обезвреживании микроорганизмов в НВЛ. Этот механизм, функционирующий независимо от фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов, нуждается в детальном изучении при ООБИ. В настоящее время при оценке напряженности антибактериального иммунитета при ООБИ, наряду с определением степени активации Т-клеточного звена иммунологической защиты, используют на практике такой показатель, как интенсивность лизиса лейкоцитов при повторном контакте их в крови со специфическим антигеном (с убитыми микробными клетками) *in vitro* [1]. Приобретенный антибактериальный иммунитет можно также оценивать *in vitro* по показателю повреждения нейтрофилов (тест ППН) [10]. Вполне вероятно, что повышенные значения показателя повреждения лейкоцитов крови после вакцинации отражают активацию процесса формирования НВЛ. В пользу справедливости такого предположения свидетельствует, например, способность нейтрофилов крови привитых против чумы людей отвечать *in vitro* на контакт с убитыми клетками *Y. pestis* более интенсивной азурофильной дегрануляцией [5], связанной с высвобождением из гранул необходимых для образования НВЛ ферментов [34].

Выбор типа адаптивного иммунного ответа, регулируемого Т-лимфоцитами (Th1, Th2, Th17, Treg), зависит, согласно новым представлениям о противoinфекционном иммунитете, от активации определенного набора рецепторов на поверхности фагоцитов. Имея несколько вариантов такой функциональной активации, фагоциты способствуют дифференцировке Т-лимфоцитов в разных направлениях [4], а также могут влиять на интенсивность адаптивного иммунного ответа. В частности, в работе Tillack K. et al. [44] убедительно доказано, что НВЛ оказывают на Т-лимфоциты прямой примиряющий эффект, приводящий к резкому снижению порога их активации при повторном взаимодействии со специфическими бактериальными антигенами.

Таким образом, проанализированные данные о наличии у возбудителей чумы, холеры и мелиоидоза механизмов защиты от бактерицидного эффекта НВЛ, а также об участии НВЛ в регуляции иммунного ответа и развитии сепсиса свидетельствуют о важности дальнейшего изучения роли НВЛ при ООБИ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богачева Н.В., Крючков А.В., Дармов И.В., Воробьев К.А., Печенкин Д.В., Елагин Г.Д., Колесников Д.П. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлуориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы. *Клин. лаб. диагностика*. 2013, 11: 48-53.
2. Воробьева Н.В., Пинегин Б.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии. *Биохимия*. 2014, 79 (12): 1580-91.
3. Долгушин И.И., Савочкина А.Ю., Курносенко И.В., Долгушина В.Ф., Савельев А.А., Самусева И.В., Маякова В.Б. Участие внеклеточных нейтрофильных ловушек в защитных и патологических реакциях организма. *Российский иммунологический журнал*. 2015, 9 (18), 2: 164-170.
4. Киселева Е.П. Новые представления о противoinфекционном иммунитете. *Инфекция и иммунитет*. 2011, 1: 9-14.



5. Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П., Шуковская Т.Н. Влияние противочумной вакцинации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета человека. *Пробл. особо опасных инф.* 2011, 1 (107): 77-80.
6. Кравцов А.Л. Формирование внеклеточных ловушек — эффективный механизм защиты от патогена. *Пробл. особо опасных инф.* 2012, 2 (112): 69-74.
7. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М., Медицина, 2007.
8. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евлевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле. *Иммунология.* 2015; 4: 257-65.
9. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Концепция быстрой иммунологической защиты от патогенов. *Журн. микробиол.* 2007, 4: 93-100.
10. Фрадкин В.А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови. М., Медицина, 1985.
11. Beiter K., Wartha F., Albiger B. et al. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biology.* 2006, 16: 401-407.
12. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E. et al. Neutrophil sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 2014, 15 (11): 1017-1025.
13. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004, 303: 1532-1535.
14. Camicia G., Pozner R., Larranaga G. Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock.* 2014, 42 (4): 286-294.
15. Casutt-Mayer S., Renzi F., Schmalzer M. et al. Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a double-edged sword. *PLoS ONE.* 2010, 5 (12): e15159. doi: 10.1371/journal.pone.0015159.
16. Chen G., Zhang D., Fuchs T.A. et al. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood.* 2014, doi: 10.1182/blood-2013-10-529982.
17. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A. et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* 2007, 13: 463-469.
18. Davey H.M., Kell D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analysis. *Microbiol. Rev.* 1996, 60: 641-696.
19. de Jong H.K., Koh G., Achouiti A. et al. Neutrophil extracellular traps in the host defense against sepsis induced *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis). *Intensive Care Medicine Experimental.* 2014, 2 (21). doi: 10.1186/s40635-014-0021-2.
20. Domenech M., Ramos-Sevillano E., Garcia E. et al. Biofilm formation avoids complements immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2013, 81: 2606-2615.
21. Eisele N.A., Lee-Lewis H., Besch-Williford C. et al. Chemokine receptor CXCR2 mediates bacterial clearance rather than neutrophil recruitment in murine model of pneumonic plague. *Am. J. Pathol.* 2011, 178 (3): 1190-1200.
22. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2007, 176: 231-241.
23. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *PNAS.* 2010, 107 (36): www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005743107.
24. Gupta A.K., Joshi M.B., Phillippova M. et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 2010, 584: 3193-3197.
25. Hickey M.J., Kubes P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat. Rev. Immunology.* 2009, 9: 364-375.
26. Kravtsov A.L., Bobyleva E.V., Grebenyukova T.P., Kuznetsov O.S., Kulyash Y.V. Flow microfluorometric analysis of phagocyte degranulation in bacteria infected whole human blood cell cultures. *Proc. SPIE.* 2002, 4707: 395-402.
27. Landoni V.I., Chiarella P., Martire-Greco D. et al. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular trap formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin. and Exper. Immunol.* 2012, 168: 153-163.
28. Ma C.A., Kubes P.K. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps in sepsis. *J. Thromb. Haemostasis.* 2008, 6 (3): 415-420.

29. Marcos V., Zhou Z., Yildirim A. et al. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airways inflammation. *Nat. Med.* 2010, 16: 1018-1023.
30. Mayer-School A., Hurwitz R., Brinkmann V. et al. Human neutrophils kill *Bacillus anthracis*. *PLoS Pathog.* 2005, 1 (3): e23. doi: 10.1371/journal.ppat.0010023.
31. McAdow M., Kim H.A., DeDent A.C. et al. Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. *PLoS Pathog.* 2011, 7 (10): e1002307. doi: 10.1371/journal.ppat.1002307.
32. McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G. et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe.* 2012, 12 (3): 324-333.
33. Murphey E.D., Fang G., Varma T.K., Sherwood E.R. Improved bacterial clearance and decreased mortality can be induced by LPS tolerance and is not dependent upon IFN-gamma. *Shock.* 2007, 27: 289-295.
34. Papayannopoulos V., Metzger K.D., Hakim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010, 191: 677-691.
35. Prashar A., Bhatia S., Gigliozzi D. et al. Filamentous morphology of bacteria delays the timing of phagosome morphogenesis in macrophages. *J. Cell Biol.* 2013, 203: 1081-1097.
36. Riyara D., Buddhisa S., Korbsrisate S. et al. Neutrophil extracellular traps exhibit antibacterial activity against *Burkholderia pseudomallei* and are influenced by bacterial and host factors. *Infect. Immun.* 2012, 80 (11): 3921-3929.
37. Seper A., Hosseinzadeh A., Gorkiewicz G. et al. *Vibrio cholerae* evades neutrophil extracellular traps by the activity of two extracellular nucleases. *PLoS Pathog.* 2013, 9 (9): e1003614. doi: 10.1371/journal.ppat.1003614.
38. Seper A., F ngler V.H., Roier S. et al. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 2011, 82: 1015-1037.
39. Shannon J.G., Hasenkrug A.M., Dorward D.W. et al. *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in mouse model of bubonic plague. *mBio.* 2013, 4 (5): e00170-13. doi: 10.1128/mBio.00170-13.
40. Silva T.M. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J. Leuk. Biology.* 2010, 88 (5): 885-896.
41. Simpson A.J. Melioidosis: a clinical model for gram-negative sepsis. *J. Med. Microbiology.* 2001, 50 (8): 657-658.
42. Tanaka K., Koike Y., Shimura T. et al. In vivo characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. *PLoS One.* 2014, 9 (11): e111888. doi: 10.1371/journal.pone.0111888.
43. Tang A.H., Brunn G.J., Cascalho M., Platt J.L. Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *J. Leuk. Biology.* 2007, 82: 282-285.
44. Tillack K., Breiden P., Martin R., Sospedra M. T-lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunology.* 2012, 188 (7): 3150-3159.
45. Weinrauch Y., Drujan D., Shapiro S.D. et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature.* 2002, 417: 91-94.
46. Yoong P., Cywes-Bentley C., Pier G.B. Poly-N-Acetylglucosamine expression by wild-type *Yersinia pestis* is maximal at mammalian, not flea, temperatures. *mBio.* 2012, 3(4): E00217-12. Doi: 10.1128/mBio.00217-12.

*Поступила 20.02.16*

Контактная информация: Кравцов Александр Леонидович, д.б.н.  
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)26-21-31

*A.V. Kolesnikov<sup>1,2</sup>, A.V. Kozyr<sup>1</sup>, I.G. Shemyakin<sup>1</sup>, L.A. Lisitskaya<sup>1</sup>,  
M.A. Mar'yan<sup>1</sup>, A.K. Ryabko<sup>1</sup>, I.A. Dyatlov<sup>1</sup>*

## **СИНТЕТИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИННОВАЦИОННЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

<sup>1</sup>ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская область;  
<sup>2</sup>Институт инженерной иммунологии, Любучаны, Московская область

На протяжении многих десятилетий, живые вакцины остаются наиболее эффективным средством профилактики бактериальных инфекций. Основным источником вакцинных штаммов до последнего времени являлись эмпирически отобранные бактерии, вирулентность которых была аттенуирована в силу природных мутаций. Несмотря на эффективность таких вакцин в отношении ряда инфекций, для многих патогенов использование аттенуированных штаммов либо не обеспечивает достаточной защиты, либо является небезопасным. Традиционные технологии создания вакцин зачастую малоэффективны при отсутствии у патогена выраженных «протективных» антигенов. В последние годы развитие получили методы рационального конструирования живых вакцин на основе методологий синтетической биологии. Вклад синтетической биологии в создание вакцин не ограничивается использованием средств биоинформатики и конструированием оптимизированных фрагментов ДНК, а включает в себя скоординированные изменения различных компонентов бактериального генома, создание векторных штаммов, включение в них видоизмененных иммуногенов и активаторов иммунной системы, поиск и дизайн иммуногенов *in silico* и многое другое. Методологии синтетической биологии позволяют объединить различные инженерные идеи и строительные блоки, полученные при создании и модификации различных профилактических, терапевтических и биоинженерных систем для получения микроорганизмов с качественно новыми и программируемыми свойствами, а в перспективе — в короткие сроки создавать вакцины «по требованию».

