

ISSN 0372.9311

ЖУРНАЛ

МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ
И
ИММУНОБИОЛОГИИ

Издательский
дом

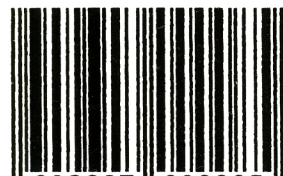


С-ИНФО

6 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;
А.В.КАРАУЛОВ, д.м.н., проф., акад. 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., член-корр. РАН; В.П.СЕРГИЕВ, д.м.н.,
проф., акад. РАН; Арег А.ТОТОЛЯН, д.м.н., проф., акад. РАН; Н.Н.ФИЛАТОВ, д.м.н., проф.,
член-корр. РАН; Н.Д.ЮШУК, д.м.н., проф., акад. РАН

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

6

ноябрь—декабрь

МОСКВА 2016

«С-ИНФО»

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

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

Адрес редакции и издателя:
121059, Москва, ООО «С-инфо», а/я 88,
редакция ЖМЭИ (для отправки статей и запросов о прохождении статей)
Телефон редакции: (495) 796-92-91 (не для справок о прохождении статей)

Зав. редакцией Л.В.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 1712 (адресная подписка через Сбербанк РФ) — 1 170 р.

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

<http://www.jmicrobiol.com>

Подписано в печать 23.11.16. Выход в свет 13.12.16. Формат 70x108 1/16
Печать офсетная. Тираж 1000. Заказ 27-2016

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
E-mail: kr_zvezda@mail.ru

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

О.В.Рыбальченко^{1,2}, О.Г.Орлова^{1,2}, О.Н.Вишневецкая^{1,2},
В.В.Капустина¹, И.Л.Потокин², В.В.Лаврикова³

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК В УСЛОВИЯХ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

¹Санкт-Петербургский государственный университет; ²Гос.НИИ особо чистых био-препаратов, Санкт-Петербург; ³ОАО «Биопрепарат», Москва

Цель. Исследование влияния микрогравитации на формирование бактериальных биопленок *Lactobacillus plantarum* 8PA-3 в условиях космического полета. *Материалы и методы.* Информацию о влиянии микрогравитации на развитие биопленок получали при исследовании пробиотических лактобацилл *L. plantarum* 8PA-3 в специальной аппаратуре в процессе проведения космических экспериментов на российском сегменте Международной Космической Станции. Сравнительный анализ роста планктонных и биопленочных форм клеток, развивающихся в условиях космического полета и в наземных условиях, проводили микробиологическими и электронно-микроскопическими методами с использованием сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. *Результаты.* В ходе космического эксперимента впервые показана ускоренная динамика формирования биопленок лактобацилл *L. plantarum* 8PA-3 на поверхности полимерных подложек из полистирола. Микробиологический анализ бактериальной культуры также подтвердил ускоренный рост *L. plantarum* 8PA-3 в условиях микрогравитации, по сравнению с наземными условиями. Впервые в космическом эксперименте выявлена ультраструктура планктонных форм клеток *L. plantarum* 8PA-3, участвующих в образовании биопленок, в условиях микрогравитации. *Заключение.* Данные сравнительного электронно-микроскопического анализа, полученные в космических экспериментах, имеют важное значение для научного обоснования эффекта воздействия микрогравитации на бактериальные сообщества, развивающиеся в виде биопленок — наиболее естественной формы существования микроорганизмов. Полученные результаты могут быть учтены при создании новых антибактериальных средств и дезинфектантов, а также способов обработки поверхностей модулей пилотируемых космических комплексов, что позволит уточнить методы эффективной профилактики распространения биопленок, представляющих риск для здоровья экипажа и нормального функционирования оборудования на Международной Космической Станции.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 3—10

Ключевые слова: *Lactobacillus*, бактериальные биопленки, электронная микроскопия, условия микрогравитации, космический эксперимент, Международная Космическая Станция