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 105—115

Ключевые слова: вакцины, синтетическая биология, бактериальные инфекции

*A.V. Kolesnikov<sup>1,2</sup>, A.V. Kozyr<sup>1</sup>, I.G. Shemyakin<sup>1</sup>, L.A. Lisitskaya<sup>1</sup>,  
M.A. Marin<sup>1</sup>, A.K. Ryabko<sup>1</sup>, I.A. Dyatlov<sup>1</sup>*

## **SYNTHETIC BIOLOGY AS AN INSTRUMENT FOR DEVELOPMENT OF INNOVATIVE VACCINES FOR PROPHYLAXIS OF BACTERIAL INFECTIONS**

<sup>1</sup>State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region;  
<sup>2</sup>Institute of Engineering Immunology, Lyubuchany, Moscow Region, Russia

For many decades, live vaccines remain the most effective means for prophylaxis of bacterial infections. Until recently, the main source of vaccine strains were empirically selected bacteria, virulence of which was attenuated due to natural mutations. Despite effectiveness of such vaccines against a number of infections, use of attenuated strains for many pathogens either does not induce sufficient protection, or is unsafe. Traditional technologies of vaccine creation frequently have low effectiveness with the lack of pronounced «protective» antigens in the pathogen. Methods of rational construction of live vaccines have received development in the recent years, based on methodology of synthetic biology. Contribution of synthetic biology into creation of vaccines is not limited to use of means of bioinformatics and construction of optimized DNA fragments, but also includes coordinated adjustments to various components of the bacterial genome, creation of vector strains, inclusion of altered immunogens and immune system activators into them, search and design of immunogens *in silico* and much more. Methodologies of synthetic biology allow to combine various engineering ideas and building blocks, obtained during creation and modification of various prophylaxis, therapeutic and bioengineering systems for production of microorganisms

with qualitatively novel and programmable properties, and in perspective — rapidly create vaccines «on demand».

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 105—115

Key words: vaccines, synthetic biology, bacterial infections

Несмотря на то, что термин «синтетическая биология» широко используется уже более 10 лет, а предложен был еще ранее, в настоящее время все еще сложно определить точные границы этого направления. Наглядным примером этому является опрос, проведенный журналом *Nature Biotechnology*, в рамках которого ведущие специалисты в области синтетической биологии давали весьма различные определения и характеристики этой области исследований [13].

Еще в 1978 году отмечалось, что «исследования в области эндонуклеаз рестрикции не только позволят нам с легкостью конструировать рекомбинантные молекулы ДНК и анализировать индивидуальные гены, но также приведут нас в новую эру, эпоху «синтетической биологии», где будут не только изучаться существующие гены, но создаваться и оцениваться новые генетические конструкторы» [42]. Механистически синтетическую биологию действительно можно рассматривать как продолжение генетической инженерии с той разницей, что гены конструируются *in silico*, а затем синтезируются и собираются в конструкторы более высокого порядка [14]. На самом деле, концепция синтетической биологии включает в себя и химические, и компьютерные методологии, объединяемые подходами «общей» традиционной инженерии [6]. Инженерные дисциплины подразумевают использование хорошо охарактеризованных и рационально сконструированных узлов и блоков для создания систем с заранее заданными и хорошо предсказуемыми характеристиками и возможность представить конструируемую систему в виде таких узлов, блоков, объединенных как горизонтально, так и иерархически [15]. В синтетической биологии появлению таких блоков и систем предшествовали многолетние молекулярно-биологические, биохимические и генноинженерные исследования. Возникла возможность не только точечного изменения организмов в результате мутаций, но и объединения различных модификаций, а также добавленных извне блоков (в том числе, и из гетерологичных биологических систем) в скоординировано работающие молекулярные машины, выполняющие какую-либо новую функцию или придающие модифицированному организму (или даже неживой, или квазиживой биологической системе) новое сложное качество [27, 40].

Таким образом, к синтетической биологии можно, в первую очередь, отнести скоординированное и масштабное изменение генома с целью формирования новой функции в рамках биологической системы. При этом, если в течение ряда предшествующих лет работы в области синтетической биологии носили, в основном, экспериментальный исследовательский характер, то в последние годы наметилось развитие реальных практических приложений синтетической биологии, в том числе и в области медицины [47]. Уместно отметить, что с накоплением знаний в области биотехнологии и синтетической биологии развитие получают не только модифицированные живые системы, но и конструкторы *in vitro*, не содержащие генетического материала, но способные

длительно поддерживать различные функционально сложные процессы, в частности направленные на решение биомедицинских задач [21].

В микробиологии в качестве основных направлений синтетической биологии можно рассматривать биотехнологическое и медицинское, важнейшей задачей которого, очевидно, является борьба с инфекциями. И хотя роль синтетической биологии в решении задач данного направления может быть весьма многоплановой, одной из первоочередных ее задач в приложении к борьбе с бактериальными инфекциями является создание вакцин нового поколения.

Вакцинация является наиболее эффективным средством борьбы с инфекционными заболеваниями. В эпоху, предшествовавшую масштабному развитию биотехнологии, вакцинация позволила свести к минимуму заболеваемость дифтерией, коклюшем, столбняком. Развитие биотехнологии, иммунологии и понимание механизмов защиты от инфекции привели к созданию синтетических и субъединичных вакцин, в частности вакцин для профилактики менингококковой, пневмококковой, брюшнотифозной и Нив-инфекций. Однако, несмотря на указанные достижения, существует значительное число бактериальных патогенов, для которых до сих пор не удалось разработать эффективную и безопасную вакцину, пригодную для массового применения. Для ряда патогенов эффективность убитых или субъединичных вакцин оказывается недостаточной, а экспериментальные живые вакцины, основанные на эмпирических данных о протективных свойствах аттенуированных штаммов патогена, зачастую непригодны для массового применения ввиду высокой реактогенности и остаточной вирулентности микроорганизмов. С другой стороны, многолетний опыт создания антибактериальных вакцин свидетельствует о том, что, как правило, живые вакцины превосходят как убитые бактерии, так и рекомбинантные и очищенные антигены и антигенные композиции по эффективности и длительности протективного иммунного ответа. Синтетическая биология предлагает разнообразные инструменты для создания высокоэффективных и безопасных живых вакцин нового поколения [23].

Связь между уровнем вирулентности аттенуированного вакцинного штамма и степенью протективного эффекта, достигаемого при иммунизации, была подробно исследована на примере экспериментальных живых вакцин для профилактики сальмонеллезной инфекции [46]. Эти работы с методологической точки зрения можно рассматривать как фундамент для создания любых живых вакцин и, в то же время, как исследования в области синтетической биологии. Исследования, проводившиеся на протяжении ряда лет, выявили гены, мутации в которых скоординированно снижают вирулентность сальмонелл. Статистический анализ показал значительную корреляцию иммуногенности и вирулентности возбудителя. Из этого следовало, что живая вакцина, обладающая заведомо низкой вирулентностью, скорее всего, окажется недостаточно иммуногенной, в то время как высоковирулентный иммуногенный штамм невозможно применять из соображений безопасности [18]. Достижение такого баланса между иммуногенностью и вирулентностью, который позволит сконструировать вакцинный штамм с оптимальными протективными характеристиками, несомненно, относится к области синтетической биологии [46]. Такой эффект может быть достигнут по-разному: в редких случаях — за счет блокировки части важнейших факторов вирулентности, как в случае

инактивации холерного токсина и делеции гена гемолизина для конструирования живой холерной вакцины [43], но чаще только за счет более тонкой скоординированной инактивации различных генов, обеспечивающих жизнеспособность патогена в условиях нахождения в организме-хозяине [30]. Атенуированные штаммы других видов патогенов создавались с использованием аналогичных интеративных технологий [18].

К сожалению, прямые методы конверсии патогена в вакцинный штамм, подобные описанным выше, не всегда оказываются успешными. Накопленные в последние годы данные частично проливают свет на причины неудач в использовании инактивации эмпирически определенных генов для создания эффективных живых вакцин. Очень часто спектр белков, экспрессируемых при взаимодействии патогена с клетками организма-хозяина, значительно отличается от продуктов экспрессии того же микроорганизма при росте на питательных средах [9, 26]. Поскольку механизм действия тех или иных белков зачастую неизвестен, также как и паттерн их экспрессии, предсказать влияние полной инактивации того или иного гена на иммуногенность и протективные свойства модифицированного штамма очень трудно. Недавно было показано, что в зависимости от набора аттенуирующих мутаций, в геноме *Salmonella typhimurium* происходят не только количественные, но и качественные изменения в наборе секретируемых цитокинов и, соответственно, в модуляции иммунного ответа. С другой стороны, различные рецепторы врожденного иммунитета организма-хозяина могут играть противоположную роль в развитии иммунного ответа к патогену, вызывая повышение или понижение эффективности иммунного ответа к сальмонеллам [31]. Таким образом, сальмонеллы, не имеющие ярко выраженного механизма вирулентности и подавления иммунитета хозяина, основанного на одном или немногих факторах, и использующие сложную систему регуляторов для выживания в макрофагах, являются примером необходимости использования методов синтетической биологии для создания по-настоящему эффективных вакцин.

Из приведенной выше информации следует, что полная инактивация того или иного фактора вирулентности может существенно отразиться на иммуногенности вакцинного штамма. К очевидной потере иммуногенности, например, может привести нарушение сигнальной цепочки, в результате которой на поверхности клетки блокируется синтез адгезина или инвазина, или иного белка, необходимого для колонизации бактерией иммунокомпетентных органов, что, с одной стороны, является инструментом патогена по ослаблению иммунного ответа, но с другой — единственным способом этот ответ индуцировать. В ряде случаев отключение важнейшего фактора вирулентности может активировать различные компенсаторные механизмы, в результате чего патогенность мутантной бактерии может в значительной степени сохраниться [8]. Поэтому в последние годы усилия исследователей были сконцентрированы на том, чтобы создать патоген, который бы продуцировал все или практически все факторы вирулентности, но имел строго ограниченный и модулируемый срок существования в организме хозяина. И действительно, эти соображения привели к созданию вакцинного штамма сальмонеллы, который сохраняет практически все свойства полностью вирулентного штамма дикого типа, но имеет ограниченный срок жизни в организме-хозяине. Это достигается за счет постановки ряда жизненно важных генов и факторов вирулентности патогена под контроль арабинозного промотора (*araBAD*) [18, 30]. При культивирова-

нии *in vitro* в присутствии арабинозы рост штамма происходит без ограничений. При попадании в организм по мере истощения эндогенной арабинозы, захваченной из ростовой среды, размножение бактерий замедляется, а в течение 3 суток и вовсе останавливается. Срок размножения вакцинного штамма можно увеличить путем приема арабинозы. За время размножения в вакцинируемом организме бактерии успевают проникнуть в иммунокомпетентные органы и ткани, вызвать иммунный ответ, сравнимый с ответом на полностью вирулентные штаммы, однако далее патологический процесс не развивается, поскольку рост патогена блокируется в отсутствие арабинозы, нормальная концентрация которой в организме человека и животных слишком низкая для поддержания активности арабинозного промотора [18].

Использование гетерологичных промоторов для ограничения продукции группы генов, регулируемого во времени, является весьма удачным решением, однако не стоит забывать, что эти промоторы контролируют полноценные факторы вирулентности, рекомбинация которых или горизонтальный перенос в другие микроорганизмы могут оказаться нежелательным и крайне опасным явлением. Кроме того, активность арабинозного промотора сама по себе не является дозозависимой, и промоторы в разных клетках — членах одной и той же популяции на самом деле отключаются при различной концентрации индуктора, делая невозможной тонкую настройку уровня экспрессии факторов вирулентности и сужая возможности управления эффективностью иммунного ответа [28].

Системы тонкой регуляции экспрессии факторов вирулентности могут быть созданы при воздействии на эффективность трансляции белка. Известно, что наиболее продуктивные системы эукариотической экспрессии были получены на основе селекции конструкторов, содержащих гены селективных маркеров, которые высокоэффективно транскрибируются при низком уровне трансляции продукта, вызванной мутациями, использованием поврежденных систем инициации трансляции и другими способами. Высокий уровень транскрипции оперона, в котором содержится низкоэффективно продуцирующийся или низкоактивный селективный маркер, обуславливает суперпродукцию «пассажирского» белка (например, терапевтического антитела), транслируемого с той же РНК, но с использованием корректной инициации трансляции [45]. Для микроорганизмов наиболее очевидным способом контроля уровня трансляции является использование субоптимальных кодонов, для которых количество продуцируемой в данном микроорганизме тРНК низкое [24]. Относительно недавно методами биоинформатики был обнаружен и подтвержден на практике феномен парных кодонов, в рамках которого комбинации двух последовательных кодонов определенных аминокислот не случайны. Иными словами, в рамках вырожденности генетического кода для ряда последовательно расположенных пар аминокислот вероятность кодирования одним из типов кодонов намного выше, чем другим. Экспериментально было показано, что постановка в этих положениях непарных кодонов для тех же аминокислот существенно снижала уровень трансляции [20]. Этот метод был использован для конструирования аттенуированных вакцинных штаммов энтеротоксигенной *Escherichia coli* [36] и пневмококков [8]. В случае пневмококков использование постепенного снижения уровня экспрессии основного фактора вирулентности — пневмолизина позволило получить экспериментальное подтверждение гипотезе о некорректной «температуре» иммунного

ответа как одним из факторов борьбы патогена с иммунной системой хозяина. При чрезмерной «температуре», вызванной большой концентрацией активирующих антигенов, происходит массивный выброс цитокинов (цитокиновый шторм), для блокировки которого организм вынужден запускать механизмы сглаживания чрезмерной активации иммунной системы [11]. Это позволяет патогену избежать эффективного распознавания иммунной системой. Кроме того, целый ряд токсинов и факторов вирулентности действует непосредственно на иммунокомпетентные клетки, подавляя активацию корректного иммунного ответа. При низкой «температуре» ответа патоген либо уходит от распознавания иммунной системой и формирует персистирующую инфекцию [22], либо слишком быстро теряет жизнеспособность и, вследствие этого, недостаточно эффективно стимулирует иммунный ответ.

Таким образом, использование синтетико-биологического подхода позволило не только создать новый тип вакцинного штамма *Streptococcus pneumoniae*, но и экспериментально подтвердить иммунологическую концепцию о необходимости сбалансированной «температуры» иммунного ответа для достижения оптимального протективного эффекта [18, 36]. Возможности модификаций генетического кода в пределах одного белка среднестатистического размера (300 — 700 аминокислотных остатков) настолько велики, что можно добиться не только весьма тонкой настройки уровня экспрессии антигена в составе вакцинного штамма, но и заведомо предотвратить реверсию мутанта к дикому типу, которая весьма возможна при рекомбинации гена дикого типа, контролируемого регулируемым гетерологичным промотором, или при инактивации гена за счет точечной мутации. Развитие компьютерных методов оптимизации и деоптимизации кодирующих последовательностей обеспечит высокоточное программирование уровня продукции целевых антигенов [19].

Для иммунизации против инфекции, вызванной рядом сероваров *S. pneumoniae*, достаточно успешно используется конъюгированная вакцина на основе капсульного полисахарида патогена. Однако ввиду значительного (около 92) числа известных серотипов создание универсальной вакцины является затруднительным. Более того, опыт применения мультивалентной конъюгированной вакцины показал, что элиминация серотипов, против которых была направлена данная вакцина, привела к распространению других серотипов патогена, часть из которых оказалась способна вызывать агрессивное заболевание [7].

Распространение альтернативных серотипов, а также существование сероваров различных патогенов, для которых создание субъединичной или конъюгированной вакцины затруднительно, не является исключительным феноменом. Для создания вакцин против таких атипичных вариантов патогена активно разрабатывается подход, известный как обратная вакцинология, который заключается в комплексном биоинформационно-функциональном анализе бактериальных антигенов и идентификации кандидатных иммуногенов. Обратная вакцинология, без сомнения, может рассматриваться как часть синтетической биологии в приложении к созданию вакцин [2, 34]. Доступность баз данных гомологичных белковых последовательностей из различных бактериальных геномов, а также различные признаки, указывающие на принадлежность того или иного гена или генетического кластера к факторам вирулентности и/или островкам патогенности (например, преимущественное



использование кодонов иных, чем основной геном, и сосуществование с гомологами известных факторов вирулентности), позволяют целенаправленно отбирать антигены-кандидаты. Основанием для отбора также является наличие сигнальных пептидов (у секретируемых белков) и трансмембранных доменов (у потенциальных поверхностных антигенов), определяемое *in silico* с помощью отработанных компьютерных алгоритмов [25]. Отобранные антигены продуцируют в *E. coli* и изучают индуцируемый ими иммунный ответ [37]. Отобранные на основании изучения индукции иммунного ответа антигены анализируют *in vivo* на наличие протективной активности. Одним из важных выводов из систематического анализа антигенов на основе обратной вакцинологии является то, что наибольший протективный эффект не обязательно присущ наиболее иммунодоминантным антигенам [3].

Первым примером успешного применения обратной вакцинологии является создание вакцины для профилактики менингококковой инфекции, вызываемой сероваром группы В (MenB). Создание конъюгированной вакцины в случае MenB невозможно, поскольку капсульный полисахарид этого серовара имеет значительное структурное сходство с олигосахаридами человека [17]. Стандартные эмпирические подходы к созданию MenB-вакцины оказались неэффективны ввиду высокой вариабельности поверхностных антигенов патогена [1]. Анализ иммуногенности и протективного эффекта был проведен для 350 из 570 кандидатных белков *Neisseria meningitidis*, отобранных на основе описанных выше критериев [12]. На момент анализа 220 белков не удалось проэкспрессировать в *E. coli*, в основном ввиду неоптимального для кишечной палочки использования кодонов. В настоящее время благодаря достижениям в области кодонной оптимизации, большинство этих белков можно было бы эффективно продуцировать в гетерологичных системах экспрессии. Тем не менее, 5 отобранных на основании бактерицидного эффекта при иммунизации антигенов позволили успешно завершить клинические испытания и создать вакцину, эффективную для профилактики инфекции MenB [33].

Успех методологии обратной вакцинологии способствовал развитию работ по идентификации протективных антигенов для целого ряда патогенов, включая *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, *S. pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Chlamydia pneumoniae* и *Mycobacterium tuberculosis* [2]. Накопление информации о структуре геномов и функции белков, образующих межвидовые гомологичные кластеры (COGs), а также о структуре иммунодоминантных эпитопов этих белков позволит в дальнейшем создавать вакцины, обеспечивающие защиту от все более широкого спектра вариантов одного и того же вида патогена [34].

В настоящее время, продуктами обратной вакцинологии являются субъединичные вакцины. Однако в рамках синтетической биологии нетрудно представить себе, что гены для идентифицированных различными путями протективных антигенов можно встроить в обладающий хорошо известными (и модифицированными) характеристиками вакцинный штамм бактерий другого вида. Этот подход активно развивается в последние годы, а прототипы вакцин, полученные таким путем называются векторными. В качестве бактериальных векторов используются хорошо охарактеризованные аттенуированные штаммы патогенов, такие как *Salmonella*, *Listeria* [38], которые фактически сами являются продуктом синтетической биологии. Использование живых векторных вакцин имеет значительные преимущества по сравнению с субъ-

единичными вакцинами. В частности, аттенуированные патогены не только могут пересекать различные барьеры в организме, такие как слизистые оболочки, защищая переносимые антигены от преждевременной деградациии, но и доставлять их в иммунокомпетентные клетки и ткани. Например, сальмонеллы имеют тропизм к М-клеткам пейеровых бляшек, которые окружают лимфоидные ткани кишечника, имеющие принципиальное значение для активации иммунного ответа [39]. Поглощение сальмонелл фагоцитами приводит к переносу микроорганизмов в лимфоидные органы и стимуляции иммунного ответа. Системы секреции сальмонелл способны выводить антигены в экстраклеточное пространство организма-хозяина, где они захватываются антигенпрезентирующими клетками, стимулируя Т-клеточный иммунный ответ [16]. Такие секреторные системы можно настроить и на продукцию цитокинов, которые работают как дополнительные высоко эффективные индукторы желаемого типа иммунного ответа. Первоначально бактериипродуценты цитокинов создавались для разработки противоопухолевых векторных вакцин [4]. Универсальные принципы иммунного ответа позволяют использовать такие продуценты и для создания экспериментальных антибактериальных векторных вакцин как на основе различных аттенуированных патогенных микроорганизмов [5], так и на основе непатогенных бактерий [44]. Микроорганизмы-векторы на основе симбиотических микроорганизмов, таких как лактококки, эффективно доставляют антигены на слизистые оболочки организма-хозяина, способствуя развитию иммунного ответа [48]. Вместе с тем, симбионты не имеют ряда механизмов индукции иммунного ответа, присущих патогенным аттенуированным векторам. Однако в случае необходимости иммунизации пациентов с иммунодефицитными состояниями аттенуированные патогенные микроорганизмы могут оказаться недостаточно безопасными. Пониженный уровень активации иммунной системы симбионтами может быть частично скомпенсирован параллельной продукцией цитокинов и других активирующих факторов [49].

Подобно цитокинам, вакцинные штаммы микроорганизмов могут нести и другие гены, продукция которых меняет характер взаимодействия бактерий с иммунной системой, повышая эффективность иммунного ответа. Известно, что липополисахариды (ЛПС) клеточной стенки многих микроорганизмов являются эндотоксинами, которые вызывают стрессовую реакцию организма, используемую патогенами для блокировки продуктивного иммунного ответа [29]. Изучение структуры ЛПС ряда грамотрицательных бактерий показало, что удаление некоторых компонентов эндотоксина, в первую очередь, дефосфорилирование, значительно снижает реактивность организма к модифицированному пирогену. Более того, дефосфорилированный низкопирогенный ЛПС, в частности, монофосфорил липид А (MPLA) является эффективным иммуногеном. Введение в ряд бактериальных штаммов ферментов, дефосфорилирующих ЛПС, служит для эффективного повышения иммуногенности [35]. Повышения эффективности иммунного ответа добивались также, вводя в вакцинные штаммы гены, продуктами которых являются различные молекулярные адьюванты — лиганды рецепторов врожденного иммунитета как белковой, так и не белковой природы [41].

Векторные вакцины являются наглядной иллюстрацией сути синтетикобиологического подхода: принципы и технологии, разработанные для одного вида бактерий, для одного из направлений вакцинации (например, вакцины

против внутриклеточных патогенов, которые должны индуцировать развитый Т-клеточный иммунный ответ), а также сами модифицированные в рамках синтетической биологии микроорганизмы могут с успехом использоваться для создания вакцин, защищающих от совершенно иных патогенов, и борьбы с заболеваниями другого типа, в частности, с опухолями [23]. Сложные комбинации модификаций на геномном, протеомном и метаболическом уровне формируют среду, необходимую для достижения максимально эффективной защиты организма от инфекции. Таким образом, реализуется модульная архитектура синтетической биологии, которая обещает в ближайшем будущем создание вакцин «по требованию», что весьма важно в условиях быстро меняющегося ландшафта инфекционных заболеваний, риска биотерроризма и появления атипичных патогенов [10].