О.В.Рыбальченко^{1,2}, О.Г.Орлова^{1,2}, О.Н.Вишневецкая^{1,2},
В.В.Капустина¹, И.Л.Потокин², В.В.Лаврикова³

FEATURES OF FORMATION OF BACTERIAL BIOFILMS IN CONDITIONS OF SPACE FLIGHT

¹St. Petersburg State University; ²State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg; ³«Biopreparat», Moscow, Russia

Aim. Study the effect of microgravitation on the formation of *Lactobacillus plantarum* 8PA-3 bacterial biofilms in the conditions of space flight. *Materials and methods.* Information on the effect of microgravitation on the development of biofilms was obtained during study of *L. plantarum* 8PA-3 probiotic lactobacilli in special equipment in the process of execution of space experiments

in the Russian segment of the International Space Station. Comparative analysis of growth of plankton and biofilm forms of cells developing in the conditions of space flight and surface conditions was carried out by microbiologic and electron-microscopy methods using scanning and transmission electron microscopy. *Results.* Accelerated dynamics of formation of *L. plantarum* 8PA-3 lactobacilli biofilm on the surface of polymer substrate was shown for the first time during the space experiment. Microbiological analysis of the bacterial culture has also confirmed the accelerated growth of *L. plantarum* 8PA-3 under microgravitation compared with surface conditions. Ultrastructure of plankton form of *L. plantarum* 8PA-3 taking part in formation of biofilms in conditions of microgravitation was detected for the first time in the space experiment. *Conclusion.* Data on comparative electron-microscopic analysis obtained in space experiments are important for scientific justification of the effect of microgravitation on bacterial communities developing as biofilms — the most natural form of existence of microorganisms. The results obtained could be taken into consideration during creation of novel antibacterial means and disinfectants as well as methods of treatment of surfaces of modules of piloted space complexes that could allow to clarify methods of effective prophylaxis of biofilm spread which pose a risk of health of the crew and normal functioning of equipment in the International Space Station.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 3—10

Key words: *Lactobacillus*, bacterial biofilms, electron microscopy, microgravitation conditions, space experiment, International Space Station

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время действие экстремальных факторов космической среды (вакуум, низкие температуры, влияние гипомагнитного поля, космическая радиация) исследовано еще в недостаточно полном объеме. К числу факторов, требующих дополнительного изучения, можно отнести невесомость, к которой, как оказалось, на начальных этапах исследования живые организмы могут достаточно успешно адаптироваться.

Получены данные о влиянии микрогравитации на живые организмы, в том числе на различные системы органов животных, а также микроорганизмы [1, 3, 4].

Однако до сих пор недостаточность знаний о влиянии невесомости на организм человека представляет собой одну из главных медико-биологических проблем, понимание которой чрезвычайно важно для решения вопросов жизнеобеспечения долгосрочных полетов и межпланетных станций [5, 6]. В последнее время на основании полученных предварительных данных стало понятно, что при исследовании влияния микрогравитации особое внимание следует уделять участию в этом процессе бактерий, которые, являясь обязательным компонентом микробиоценоза живых систем, в том числе и человека, могут оказывать на него как положительное, так и негативное воздействие, в том числе и во время космических полетов.

О том, что микроорганизмы в естественных условиях обитания существуют в виде особой формы микробных сообществ — биопленок, стало известно сравнительно недавно [11]. Оказалось, что биопленки — это непрерывно изменяющиеся микробные сообщества, в которых клетки защищены поверхностными слоями и межклеточным белково-полисахаридным матриксом [9]. Биопленки имеют особую ультраструктурную организацию и могут состоять из одного или нескольких видов бактерий иногда в сочетании с микроскопическими грибами и развиваться на поверхностях различных объектов живой и неживой природы, включая организм человека и животных [7, 17]. В здоровом организме они присутствуют в составе нормальной микробиоты на коже, слизистых оболочках половых органов, в ротовой полости, на зубной эмали

и т. д. [10]. Формирование биопленки способствует выживанию бактерий в определенном биотопе организма хозяина и зависит от активности регуляторной системы бактерий — QS-система (Quorum Sensing — чувство кворума) [12, 15]. В виде биопленок бактерии обнаруживают в окружающей среде во влажных условиях повсеместно. При развитии заболевания их выявляют на медицинских катетерах, искусственных суставах, а также на сердечных клапанах [10].