Методы синтетической биологии являются неисчерпаемым источником для конструирования вакцин нового поколения, в которых разработки, созданные в одних условиях и для одного вида или группы видов патогенов, могут быть эффективно использованы напрямую как строительные блоки или опосредованно как инженерные подходы и концепции. Развитие новых технологий, в первую очередь, биоинформационных, методов высокопроизводительного секвенирования и методов синтеза генов и оптимизации различных характеристик их продуктов, включая иммунологические и метаболомные, позволит перейти к практическому конструированию микроорганизмов с широким спектром заданных иммунологических свойств [32]. Построенные на этой основе модели минимальных геномов и их реализация обеспечат высокую эффективность и безопасность синтетических живых вакцин, которые могут появиться в ближайшем будущем [10, 50].

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения о субсидии от 27 июня 2014 года №14.604.21.0067 (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0067).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bai X., Borrow R. Genetic shifts of *Neisseria meningitidis* serogroup B antigens and the quest for a broadly cross-protective vaccine. *Expert. Rev. Vaccines*. 2010, 9(10): 1203-1217.
2. Bambini S., Rappuoli R. The use of genomics in microbial vaccine development. *Drug Discov. Today*. 2009, 14: 252-260.
3. Barat S., Willer Y., Rizos K. et al. Immunity to intracellular *Salmonella* depends on surface-associated antigens. *PLoS Pathog.* 2012, 8(10):e1002966. doi:10.1371/journal.ppat.1002966.
4. Bolhassani A., Zahedifard F. Therapeutic live vaccines as a potential anticancer strategy. *Int. J. Cancer*. 2012, 131 (8): 1733-1743.
5. Carleton H.A. Pathogenic bacteria as vaccine vectors: teaching old bugs new tricks. *Yale J. Biol. Med.* 2010, 83 (4): 217-222.
6. Cheng A.A., Lu T.K. Synthetic biology: an emerging engineering discipline. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2012, 14: 155-178.
7. Cremers A.J., Mobegi F.M., de Jonge M.I. et al. The post-vaccine microevolution of invasive *Streptococcus pneumoniae*. *Sci. Rep.* 2015, 5: 14952.
8. Coleman J.R., Papamichail D., Yano M. et al. Designed reduction of *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity via synthetic changes in virulence factor codon-pair bias. *J. Infect. Dis.* 2011, 203 (9): 1264-1273.
9. Dastgheyb S.S., Otto M. Staphylococcal adaptation to diverse physiologic niches: an overview of transcriptomic and phenotypic changes in different biological environments. *Future Microbiol.* 2015, 10: 1981-1995.
10. De Groot A.S., Einck L., Moise L. et al. Making vaccines «on demand»: a potential solution for emerging pathogens and biodefense? *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013, 9 (9): 1877-1884.

11. D'Elia R.V., Harrison K., Oyston P. C. et al. Targeting the «cytokine storm» for therapeutic benefit. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013, 20 (3): 319-327.
12. Del Tordello E., Serruto D. Functional genomics studies of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Brief Funct. Genomics.* 2013, 12 (4): 328-340.
13. Editorial. *Synthetic Biology: What's in a name?* *Nature Biotechnology.* 2009, 27 (12): 1071-1073.
14. Editorial. *Unbottling the genes.* *Nature Biotechnology.* 2009, 27 (12): 1059.
15. Endy D. Foundations for engineering biology. *Nature.* 2005, 438 (7067): 449-453.
16. Figueira R., Watson K.G., Holden D.W. et al. Identification of *Salmonella* pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* serovar typhimurium: implications for rational vaccine design. *MBio.* 2013, 4 (2): e00065.
17. Finne J., Bitter-Suermann D., Goridis C. et al. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J. Immunol.* 1987, 138: 4402-4407.
18. Galen J.E., Curtiss R. The delicate balance in genetically engineering live vaccines. *Vaccine.* 2014, 32 (35): 4376-4385.
19. Gould N., Hendy O., Papamichail D. Computational tools and algorithms for designing customized synthetic genes. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2014, 2: 41.
20. Gutman G.A., Hatfield G.W. Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1989, 86, (10): 3699-3703.
21. Hörner M., Reischmann N., Weber W. Synthetic biology: programming cells for biomedical applications. *Perspect. Biol. Med.* 2012, 55 (4): 490-502.
22. Jefferies J.M. C., Johnston C.H. G., Kirkham L-A.S. et al. Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. *J. Infect. Dis.* 2007, 196 (6): 936-944.
23. Kindsmüller K., Wagner R. Synthetic biology: impact on the design of innovative vaccines. *Hum. Vaccin.* 2011, 7 (6): 658-662.
24. Kleber-Janke T., Becker W. M. Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr. Purif.* 2000, 19 (3): 419-424.
25. Liljeroos L., Malito E., Ferlenghi I. et al. Structural and computational biology in the design of immunogenic vaccine antigens. *J. Immunol. Res.* 2015, 4: 1-17.
26. Liss V., Hensel M. Take the tube: remodelling of the endosomal system by intracellular *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol.* 2015, 17 (5): 639-647.
27. Liu Y., Shin H.D., Li J. et al. Toward metabolic engineering in the context of system biology and synthetic biology: advances and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 99 (3): 1109-1118.
28. Morgan-Kiss R.M., Wadler C., Cronan J. E. et al. Long-term and homogeneous regulation of the *Escherichia coli* araBAD promoter by use of a lactose transporter of relaxed specificity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002, 99 (11): 7373-7377.
29. Neyen C., Lemaitre B. Sensing Gram-negative bacteria: a phylogenetic perspective. *Curr. Opin. Immunol.* 2015, 38: 8-17.
30. Pascual D.W., Suo Z., Cao L. et al. Attenuating gene expression (AGE) for vaccine development. *Virulence.* 2013, 4 (5): 384-390.
31. Powell D.A., Roberts L.M., Ledvina H.E. et al. Distinct innate responses are induced by attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutants. *Cell Immunol.* 2016, 299: 42-49.
32. Reiss T. *Synthetic Biology.* *FEBS Lett.* 2012, 586 (15): 2027-2028.
33. Rollier C.S., Dold C., Marsay L. et al. The capsular group B meningococcal vaccine, 4CMenB: clinical experience and potential efficacy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2015, 15 (1): 131-142.
34. Rinaudo C.D., Telford J.L., Rappuoli R. et al. Vaccinology in the genome era. *J. Clin. Invest.* 2009, 119 (9): 2515-2525.
35. Ruchaud-Sparagano M.H., Mills R., Scott J. et al. MPLA inhibits release of cytotoxic mediators from human neutrophils while preserving efficient bacterial killing. *Immunol. Cell Biol.* 2014, 92 (9): 799-809.
36. Runco L.M., Stauf C.B., Coleman J.R. Tailoring the immune response via customization of pathogen gene expression. *J. Pathog.* 2014: 1-7.
37. Serruto D., Bottomley M.J., Ram S. et al. The new multicomponent vaccine against menin-

- gococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine*. 2012, 30 (2): 87-97.
38. Shahabi V., Maciag P.C., Rivera S. et al. Live, attenuated strains of *Listeria* and *Salmonella* as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng. Bugs*. 2010, 1 (4): 235-243.
  39. Shima H., Watanabe T., Fukuda S. et al. A novel mucosal vaccine targeting Peyer's patch M cells induces protective antigen-specific IgA responses. *Int. Immunol.* 2014, 26 (11): 619-625.
  40. Slusarczyk A.L., Lin A., Weiss R. Foundations for the design and implementation of synthetic genetic circuits. *Nat. Rev. Genet.* 2012, 13 (6): 406-420.
  41. Steinhagen F., Kinjo T., Bode C. et al. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine*. 2011, 29 (17): 3341-3355.
  42. Szybalski W., Skalka A. Nobel prizes and restriction enzymes. *Gene*. 1978, 4: 181-182.
  43. Tacket C.O., Losonsky G., Nataro J.P. et al. Safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD 110, a delta ctxA delta zot delta ace derivative of El Tor Ogawa *Vibrio cholera*. *J. Infect. Dis.* 1993, 168 (6): 1536-1540.
  44. Tarahomjoo S. Development of vaccine delivery vehicles based on lactic acid bacteria. *Mol. Biotechnol.* 2012, 51 (2): 183-199.
  45. Van Blokland H.J., Kwaks T.H., Sewalt R.G. et al. A novel, high stringency selection system allows screening of few clones for high protein expression. *J. Biotechnol.* 2007, 128 (2): 237-245.
  46. Wang S., Kong Q., Curtiss R. New technologies in developing recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Microb. Pathog.* 2013, 58: 17-28.
  47. Weber W., Fussenegger M. Emerging biomedical applications of synthetic biology. *Nat. Rev. Genet.* 2011, 13 (1): 21-35.
  48. Wyszynska A., Kobiernicka P., Bardowski J. et al. Lactic acid bacteria — 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 99 (7): 2967-2977.
  49. Zhang H.X., Qiu Y.Y., Zhao Y.H. et al. Immunogenicity of oral vaccination with *Lactococcus lactis* derived vaccine candidate antigen (UreB) of *Helicobacter pylori* fused with the human interleukin 2 as adjuvant. *Mol. Cell. Probes*. 2014, 28 (1): 25-30.
  50. Zhang L.Y., Chang S.H., Wang J. How to make a minimal genome for synthetic minimal cell. *Protein Cell*. 2010, 1 (5): 427-434.

Поступила 03.03.16

Контактная информация: Козырь Арина Владимировна, к.б.н.,  
142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, р.т. (4967)36-00-60

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Л.А.Лисицкая<sup>1</sup>, А.В.Колесников<sup>1,2</sup>, А.В.Козырь<sup>1</sup>,  
И.Г.Шемякин<sup>1</sup>, А.К.Рябко<sup>1</sup>, О.Н.Красавцева<sup>1</sup>, И.А.Дятлов<sup>1</sup>

## БЕЛКИ И ДРУГИЕ ВОЗМОЖНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОНЬЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН: СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ

<sup>1</sup>ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская область;  
<sup>2</sup>Институт инженерной иммунологии, Любучаны, Московская область

Вакцинация является ключевым элементом профилактики инфекционных заболеваний. Для ряда патогенных микроорганизмов были разработаны эффективные вакцины на основе полисахаридной капсулы. Эффективность полисахаридов как антигена однако низкая у основных групп риска — младенцев и пациентов с иммунодефицитными состояниями. Принципиальным шагом вперед стало использование в качестве вакцин полисахаридных антигенов, конъюгированных с белковыми носителями. Несмотря на то, что использование носителей стало прорывом в повышении эффективности вакцин, механизмы взаимодействия белкового и углеводного компонентов вакцины в индукции Т-клеточного иммунного ответа и иммунологической памяти до сих пор полностью не

изучены. Отсутствие теоретической базы затрудняет проведение направленного инженеринга конъюгированных вакцин с целью расширения их номенклатуры и повышения эффективности. Несмотря на значительный объем новой информации в области взаимодействия различных антигенов и значительное расширение спектра потенциальных носителей, в том числе, и не белковой природы, число патогенов, для которых конъюгированные вакцины внедрены в клиническую практику, увеличилось незначительно. В обзоре суммирована информация о проблемах и перспективах использования носителей для конъюгированных полисахаридных вакцин.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 115—124

Ключевые слова: белок-носитель, конъюгированная вакцина, CRM197, дифтерийный токсид, столбнячный токсид, белок D *Haemophilus influenzae*, комплекс белков наружной мембраны *Neisseria*

*L.A.Lisitskaya*<sup>1</sup>, *A.V.Kolesnikov*<sup>1,2</sup>, *A.V.Kozyr*<sup>1</sup>,  
*I.G.Shemyakin*<sup>1</sup>, *A.K.Ryabko*<sup>1</sup>, *O.N.Krasavtseva*<sup>1</sup>, *I.A.Dyatlov*<sup>1</sup>

## PROTEINS AND OTHER CARRIERS FOR CREATION OF CONJUGATED VACCINES: PROPERTIES AND APPLICATION

<sup>1</sup>State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region;  
<sup>2</sup>Institute of Engineering Immunology, Lyubuchany, Moscow Region, Russia

Vaccination is a key element in prophylaxis of infectious diseases. Effective vaccines based on polysaccharide capsules were developed for a number of microorganisms. Effectiveness of polysaccharides as antigens, however, is low in the main risk groups — infants and patients with immune-deficiency conditions. Use of polysaccharide antigens conjugated with protein carriers as vaccines became a principal step forward. Though use of carriers became a breakthrough for vaccine effectiveness increase, mechanisms of interaction of proteins and carbohydrate components of the vaccines in T-cell immune response induction and immunological memory remains studied incompletely. Lack of theoretical base complicates execution of directed engineering of conjugated vaccines with the goal of expansion of their nomenclature and effectiveness increase. Despite significant volume of new information in the field of interaction of various antigens, and significant expansion of spectrum of potential carriers, including of non-protein nature, the number of pathogens, for which conjugated vaccines are introduced into clinical practice, remains insignificant. Information regarding problems and perspectives of use of carriers for conjugated polysaccharide vaccines is summarized in the review.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 115—124

Key words: protein-carrier, conjugated vaccine, CRM197, diphtheria toxoid, tetanus toxoid, *Haemophilus influenzae* protein D, *Neisseria* outer membrane protein complex

Многие патогенные бактерии, вызывающие инфекционные заболевания, имеют полисахаридную капсулу. Инкапсулированные бактерии *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* и *Haemophilus influenzae* вызывают тяжелые заболевания, такие как сепсис, пневмония и менингит. Наибольшую опасность эти патогены представляют для пожилых людей, детей и пациентов с иммунодефицитными состояниями. Капсулы блокируют продуктивный фагоцитоз бактерий за счет понижения эффективности фиксации комплемента и опсонизации патогена. С другой стороны, капсульные экзополисахариды бактерий (ЭПС) иммуногенны и много десятилетий используются как антигены для создания вакцин [26].

Капсульные полисахариды относятся к Т-независимым антигенам. Они не процессируются антигенпрезентирующими клетками, но взаимодействуют с В-клетками, индуцируя синтез антител. Т-независимый иммунный ответ, как

правило, не сопровождается переключением изотипов антител: отмеченные случаи переключения следует рассматривать, скорее, в качестве исключения, нежели, как правило [28]. Независимость иммунного ответа к ЭПС от Т-клеток постулирована на основании того, что при иммунизации такие антигены индуцируют, главным образом, IgM и в меньшей степени IgG2 без значительного переключения изотипов и при отсутствии индукции IgG1 и IgG3 [11]. В ответ на Т-независимые (Ti) антигены не формируется Т-клеточная иммунологическая память и не индуцируется вторичный иммунный ответ. В-клеточная память на Т-независимые полисахаридные антигены существенно отличается от памяти, формирующейся в ответ на белковые антигены. Уместно отметить, что экспериментально наличие иммунологической памяти к Ti антигенам, в частности, к ЭПС, было подтверждено сравнительно недавно [46]. Классические капсульные полисахариды бактерий в определенных условиях вызывают Т-клеточный ответ, однако его интенсивность можно рассматривать как низкую [22]. Особенности иммунного ответа делают полисахариды капсул бактерий практически не иммуногенными для детей в возрасте до 18 месяцев, инфекции у которых наблюдаются чаще и протекают тяжелее, чем у остальных возрастных групп. Эффективность защиты от инфекции при иммунизации полисахаридными вакцинами у старших возрастных групп также снижена [16, 46].

Способность усиливать иммуногенность полисахаридных антигенов (ПС) за счет химически конъюгированных с ними белковых антигенов впервые была обнаружена Эвери и Гобелем в 1929 г. Было показано, что слабая иммуногенность ЭПС типа 3 *S. pneumoniae* может быть усилена путем химической конъюгации полисахарида с белковыми носителями [7]. Дополнительным основанием для возможного повышения иммуногенности полисахаридов и других молекул при ковалентной конъюгации с белками стала теория гаптеннов [25]. Однако практическое использование обнаруженного феномена стало возможным почти 60 лет спустя, после формирования представлений о различных ветвях иммунного ответа, протективных антигенах бактерий, Т- и В-клеточном иммунитете. В результате этих фундаментальных открытий, в клиническую практику впервые были введены конъюгированные вакцины для профилактики инфекции *H. influenzae* (Hib) [42]. В дальнейшем были разработаны высокоэффективные конъюгированные вакцины для профилактики стрептококковой (*S. pneumoniae* тип 3) и менингококковой (*N. meningitidis*) инфекций. Конъюгированные полисахаридные вакцины обеспечили многократное снижение заболеваемости и смертности от указанных инфекций, особенно в детском возрасте [37].

Можно выделить три поколения носителей для конъюгированных вакцин. При этом, если первые два поколения применяются в полном объеме в клинической практике и являются продуктом первичной парадигмы, лежащей в основе создания конъюгированных вакцин, то разработка носителей третьего поколения является результатом появления нового знания в области иммунологии, в частности, новой информации о молекулярных адьювантах и ветвях иммунной системы, а также результатом переосмысления (пока не завершено) парадигмы, описывающей механизм адьювантного эффекта носителей и модификации иммунного ответа к полисахаридам в конъюгированных вакцинах.

Подбор белков-носителей первого поколения для конъюгированных вакцин носил практически исключительно эмпирический характер. Одним из основных аргументов в пользу выбора белка-носителя была возможность «эффективной индукции иммунного ответа как к полисахариду, так и к носителю». Уместно отметить, что в цитируемой работе белки-носители обозначались как «полезные» (useful) и «бессмысленные» (nonsense) с точки зрения

возможного использования иммунного ответа к носителю как дополнительного фактора защиты от распространенных инфекций [13].

Поэтому первые конъюгированные вакцины для защиты от *N. influenzae* типа b (Hib) чаще всего содержали в качестве белков-носителей дифтерийный и столбнячный токсиды (химически инактивированные дифтерийный — ДТ и столбнячный — ТТ токсины) [24]. Помимо указанных выше соображений, использование токсидов обуславливалось тем, что это были препараты уже разрешенные для использования в вакцинах — дифтерийной, столбнячной и комбинированной, заведомо являющиеся сильными антигенами [13]. К первому поколению носителей для конъюгированных вакцин можно отнести комплекс белков наружной мембраны *N. meningitidis* (ОМРС) и белок D *N. influenzae* [38].

Химическая инактивация токсинов, необходимая для их использования в качестве компонентов вакцины, снижает как иммуногенность белкового компонента, так и эффективность конъюгации, поскольку в результате обработки формальдегидом происходит модификация реакционно-способных аминогрупп, пригодных для «пришивки» полисахарида. Несмотря на эти недостатки, дешевизна и отработанные технологии получения химически инактивированных токсидов сделали их популярными носителями, которые применяются в современных конъюгированных вакцинах. На основе химически инактивированных токсидов и других антигенов первого поколения, создана широкая номенклатура вакцин к *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *N. influenzae* типа b, неоднократно описанных в литературе [19]. При этом номенклатура белков-носителей для вакцин, одобренных к использованию в клинике, по-прежнему ограничена столбнячным и дифтерийным токсоидами, белком D *N. influenzae* и комплексом белков наружной мембраны (ОМРС) [38]: Ряд других бактериальных токсинов, таких как термолabile токсин *Escherichia coli* [3], также можно отнести к первому поколению носителей.

Второе поколение носителей для конъюгированных вакцин возникло благодаря достижениям в области генетики микроорганизмов, молекулярной микробиологии и генетической инженерии. Первые носители второго поколения представлены генетически детоксифицированными мутантами ДТ и ТТ. Инактивация токсичности достигалась за счет селекции микроорганизмов с мутациями в генах токсинов H21G или G52E для дифтерийного токсина и E234A/H237A в легкой цепи столбнячного токсина [4, 30]. Мутант ДТ под обозначением CRM197 (cross-reactive material 197 [47]) в настоящее время является единственным представителем второго поколения носителей в конъюгированных вакцинах, разрешенных к применению в клинической практике. Этот белок весьма широко применяется в качестве носителя в конъюгированных вакцинах и заслуживает подробного описания.

Генетически инактивированный ДТ в форме CRM197 не обладает АДФ-рибозилирующей активностью токсина дикого типа, однако сохраняет способность связываться с рецептором на поверхности клеток организма-хозяина [32]. Аминокислотная замена G52E вызывает структурные изменения в каталитической субъединице токсина, но не затрагивает рецептор-связывающую. Структурное различие мутанта и исходного токсина сосредоточено в подвижной петле активного центра, прикрывающей карман, связывающий НАД [30]. Минимальные изменения в CRM197 по сравнению с ДТ дикого типа сделали этот белок весьма востребованным партнером для конъюгации [12]. Мутантный ДТ получают различными способами — как за счет продукции в гомологичной системе (штамм *C. diphtheriae* C7; несущий бактериофаг  $\beta$ 197 [47]), так и путем суперпродукции в *E. coli* [44] или в *Pseudomonas fluorescens*, используя Pfenex Expression Technology (Pfenex Inc., San Diego, CA) [36].



Уместно отметить, что CRM197 — далеко не единственный мутант ДТ, который испытывался в качестве белка-партнера для конъюгированных вакцин. В литературе встречаются описания и других мутантных производных ДТ. Однако несмотря на то, что был получен целый ряд мутантов ДТ, существенно или полностью детоксифицированных (CRM107, 9, 176, 228, 45, 102, 103 и др.), эти белки либо обладают остаточной токсичностью (например, CRM9 и 107), либо содержат значительные делеции аминокислотной последовательности (в частности, CRM30 и 45) [12].

На основе CRM197 создан целый ряд конъюгированных вакцин, в частности, Menveo - четырехвалентные конъюгированные вакцины против серогрупп А-С-W135-Y.N.meningitidis, Menjugate (Novartis Vaccines and Diagnostics, Sienna, Italy), Meningitec (против серотипа С N. meningitidis) (Wyeth, Quebec, Canada), Vaxem-Hib и HibTITER (против Hib), поливалентная пневмококковая конъюгированная вакцина Prevenar [12, 30] и др.