Представления о биопленках, подтвержденные современными методами, во многом изменили взгляды на возникновение инфекционного процесса [2]. Оказалось, заболевания, связанные с развитием биопленок, чаще переходят в хроническую форму, имеют высокую частоту рецидивов, а также труднее поддаются лечению, что может стать причиной летального исхода. Бактерии, находясь в биопленках под защитой полисахаридного слоя, способны выдерживать в 1000 раз большие концентрации антимикробных препаратов, чем планктонные формы клеток [14]. Интерес к биопленкам возник не только потому, что они повышают патогенный потенциал бактерий. Помимо клинических аспектов, бактериальные биопленки вызывают особое внимание с позиции эволюционной теории, поскольку представляют собой особую форму взаимодействия клеток со сложными элементами специализации и кооперации, являясь в некотором смысле «переходным звеном» к многоклеточным организмам [15].

Исследования биопленок важны также и с точки зрения поиска эффективных методов борьбы с биоразрушениями, затрагивающими, в том числе, и внутреннее содержимое космических кораблей. Результаты, накопленные при эксплуатации орбитального комплекса «Мир» и МКС, дают основание рассматривать в качестве основного, постоянно действующего фактора риска, обуславливающего биоповреждения оборудования из различных полимерных и металлических материалов, а также помехи в работе аппаратуры — микробные биопленки [13].

При анализе материалов оказалось, что к настоящему моменту исследование механизмов формирования и ингибирования микробных биопленок в космическом эксперименте внимание не уделялось, поэтому сравнительный анализ динамики их развития в условиях макро- и микрогравитации, возможно, способствовал бы выявлению закономерностей, объясняющих особенности развития микробных сообществ подобного типа.

Целью настоящего сообщения являлось исследование влияния факторов космического полета на формирование бактериальных биопленок. Данные получены в результате проведения двух космических экспериментов (КЭ) «Биопленка» на российском сегменте (РС) МКС-41/42 и МКС-44/45 в 2015 году.

В процессе проведения КЭ предусматривалось решение следующих задач: определение динамики биопленкообразования пробиотических бактерий *L. plantarum* 8PA-3 в условиях невесомости; выявление закономерностей при воздействии факторов космического полета на ультраструктуру бактериальных биопленок *L. plantarum* 8PA-3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили лактобациллы *L. plantarum* 8PA-3, используемые для производства пробиотических препаратов, основной функцией которых является нормализация микробиоты желудочно-кишечного

тракта человека. Лактобациллы выращивали на агаризованной среде МРС-4 (*Lactobacillus* MRS Agar, HiMedia, Индия) в течение 48 часов при температуре +37°C, затем полученную культуру в виде отдельных колоний переносили на жидкую питательную среду МРС-1 (*Lactobacillus* MRS Broth, HiMedia, Индия) и культивировали при тех же условиях. Из полученной бактериальной суспензии методом разбавления стерильной средой МРС-1 получали питательную среду с концентрацией клеток *L. plantarum* 8РА-3 10^3 КОЕ/мл.

Для проведения экспериментов на борт МКС-41/42 и МКС-44/45 доставляли укладку «Константа», состоящую из 6 кассет по 4 ячейки в каждой. На Земле все ячейки кассет «Константа» герметично заправляли двумя рабочими растворами: первый — суспензионная культура лактобацилл *L. plantarum* 8РА-3 в питательной среде. В каждую ячейку помещали по четыре полимерных подложки (простерилизованные кусочки полимерных носителей из полистирола) весом 0,5 г для прикрепления к ним бактериальных клеток и развития биопленок. Во вторую емкость (цилиндр с поршнем) помещали раствор фиксатора — 5% водный раствор глутаральдегида. Суть эксперимента, проводимого в условиях микрогравитации, заключалась в фиксации биопленок *L. plantarum* 8РА-3 на определенных этапах их формирования для проведения спектроскопических и электронно-микроскопических исследований.