Ко второму поколению белков-носителей для конъюгированных вакцин можно отнести также гЕРА — мутантный экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa*. Для детоксификации этого белка методами генетической инженерии был сконструирован токсоид, в котором остаток глутаминовой кислоты в 553 положении был делетирован методом сайт-направленного мутагенеза [29]. Имеются также данные о том, что при химической модификации белка дикого типа в процессе конъюгации также происходит полная потеря токсичности [15]. Несмотря на то, что гЕРА использовался для создания различных экспериментальных конъюгированных вакцин, в частности, брюшнотифозной [39], вакцин против шигелл [14], энтерогеморрагической *E. coli* [45] и, собственно, *P. aeruginosa* [15], до сих пор ни один из препаратов на основе этого белка окончательно не одобрен для использования в клинике.

Описан ряд других токсинов — потенциальных носителей для вакцинных конъюгатов. В частности, предлагается использование нетоксичных пептидных повторов токсина *Clostridium difficile*, однако эти работы также находятся на стадии фундаментальных исследований [41]. Более того, позитивные данные относительно эффективности конъюгированной брюшнотифозной вакцины на основе гЕРА соседствуют с критической оценкой эффективности этого белка в качестве носителя для конъюгированного полисахарида [39].

Одной из основных проблем выбора того или иного токсина для создания конъюгата является слабость теоретической базы, описывающей механизм адъювантного эффекта белка-партнера в составе конъюгированной вакцины. Многие годы с момента внедрения первых конъюгированных вакцин в клиническую практику в качестве механизма активации и модификации иммунного ответа конъюгированными углеводами по сравнению с неконъюгированными рассматривалось простое вовлечение активированных CD4+ Т-клеток в иммунный ответ и их помощь антигенспецифическим В-клеткам, в результате которой происходило переключение изотипов и формирование иммунологической памяти [31]. Такой упрощенный подход к пониманию механизма адъювантного эффекта белкового партнера в составе конъюгированных вакцин превалировал на протяжении десятков лет и носил, скорее, умозрительно-эмпирический характер, нежели опирался на подробные экспериментальные данные. Лишь в самые последние годы стали появляться работы, свидетельствующие о том, что механизм активации иммунного ответа к углеводной части конъюгата более сложный, чем представлялось ранее [34]. Вместе с тем, информация, полученная в ходе этих исследований, пока не позволяет целенаправленно модулировать иммунный ответ в конъюгатах для его усиления по отношению к полисахаридам. Нет также ясности в вопросе о влиянии дополнительных адъювантных эффектов тех белковых партнеров

для конъюгации, которые способны активировать различные ветви иммунной системы, в частности, врожденный иммунитет [33].

Иллюстрацией недостаточных фундаментальных исследований свойств белковых антигенов как носителей в конъюгированных вакцинах является вопрос иммунной интерференции, связанной с предшествующей вакцинации иммунизацией белками-носителями, в частности, в составе дифтерийно- столбнячных вакцин, а также возникающей при одновременной иммунизации различными конъюгированными вакцинами с общим носителем. Несмотря на то, что в ряде работ эффект интерференции описан в деталях], единая концепция иммунной интерференции («индуцируемой носителем эпитопной супрессии», CIES) полностью не разработана. Только в последние годы появилась информация, указывающая на преимущественную роль В-клеток в формировании CIES, что имеет важные последствия для конструирования новых вакцин и разработки усовершенствованных протоколов иммунизации [40].

Кроме классической иммунной интерференции существуют и другие эффекты взаимодействия углеводного и белкового компонентов в конъюгатах. Например, изменения иммуногенности конъюгата могут происходить от серотипа к серотипу для одного и того же патогена [27]. Различные белки-носители, равно как и особенности генетических вариантов иммунизируемых, также могут вносить вклад в эффективность иммунного ответа к конъюгированным вакцинам [1]. В свое время изучение феномена иммунной интерференции привело некоторых исследователей к парадоксальному на тот момент выводу о том, что наилучшим партнером для конъюгации был бы антиген, эффективно индуцирующий гуморальный иммунный ответ к полисахариду, но не к антигену-носителю [17]. На тот момент (1992 г.) механизм такого иммунного ответа было достаточно сложно представить. Однако изменения, происходящие в концепции иммуногенности носителя и механизма распознавания конъюгатов иммунной системой открывают перспективы систематического изучения механизма иммунного ответа к конъюгированным вакцинам, а следовательно — перспективы нахождения закономерностей, управляющих этим иммунным ответом.

Детальное описание изменений в парадигме механизма модификации иммунного ответа к полисахаридам, конъюгированным с белками-носителями, приводится в нескольких недавно опубликованных обзорных материалах [1, 6, 10]. Следует отметить, что в рамках новой концепции распознавания иммунной системой гликопептидных антигенов авторам удалось сконструировать конъюгат полисахаридного антигена *S. pneumoniae* с пептидом, представляющим собой Т-клеточный эпитоп овальбумина, который индуцировал иммунный ответ к патогену почти на два порядка более эффективно по сравнению с классическими конъюгатами [10]. Минимизация размера молекулы-носителя позволит ограничить число реакционно-способных групп для конъюгации с антигеном; тем самым, обеспечивая стандартизацию структуры и способа конъюгации композитного антигена, следовательно, создавая предпосылки для анализа закономерностей, обуславливающих ответ на конъюгированные антигены. С другой стороны, недавние успехи в иммунологии полисахаридов, позволившие идентифицировать минимальные антигенные структуры в больших полимерных молекулах, а с другой - в химии углеводов, обеспечивающей автоматический или полуавтоматический синтез олигосахаридов, обусловили создание химически детерминированных антигенов с возможностью их ориентированной химической или хемозэнзиматической «пришивки» к носителю в определенном положении [2]. Первая вакцина, содержащая синтетический углеводный компонент (конъюгированный с белковым носителем) была соз-

дана в 2003 г. [48]. В целом, упомянутые инновации будут способствовать созданию антигенов со стандартными, химически детерминированными характеристиками. Стандартизация, в свою очередь, не только обеспечит создание вакцин с высокой предсказуемостью свойств, но и позволит значительно снизить вклад неопределенности, вызванной химической гетерогенностью конъюгатов, в свойства вакцин. Необходимо отметить, что, несмотря на интенсивное изучение влияния химии конъюгации на эффективность иммунного ответа к конъюгату, сравнительный анализ для разных способов конъюгации и разных молекул весьма затруднен ввиду неопределенного числа молекул полисахарида и носителя, формирующих гетерогенные конъюгаты [20]. С другой стороны, вопросы структуры иммуногенного конъюгата, в частности, минимального размера углеводного полимера, необходимого для индукции эффективного иммунного ответа, а также способа «пришивки» олиго- или полисахарида к носителю, также относятся к неполностью изученным. Поэтому синтез стандартизованных как по сайту конъюгации, так и по структуре и молекулярному весу стандартизованных конъюгатов будет означать большой шаг вперед в изучении механизма иммунного ответа, и эффектов, привносимых в конъюгат как углеводным, так и белковым компонентами.

Прогресс в области конъюгированных вакцин может быть достигнут и в связи с новыми исследованиями в области взаимодействия различных антигенов и иммунной системы. В частности, в последние годы активно исследуются лиганды толл-подобных рецепторов, которые способны активировать врожденный иммунитет и тем самым служить эффективными молекулярными адьювантами, запускающими работу иммунного ответа к бактериальным антигенам. В частности, известным бактериальным белком, являющимся лигандом для толл-подобного рецептора TLR5, является бактериальный флагеллин из *S. typhimurium*. Было сделано предположение о том, что и использование FliC в качестве партнера для конъюгации может значительно повысить эффективность иммунного ответа к конъюгированному углеводному антигену [43]. Было предложено использование FliC в качестве адьюванта для создания вакцины против малярии, основанной на C-концевом фрагменте поверхностного белка-1 мерозоита *Plasmodium vivax* (MSP119) и агонисте - TLR5 [8].

Высокая эффективность иммунного ответа к конъюгатам с FliC может быть связана не только со способностью этого антигена активировать врожденный иммунитет, но и усиливать эффективность презентации антигена за счет повышенного уровня эндоцитоза и процессинга комплексов FliC с лигандом [9]. Другим интересным активатором иммунного ответа является холерный токсин, который также способен активировать врожденный иммунитет, а также CD8+ Т-лимфоциты и мукозальный иммунитет. Исследования конъюгатов полисахаридов с нетоксичной В-субъединицей холерного токсина проводятся достаточно давно, и можно ожидать значительного их расширения по мере накопления данных о механизме адьювантного эффекта холерного токсина [35, 50].

Фундаментальные исследования могут изменить не только парадигму механизма иммунного ответа к носителю, но и положение, согласно которому наиболее эффективным носителем для конъюгированного антигена является белковая молекула. Утверждение о том, что иммунный ответ к полисахаридам может быть только Т-независимым, было опровергнуто в процессе изучения ответа к цвиттерионным полисахаридам. Цвиттерионные полисахариды распознаются Т-клетками в контексте антигенпрезентирующих клеток и индуцируют классический Т-зависимый иммунный ответ. Более того, введение положительных зарядов в классические анионные бактериальные полисахари-

риды индуцировало их распознавание Т-клетками [18]. Уместно отметить, что цвиттерионные полисахарды теряют способность активировать иммунную систему в отсутствие толл-подобного рецептора TLR2, что дает дополнительные указания на важную роль агонистов рецепторов врожденного иммунитета в развитии иммунного ответа к различным вакцинным композициям [23].

Липополисахариды (ЛПС) являются лигандами для толл-подобного рецептора TLR4 и также рассматриваются в качестве антигенов для создания антибактериальных вакцин. Большим недостатком ЛПС является их реактогенность (известная как пирогенность), которая не позволяет использовать нативные липополисахариды для создания вакцинных препаратов. Однако разработка систем химической и особенно ферментативной детоксификации ЛПС значительно увеличивает ценность этих молекул для использования в качестве антигенов. В частности, монофосфорил липид А (MPLA), который является продуктом ферментативной деградации и связанной с ней депирогенизации некоторых видов ЛПС, является высокоэффективным адъювантом для создания как антибактериальных, так и противоопухолевых вакцин [10, 49].

Учитывая прогресс в изучении системы врожденного иммунитета, весьма вероятно появление новых антигенов, обладающих адъювантными свойствами и пригодных в качестве партнеров для создания конъюгированных вакцин. Значительный прогресс в области конъюгированных вакцин может быть достигнут в связи с тем, что гликоконъюгаты с белками или другими молекулами, обладающими сильной иммуногенностью и способностью активировать различные ветви иммунной системы, широко используются в экспериментальных противоопухолевых терапевтических вакцинах [21]. Работы по изучению механизма иммунного ответа к конъюгированным антигенам [1, 6, 10] выявили значительный пробел между информацией о противоопухолевых и антибактериальных конъюгатах, существующий несмотря на то, что оба типа конъюгатов призваны активировать иммунную систему человека и животных. В процессе создания вакцин данные, полученные при создании конъюгатов и при изучении взаимодействия антигенов (в том числе и бактериальных) с иммунной системой человека и животных, могут впоследствии использоваться для улучшения свойств антибактериальных препаратов, и, наоборот, эффективные схемы создания противоиных конъюгатов могут быть адаптированы для разработки противораковых средств [49]. Эти данные помогут расширить круг мишеней для конъюгированных антигенов [5] и сформировать фундамент для выработки универсальной концепции носителей и антигенов для конъюгированных вакцин.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения о субсидии от 27 июня 2014 года №14.604.21.0067 (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0067).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Колесников А.В., Козырь А.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А. Современные представления о механизме активации иммунного ответа конъюгированными полисахаридными вакцинами. Журн. микробиол. 2015, 3: 97-106.
2. Adamo R., Nilo A., Castagner B. et al. Synthetically defined glycoprotein vaccines: current status and future directions. Chem. Sci. 2013, 4 (8): 2995-3008.
3. Andrade G.R., New R.R., Sant'Anna O.A. et al. A universal polysaccharide conjugated vaccine against O111 E. coli. Hum. Vaccin Immunother. 2014, 10 (10): 2864-2874.
4. Ashton A. C., Li Y., Doussau F. et al. Tetanus toxin inhibits neuroexocytosis even when its Zn<sup>(2+)</sup>-dependent protease activity is removed. Biol. Chem. 1995, 270 (52): 31386-31390.
5. Astronomo R.D., Burton D.R. Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? Nat. Rev. Drug. Discov. 2010, 9 (4): 308-324.