Герметично закрытые на винтовые соединения с системой прокладок кассеты «Константа» помещали в укладку, доставляли на МКС и хранили до начала эксперимента при температуре $+4\pm 2^\circ\text{C}$. Параллельно проводили заправку и укладку аналогичных кассет «Константа» для проведения эксперимента в наземных условиях.

В назначенное в соответствии с температурно-временной циклограммой время одновременно в условиях КЭ и в наземном эксперименте (НЭ) кассеты «Константа» перемещали в термостат и выдерживали при температуре +37°C, создавая условия для формирования бактериями биопленок на полимерных подложках. Через определенные промежутки времени (0 ч, 10 ч 35 мин, 18 ч 35 мин, 39 ч, 65 ч 30 мин и 97 ч 30 мин) согласно циклограмме из термостата извлекали по одной кассете и проводили фиксацию материала путем введения 5% глутаральдегида из цилиндров с поршневой системой в ячейки с бактериальной суспензией, после чего кассеты размещали на хранение при температуре $+4\pm 2^\circ\text{C}$ до отправки на Землю.

После возвращения на Землю аппаратуру с материалами КЭ доставляли в лабораторию, где проводили микробиологический анализ космических и наземных образцов, определяя оптическую плотность бактериальных суспензий с дальнейшим исследованием планктонных форм клеток методами трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Формирование биопленок на подложках полимерных носителей анализировали методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Параллельные наземные эксперименты проводили одновременно с КЭ в соответствии с циклограммой «Биопленка».

Спектрофотометрический анализ для определения оптической плотности бактериальной суспензии *L. plantarum* 8РА-3 проводили на спектрофотометре UNICO-2800 (Россия). Исследовали материал из ячейки № 1 каждой кассеты. Определение оптической плотности суспензии осуществляли при длине волны 540 нм.

Электронно-микроскопическое исследование биопленок и планктонных форм клеток пробиотических бактерий *L. plantarum* 8РА-3 осуществляли одновременно несколькими электронно-микроскопическими методами с использованием СЭМ и ТЭМ.

При получении препаратов для СЭМ биопленки на полимерных носителях, изъятые из ячеек и фиксированные в процессе КЭ и наземного эксперимента в 5% водном растворе глутаральдегида (ГА), тщательно отмывали дистиллированной водой и подвергали обезвоживанию в серии спирта возрастающей концентрации, в смеси 96° спирта с ацетоном и в ацетоне. Полимерные носители с обезвоженными на них биопленками приклеивали электропроводным клеем к специальным держателям, высушивали на воздухе при комнатной температуре и напыляли золотом в вакуумной установке JFC-1100 (JEOL, Япония). Готовые препараты просматривали в сканирующем электронном микроскопе JSM-35C (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Особенности подготовки образцов из суспензионной культуры лактобацилл для ТЭМ описаны нами ранее [7, 8]. Пробы фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на буфере Хенкса (рН 7,2) при температуре +4°С, затем промывали дистиллированной водой и подвергали вторичной фиксации в 1% водном растворе OsO₄ в течение 2 час при температуре +4°С. Для обезвоживания образцы погружали в растворы спирта возрастающей концентрации по стандартной методике и заключали в смолу Spurr. Окраску ультратонких срезов проводили общепринятым методом. Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM 100C (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено электронно-микроскопическое исследование биопленок, образованных при развитии лактобацилл на поверхности полимерных подложек в ячейках кассет «Константа» в условиях КЭ. Электронограммы пробиотических бактерий *L. plantarum* 8РА-3 на полимерных носителях через 0 ч и 97 ч 30 мин с момента перемещения кассет в термостат представлены на рис. 1.

На начальном этапе космического и наземного экспериментов методами СЭМ выявлены общие закономерности в динамике образования биопленок *L. plantarum* 8РА-3 на полимерных подложках: единичные клетки располагались группами, образуя на поверхности носителя микроколонии, которые с течением времени формировали более крупные скопления клеток (рис. 1.1, 2.1). На завершающем этапе выращивания (через 97 ч 30 мин) как в НЭ, так и в КЭ крупные микроколонии соединялись в единую структуру, покрывающую поверхность всего полимерного носителя (рис. 1.2, 2.2). Однако в отли-

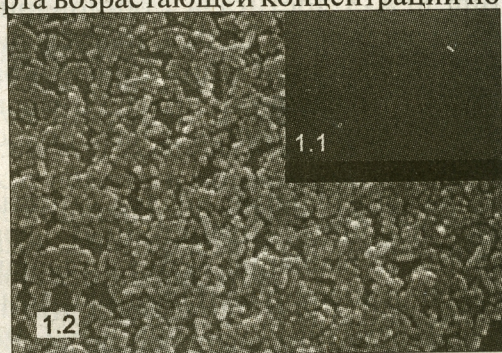


Рис. 1 (СЭМ). Космический эксперимент.

1.1. Поверхность полимерной подложки с единичными клетками *L. plantarum* 8РА-3 — 0 час. 1.2. Поверхность полимерной подложки с бактериальной биопленкой *L. plantarum* 8РА-3 — 97 час 30 мин.

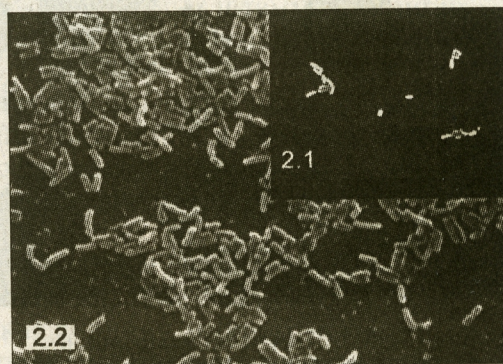


Рис. 2 (СЭМ). Наземный эксперимент.

2.1. Поверхность полимерной подложки с единичными клетками *L. plantarum* 8РА-3 - 0 час. 2.2. Бактериальная биопленка *L. plantarum* 8РА-3 на полимерной подложке — 97 час 30 мин.

чие от наземного эксперимента, в КЭ в последнем образце (97 ч 30 мин) формировалась более мощная многослойная бактериальная биопленка, в толще которой просматривались более крупные микроколонии.

Микробиологический анализ изменения оптической плотности суспензионных образцов КЭ через 0, 10, 18, 39, 65 и 98 часов с начала выращивания бактериальной культуры подтвердил ускоренный рост лактобацилл в условиях микрогравитации, по сравнению с наземными условиями. Если в наземных условиях культура *L. plantarum* 8РА-3 достигала стационарной фазы роста через 24 часа, то в условиях микрогравитации данный уровень развития отмечали уже через 12 часов с начала выращивания клеточной суспензии.

Сравнительный анализ строения суспензионных (планктонных) форм клеток *L. plantarum* 8РА-3 в условиях макро- и микрогравитации методом ТЭМ показал, что клетки, участвующие в образовании биопленок в КЭ, отличались особыми морфологическими свойствами (рис. 3.1, 3.2).

На ультратонких срезах клеток *L. plantarum* 8РА-3 через 18 час 35 мин



Рис. 4 (ТЭМ). Наземный эксперимент.

4.1. Ультратонкий срез клеток *L. plantarum* 8РА-3 через 18 час 35 мин роста. Интактные физиологически активные клетки. Длина маркера 0,5 мкм.

4.2. Ультратонкий срез клеток *L. plantarum* 8РА-3 через 97 час 30 мин роста. Деструктивные изменения в цитоплазме, отслоение клеточной стенки от цитоплазматической мембраны. Длина маркера 1 мкм.