6. Avci F.Y. Novel strategies for development of next-generation glycoconjugate vaccines. *Curr. Top. Med. Chem.* 2013, 13(20): 2535-2540.
7. Avery O. T., Goebel W. F. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins: Immunological specificity of synthetic sugar-protein antigens. *J. Exp. Med.* 1929, 50 (4): 533-550.
8. Bargieri D. Y., Rosa D. S., Braga C.J.M. et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella typhimurium* FliC flagellin. *Vaccine.* 2008, 26: 6132-6142.
9. Bates J.T., Graff A.H., Phipps J.P. et al. Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8+ T cell response independently of TLR5 and MyD88. *J. Immunol.* 2011, 186(11): 6255-6262.
10. Berti F., Adamo R. Recent mechanistic insights on glycoconjugate vaccines and future perspectives. *ACS Chem. Biol.* 2013, 8(8): 1653-1663.
11. Blanchard-Rohner G., Pollard A. J. Long-term protection after immunization with protein-polysaccharide conjugate vaccines in infancy. *Expert. Rev. Vaccines.* 2011, 10 (5): 673-684.
12. Broker M., Costantino P., DeTora L. et al. Biochemical and biological characteristics of cross-reacting material 197 CRM197, a non-toxic mutant of diphtheria toxin: use as a conjugation protein in vaccines and other potential clinical applications. *Biologicals.* 2011, 39 (4): 195-204.
13. Chu C., Schneerson R., Robbins J. B. et al. Further studies on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcal type 6A polysaccharide-protein conjugates. *Infect. Immun.* 1983, 40 (1): 245-256.
14. Cohen D., Ashkenazi S., Green M.S. et al. Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet.* 1997, 349 (9046): 155-159.
15. Cryz S.J., Jr., Sadoff J. C., Furer E. Octavalent *Pseudomonas aeruginosa* O-polysaccharide-toxin A conjugate vaccine. *Microb. Pathog.* 1989, 6 (1): 75-80.
16. Defrance T., Taillardet M., Genestier L. T cell-independent B cell memory. *Curr. Opin. Immunol.* 2011, 23 (3): 330-336.
17. Del Giudice G. New carriers and adjuvants in the development of vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 1992, 4 (4): 454-459.
18. Gallorini S., Berti F., Parente P. et al. Introduction of zwitterionic motifs into bacterial polysaccharides generates TLR2 agonists able to activate APCs. *J. Immunol.* 2007, 179 (12): 8208-8215.
19. Goldblatt D. Recent developments in bacterial conjugate vaccines. *J. Med. Microbiol.* 1998, 47 (7): 563-567.
20. Grayson E. J., Bernardes G. J. L., Chalker J. M. et al. A coordinated synthesis and conjugation strategy for the preparation of homogeneous glycoconjugate vaccine candidates. *Angew. Chem. Intl. Ed.* 2011, 50: 4127-4132.
21. Guo Z., Wang Q. Recent development in carbohydrate-based cancer vaccines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, 13 (5-6): 608-617.
22. Jeurissen A., Bossuyt X. T cell-dependent and -independent responses. *J. Immunol.* 2004, 172 (5): 2728.
23. Kalka-Moll W.M., Tzianabos A.O., Bryant P.W. et al. Zwitterionic polysaccharides stimulate T cells by MHC class II-dependent interactions. *J. Immunol.* 2002, 169 (11): 6149-6153.
24. Knuf M., Kowalzik F., Kieninger D. Comparative effects of carrier proteins on vaccine-induced immune response. *Vaccine.* 2011, 29: 4881-4890.
25. Landsteiner K. The specificity of serologic reactions. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1936.
26. Lee C. J., Lee L. H., Lu C. S., Wu A. Bacterial polysaccharides as vaccines - immunity and chemical characterization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001, 491: 453-471.
27. Leonard E. G., Canaday D. H., Harding C. V. et al. Antigen processing of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine carrier protein CRM197 differs depending on the serotype of the attached polysaccharide. *Infect. Immunity.* 2003, 71 (7): 4186-4189.
28. Lesinski G. B., Westerink M. A. Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J. Microbiol. Methods.* 2001, 47 (2): 135-149.
29. Lukac M., Pier G.B., Collier R.J. Toxoid of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A generated by deletion of an active-site residue. *Infect. Immun.* 1988, 56 (12): 3095-3098.

30. Malito E., Bursulaya B., Chen C. et al. Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *PNAS*. 2012, 109 (14): 5229-5234.
31. McCool T. L., Harding C. V., Greenspan N. S., Schreiber J. R. B- and T-cell immune responses to pneumococcal conjugate vaccines: divergence between carrier- and polysaccharide-specific immunogenicity. *Infect. Immun.* 1999, 67 (9): 4862-4869.
32. Mitamura T., Higashiyama S., Taniguchi N. et al. Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* 1995, 270 (3): 1015-1019.
33. Mizel S.B., Bates J.T. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J. Immunol.* 2010, 185 (10): 5677-5682.
34. Muthukumar S., Stein K. E. Immunization with meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugate induces polysaccharide-reactive T cells in mice. *Vaccine*. 2004, 22 (9-10): 1290-1299.
35. Olvera-Gomez I., Hamiltona S.E., Xiaoa Z. et al. Cholera toxin activates nonconventional adjuvant pathways that induce protective CD8 T-cell responses after epicutaneous vaccination. *PNAS*. 2012, 109 (6): 2072-2077.
36. Patent EP 2533805 A1, 19.12.2012. Caulfield M.J., Ahl P.L., Blue J.T., Cannon J.L. 15-valent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine composition. Patent USA, EP20110742633, 2011.
37. Pollard A. J., Perrett K. P., Beverley P. C. Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. *Nat. Rev. Immunol.* 2009, 9 (3): 213-220.
38. Pichichero M. E. Protein carriers of conjugate vaccines. *Human Vaccines Immunotherapeutics*. 2013, 9 (12): 2505-2523.
39. Pier G.B. Is *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A a good carrier protein for conjugate vaccines? *Human Vaccines*. 2007, 3 (2): 39-40.
40. Pobre K., Tashani M., Ridha I. et al. Carrier priming or suppression: understanding carrier priming enhancement of anti-polysaccharide antibody response to conjugate vaccines. *Vaccine*. 2014, 32 (13): 1423-1430.
41. Romano M.R., Leuzzi R., Cappelletti E. et al. Recombinant *Clostridium difficile* toxin fragments as carrier protein for PSII surface polysaccharide preserve their neutralizing activity. *Toxins (Basel)*. 2014, 6 (4): 1385-1396.
42. Shapiro E. D. New vaccines against *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatr. Clin. North. Am.* 1990, 37 (3): 567-583.
43. Simon R., Wang J.Y., Boyd M.A. et al. Sustained protection in mice immunized with fractional doses of *Salmonella enteritidis* core and O polysaccharide-flagellin glycoconjugates. *PLoS One*. 2013, 8 (5): e64680.
44. Stefan A., Conti M., Rubboli D. et al. Overexpression and purification of the recombinant diphtheria toxin variant CRM197 in *Escherichia coli*. *J. Biotechnology*. 2010, 156: 245- 252.
45. Szu S.C., Ahmed A. Clinical studies of *Escherichia coli* O157:H7 conjugate vaccines in adults and young children. *Microbiol. Spectr.* 2014, 2 (6): 1-7.
46. Taillardet M., Haffar G., Mondière P. et al. The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood*. 2009, 114 (20): 4432-4440.
47. Uchida T., Gill D.M., Pappenheimer A.M. Mutation in the structural gene for diphtheria toxin carried by temperate phage  $\beta$ . *Nature New Biology* 1971, 233: 8-11.
48. Verez-Bencomo V., Fernandez-Santana V., Hardy E. et al. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. *Science*. 2004, 305 (5683): 522-525.
49. Wang Q., Zhou Z., Tang S. et al. Carbohydrate-monophosphoryl lipid a conjugates are fully synthetic self-adjuvanting cancer vaccines eliciting robust immune responses in the mouse. *ACS Chem. Biol.* 2012, 7 (1): 235-240.
50. Wiedinger K., Romlein H., Bitsaktsis C. Cholera toxin B induced activation of murine macrophages exposed to a fixed bacterial immunogen. *Ther. Adv. Vaccines*. 2015, 3 (5-6): 155-163.

*Поступила 03.03.16*

Контактная информация: Козырь Арина Владимировна, к.б.н.,  
142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, р.т. (4967) 36-00-60

## РЕЦЕНЗИИ И КРИТИКА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*О.В.Бухарин, И.Н.Чайникова, Н.Б.Перунова. В.П.Широбоков (ред.).* Медицинская микробиология, вирусология и иммунология.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 125—126

Изменения в структуре типовой программы учебной дисциплины «микробиология, вирусология и иммунология» с учетом принципов и основ общеевропейской Болонской декларации определили необходимость создания учебников с учетом новых знаний и профессиональных интересов специалистов медицинского профиля. Это делает актуальным создание учебника под редакцией академика НАН и НАМН Украины профессора В.П.Широбокова «Медицинская микробиология, вирусология и иммунология»: учебник для студентов высших медицинских учебных заведений (перевод с украинского — Андрианова Т.В., Бобырь В.В., Виноград Н.А. и др., Винница, Нова книга, 2015, 856 с., 1000 экз.).

Учебник написан с участием высоко квалифицированных ведущих микробиологов, вирусологов, эпидемиологов, иммунологов Украины и состоит из двух частей. Часть I (Общая микробиология) представлена 17 разделами и включает материалы о роли микроорганизмов в эволюции жизни на Земле, в создании биосферы, истории микробиологии с представлением материалов о лауреатах Нобелевской премии в области микробиологии, вирусологии и иммунологии от 1901 до 2011 годов (раздел 1). В разделах 2 — 10 рассмотрены вопросы по морфологии и физиологии микроорганизмов, включая генетику микроорганизмов и раздел биотехнологии. Разделы 11 — 17 отражают современное состояние вопросов по инфекции и иммунитету. Представлены материалы по факторам и механизмам врожденного и адаптивного иммунитета, особенностях иммунного ответа с учетом свойств микроорганизмов (внутри-, внеклеточные бактерии, вирусы), а также в сжатой форме рассмотрены вопросы иммунопатологии. Наглядно представлены материалы по иммунным реакциям, иммунодиагностике, иммунокоррекции и иммунопрофилактике.