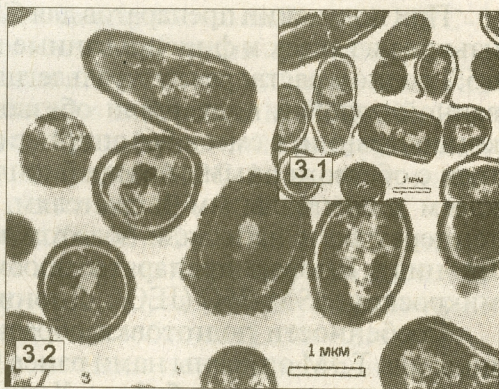


Рис. 3 (ТЭМ). Космический эксперимент.

3.1. Ультратонкий срез клеток *L. plantarum* 8РА-3 через 18 час 35 мин роста. Утолщение, разрыв, отслоение и фокальная деструкция клеточных стенок. Длина маркера 1 мкм. 3.2. Ультратонкий срез клеток *L. plantarum* 8РА-3 через 97 час 30 мин роста. Деструкция цитоплазмы и отслоение клеточной стенки, частичный лизис клеток. Длина маркера 1 мкм.

роста в КЭ видно значительное утолщение и отслоение клеточной стенки от цитоплазматической мембраны у большинства клеток уже на начальных этапах выращивания культуры, при этом отмечена фокальная деструкция молодых клеток лактобацилл. На поздних этапах выращивания в КЭ деструктивные изменения затрагивают наряду с клеточной стенкой цитоплазму, при этом отмечен частичный лизис клеток лактобацилл.

В наземном эксперименте ультраструктурные изменения в виде утолщения и отслоения клеточных стенок, свидетельствующие о естественных возрастных преобразованиях в клетках, от-

мечали на последних этапах стационарного роста бактерий, причем характерного для КЭ фокального разрушения клеточных стенок лактобацилл *L. plantarum* 8РА-3 не обнаруживалось (рис. 4.1, 4.2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе КЭ впервые методом СЭМ показано ускоренное формирование биопленок *L. plantarum* 8РА-3 на поверхности полимерных подложек в условиях микрогравитации. Микробиологический анализ планктонной культуры *L. plantarum* 8РА-3 выявил ускоренный рост лактобацилл в условиях микрогравитации, по сравнению с наземными условиями.

Методом ультратонких срезов впервые (ТЭМ) выявлены морфологические свойства планктонных форм клеток *L. plantarum* 8РА-3, участвующих в образовании биопленок в условиях микрогравитации в КЭ.

Полученные в ходе КЭ данные представляют основу для научного обоснования эффекта воздействия микрогравитации на бактериальные сообщества, развивающиеся в виде биопленок.

В замкнутом пространстве космических кораблей в связи с возникновением особой формы биоценоза макроорганизмы (человек) — микроорганизмы происходит постоянный взаимообмен микробиоты членов экипажа, большая часть которой становится общей для всего состава МКС. В дальнейшем, по мере усложнения задач космических полетов и включения в системы жизнеобеспечения других биологических компонентов в виде растений и животных потребуются разработка программ мониторинга и регулирования сукцессии микробной составляющей космических аппаратов.

Поэтому данные, полученные в результате проведенного КЭ, позволят установить методы эффективной профилактики распространения биопленок, представляющих риск для здоровья экипажа и нормального функционирования оборудования МКС. Полученные данные могут быть учтены при создании новых антибактериальных средств и дезинфектантов, а также способов обработки поверхностей модулей пилотируемых космических комплексов.

Кроме того, полученная информация позволит сформулировать подходы к управлению процессом создания искусственных биопленок на основе пробиотических бактерий и подборе наиболее эффективных штаммов индигенных бактерий при создании новых препаратов-пробиотиков, необходимых для поддержания здоровья космонавтов.