Вторая часть (Специальная микробиология) включает 14 разделов, посвященных общим вопросам микробиологической диагностики инфекционных заболеваний, частной бактериологии, вирусологии, микологии, протозоологии, гельминтологии. Значимыми с позиции практической медицины представляются материалы, посвященные клинической микробиологии, экологии микроорганизмов, санитарной микробиологии и внутриутробным инфекциям. К достоинствам учебника следует отнести включение вопросов об особенностях микрофлоры различных биотопов человека (биотопы пищеварительного тракта, кожи, дыхательных путей, конъюнктивы, урогенитального тракта), о роли нормальной микрофлоры, биопленкообразовании и формировании микробных ассоциаций. Авторами рассматриваются и современные подходы профилактики и терапии нарушений микробиоценозов человека.

В заключительном разделе учебника авторы рассматривают вопросы о

роли микроорганизмов в эволюции жизни, то есть своеобразную «микробную летопись», что представляется новым и интересным для студентов.

Все разделы, как и подразделы книги, имеют четкие названия, облегчая работу с материалом учебника. Каждый раздел начинается с характеристики основных понятий, выделяются основные положения, которые следует усвоить обучаемому, и заканчивается контрольными вопросами, позволяющими закрепить знания и проконтролировать их усвоение.

Другая особенность книги — краткость, сочетающаяся с высокой информативностью. Методологическая система изложения материала и его насыщенность современной научной информацией подчеркивает стремление авторов облегчить восприятие материала. Раскрывается единство микробиологических, иммунологических, эпидемиологических и клинических характеристик возбудителей различных заболеваний, что делает книгу пригодной не только для студентов, но и для расширения кругозора специалистов в других областях знаний.

Оригинальность авторов учебника проявляется и в расположении материала, композиции книги, которая отражает внутреннюю логику изложения и, следовательно, логику возрений всего авторского коллектива. Студенты будут воспринимать медицинскую микробиологию, вирусологию и иммунологию в предложенном логическом варианте, а интерны и микробиологи — оценивать и пересматривать с новой позиции свои уже сложившиеся представления по ряду вопросов, которые раскрывают современные молекулярные механизмы взаимодействия человека с разнообразными микроорганизмами.

Обилие информативных и качественных иллюстраций не только дополняет текст, но и создает условия для качественного овладения студентами современного достаточно сложного материала, изложенного с привлечением данных на генетическом, молекулярном уровне, описанием новых технологий, новейших диагностических методов.

Учебник содержит ряд оригинальных авторских фотографий, продуманно сделан подбор цветных изображений культур микроорганизмов, схем реакций, таблиц, фотографий, рисунков.

Книгу завершают два приложения, в одном из которых предоставлено таксономическое описание основных патогенных для человека микроорганизмов и заболеваний, которые они вызывают. Второе приложение является словарем терминов по микологии. Использование авторским коллективом словаря, рамки которого ограничены только терминами по микологии, видимо, связано с трудностями, возникающими при изучении студентами заболеваний, вызванных грибами, а также особенностями их морфологии и патогенеза заболеваний. Наличие в книге предисловия, краткого оглавления, развернутого содержания, указателя условных сокращений и обозначений, предметного указателя, указателя латинских названий микроорганизмов, списка литературы и именного указателя обеспечивает читателю качественную «дорожную карту» в поиске необходимой информации.

В заключение не будет преувеличением сказать, что изданный учебник удачен, в полной мере отвечает своему назначению. При этом, тираж книги явно мал, и авторам следует подумать о его переиздании.



## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

## ORIGINAL ARTICLES

- Чайникова И.Н., Филиппова Ю.В., Фролов Б.А., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Бондаренко Т.А., Панфилова Т.В., Железнова А.Д., Сарычева Ю.А., Бухарин О.В. Влияние милацина на биопленкообразование бактерий..... 3
- Клюева С.Н., Шуковская Т.Н., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Кузнецова Е.М., Волох О.А. Оценка стимулирующего влияния биогенного амина серотонина на капсулоподобное вещество *Francisella tularensis*..... 9
- Бывалов А.А., Дудина Л.Г., Литвинец С.Г., Мартинсон Е.А. Иммунохимическое изучение рецепции бактериофага чумного Покровской ..... 16
- Дугаржапова З.Ф., Бадмаев Н.Б., Такайшвили В.Е., Кравец Е.В., Цыдыпов Б.З., Очиров О.Н., Ауржанаев А.А., Содномов Б.В., Малаткина Б.Б., Зверева О.А., Шахаева О.П., Булутов К.В., Ханхареев С.С., Чеснокова М.В., Балахонov С.В. Экологическое и микробиологическое обследование неблагополучных по сибирской язве территорий Республики Бурятия ..... 22
- Савилов Е.Д., Астафьев В.А., Винокурова М.К., Огарков О.Б., Жданова С.Н., Алексеева Г.И., Кравченко А.Ф. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Дальневосточном федеральном округе и Республике Саха (Якутия)... 28
- Исаева О.В., Кичатова В.С., Карлсен А.А., Солонин С.А., Дмитриев П.Н., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Многолетняя динамика распространения генотипов вируса гепатита С в Московском регионе..... 35
- Воробьев Д.В., Соломка В.С., Плахова К.И., Дeryabin Д.Г., Кубанов А.А. NG-MAST генотипирование штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, выделенных на территории Российской Федерации в 2012 — 2015 годах..... 42
- Ахматова Н.К., Хоменков В.Г., Волкова Е.В., Ахматова Э.А., Семочкин И.А., Перепанова Т.С., Зверев В.В. Бактериальные лизаты *Escherichia coli* стимулируют продукцию дефенсинов нейтрофилами периферической крови ..... 50
- Полищук В.Б., Рыжов А.А., Костинov М.П., Магаршак О.О., Шмитко А.Д., Лукачев И.В., Васильева Г.В., Благовидов Д.А., Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Карчевская Н.А. Состояние противокорревого иммунитета у пациентов листа ожидания трансплантации легких ..... 55
- Костинov М.П., Лукачев И.В. Возможности усовершенствования вакцинопрофилактики в современной России ..... 60
- Савилов Е.Д., Колесников С.И., Брико Н.И. Коморбидность в эпидемиологии — новый тренд в исследованиях общественного здоровья..... 66
- Chainikova, I.N., Filippova, Yu.V., Frolov, B.A., Perunova, N.B., Ivanova, E.V., Bondarenko, T.A., Panfilova, T.V., Zheleznova, A.D., Sarycheva, Yu.A., Bukharin, O.V. Miliacine influence on the biofilm formation of bacteria
- Klyueva, S.N., Schukovskaya, T.N., Bugorkova, S.A., Erokhin, P.S., Kuznetsova, E.M., Volokh, O.A. Evaluation of stimulating effect of biogenic amine serotonin on capsule-like substance of *Francisella tularensis*
- Byvalov, A.A., Dudina, L.G., Litvinets, S.G., Martinson, E.A. Immunochemical study of reception of plague bacteriophage Pokrovsky
- Dugarzhapova, Z.F., Badmaev, N.B., Takaisvili, V.E., Kravets, E.V., Tsydyпов, B.Z., Ochirov, O.N., Ayurzhanaev, A.A., Sodnomov, B.V., Malatkina, B.B., Zvereva, O.A., Shakhaeva, O.P., Bulutov, K.V., Khankhareev, S.S., Chesnokova, M.V., Balakhonov, S.V. Ecological and microbiological examination of territories non-welfare for anthrax in the Republic of Buryatia
- Savilov, E.D., Astafiev, V.A., Vinokurova, M.K., Ogarkov, O.B., Zhdanova, S.N., Alekseeva, G.I., Kravchenko, A.F. Epidemiologic situation for tuberculosis in the Far Eastern Federal District and the Republic of Sakha (Yakutia)
- Isaeva, O.V., Kichatova, V.S., Karlsen, A.A., Solonin, S.A., Dmitriev, P.N., Kyuregyan, K.K., Mikhailov, M.I. Multi-year dynamics of spread of hepatitis C virus genotypes in Moscow Region
- Vorobiev, D.V., Solomka, V.S., Plakhova, K.I., Deryabin, D.G., Kubanov, A.A. NG-MAST genotyping of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Russian Federation in 2012 — 2015
- Akhmatova, N.K., Khomenkov, V.G., Volkova, E.V., Akhmatova, E.A., Semochkin, I.A., Perepanova, T.S., Zverev, V.V. Bacterial lysates of *Escherichia coli* stimulate production of defensins by peripheral blood neutrophils
- Polischuk, V.B., Ryzhov, A.A., Kostinov, M.P., Magarshak, O.O., Shmitko, A.D., Lukachev, I.V., Vasileva, G.V., Blagovidov, D.A., Chuchalin, A.G., Avdeev, S.N., Karchevskaya, N.A. Condition of anti-measles immunity in patients on waiting-list for lung transplantation
- Kostinov, M.P., Lukachev, I.V. Possibilities of enhancement of vaccine prophylaxis in contemporary Russia
- Savilov, E.D., Kolesnikov, S.I., Briko, N.I. The comorbidity in epidemiology - new trend in public health research

## ДИСКУССИЯ

## DISCUSSION

ОБЗОРЫ

- Семенова И.Б., Михайлова Н.А.* Серотипнезависимые вакцины против пневмококковой инфекции ..... 76
- Будченко А.А.* Эффективность тест-систем для диагностики мелиоидоза и сапа на основе реакции пассивной гемагглютинации и твердофазного иммуноферментного анализа ..... 86
- Кравцов А.Л.* Роль нейтрофильных внеклеточных ловушек при особо опасных бактериальных инфекциях ..... 95
- Колесников А.В., Козырь А.В., Шемякин И.Г., Лисицкая Л.А., Марин М.А., Рябко А.К., Дятлов И.А.* Синтетическая биология как инструмент для разработки инновационных вакцин для профилактики бактериальных инфекций ..... 105
- Лисицкая Л.А., Колесников А.В., Козырь А.В., Шемякин И.Г., Рябко А.К., Красавцева О.Н., Дятлов И.А.* Белки и другие возможные носители для создания конъюгированных вакцин: свойства и применение ..... 115

РЕЦЕНЗИИ И КРИТИКА

- Бухарин О.В., Чайникова И.Н., Перунова Н.Б., Ширококов В.П.* (ред.) Медицинская микробиология, вирусология и иммунология ..... 125

REVIEWS

- Semenova, I.B., Mikhailova, N.A.* Serotype-independent vaccines against pneumococcal infection
- Budchenko, A.A.* Effectiveness of a test-system for diagnostics of melioidosis and glanders based on passive hemagglutination reaction and solid-phase enzyme immunoassay
- Kravtsov, A.L.* Role of neutrophil extracellular traps in especially dangerous bacterial infections
- Kolesnikov, A.V., Kozyr, A.V., Shemyakin, I.G., Lisitskaya, L.A., Marin, M.A., Ryabko, A.K., Dyatlov, I.A.* Synthetic biology as an instrument for development of innovative vaccines for prophylaxis of bacterial infections
- Lisitskaya, L.A., Kolesnikov, A.V., Kozyr, A.V., Shemyakin, I.G., Ryabko, A.K., Krasavtseva, O.N., Dyatlov, I.A.* Proteins and other carriers for creation of conjugated vaccines: properties and application

BOOK REVIEWS AND CRITIQUE

- Bukharin, O.V., Chainikova, I.N., Perunova, N.B., V.P. Shirobokov* (ed.). Medical microbiology, virology and immunology