Данные сравнительного электронно-микроскопического анализа, выявившие отличия на разных этапах образования биопленок в космических и в наземных условиях, возможно, станут теоретической основой для описания таких сложных микробных сообществ как бактериальные биопленки с позиции эволюционного развития.

Совершенно очевидно, что в будущем от глубины изучения проблемы (в том числе с помощью новых научных технологий, таких как геномика протеомика, метаболомика и транскриптомика) влияния микрогравитации на бактериальные биопленки и их взаимодействия с организмом-хозяина зависит успех влияния на многие биодеструктивные изменения аппаратуры и патологические состояния космонавтов в условиях космического полета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев-Андриевский А. А., Шенкман Б. С., Попова А. С. и др. Экспериментальные исследования на мышцах по программе полета биоспутника «Бион-М1». Авиакосм. экол. мед. 2014, 48 (1): 14-27.

2. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации. М., Триада, 2011.
3. Григоренко Д. Е., Сапин М. Р. Перестройка лимфоидных структур селезенки у песчанок после космического полета. Морфология. 2012, 142 (4): 67-71.
4. Кобатов А.И., Вербицкая Н.Б., Добролеж О.В., Рыбальченко О.В., Петров Л.Н. Изучение пробиотических характеристик *Lactobacillus acidophilus*, выращенных в условиях космического полета. Медицина экстремальных ситуаций. 2008, 4 (26): 66-78.
5. Пономарев С. А., Антропова Е. Н., Берендеева Т. А. и др. Особенности изменений показателей врожденного иммунитета при воздействии на организм человека неблагоприятных факторов длительного космического полета. Авиакосм. экол. мед. 2013, 47 (4): 123-124.
6. Потапов А. Н., Синяк Ю. Е., Петров В. М. Проблемы медико-биологического обеспечения межпланетных экспедиций. Авиакосм. экол. мед. 2013, 47 (1): 55-60.
7. Рыбальченко О.В. Электронно-микроскопическое исследование межклеточных взаимодействий микроорганизмов при антагонистическом характере взаимоотношений. Микробиология. 2006, 75 (4): 550-555.
8. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Гуслева О.Р. и др. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл. Журн. микробиол. 2010, 6: 66-70.
9. Branda S.S., Vik A., Friedman L., Kolter R. Biofilms: the matrix revised. Trends Microbiol. 2005, 13: 21-25.
10. Donald R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15: 167-193.
11. Macfarlane S. Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract. J. Clin. Gastroenterol. 2008, 242 (3): S142-S143.
12. Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 2001, 55: 165-199.
13. Novikova N.D. Review of the knowledge of microbial contamination of the russian manned spacecraft. Microb. Ecol. 2004, 47: 127-132.
14. Olson M.E., Ceri H., Morck D.W. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can. J. Vet. Res. 2002, 66: 86-92.
15. Popat R., Crusz S., Doggle S. The social behaviours of bacterial pathogens. Brit. Med. Bullet. 2008, 87: 63-75.
16. Pratt L.A., Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol. Microbiol. 1998, 30: 285-294.
17. Rybalchenko O., Bondarenko V., Rozlomi V., Orlova O. Ultrastructural organization of biofilms of opportunistic microorganisms — representatives of gut human microbiota. Genes Nutrition. 2010, 1.5: S92.

Поступила 25.05.16

Контактная информация: Рыбальченко Оксана Викторовна, д.б.н., проф., 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9, р.т. (812)328-20-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Н.А.Терентьева¹, Н.Ф.Тимченко², В.А.Голотин^{1,3}, В.А.Рассказов¹

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТОКСИНОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии, ²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, ³Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

Цель. Исследование влияния термолabileного (ТЛТ) и термостабильного (ТСТ) летальных токсинов *Yersinia pseudotuberculosis* на развитие эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, процессы биосинтеза нуклеиновых кислот и белка в клетках эмбрионов и активность нуклеозидкиназ морского ежа. *Материалы и методы.* Для выделения ТЛТ и ТСТ использовали штаммы *Y. pseudotuberculosis* 2517 (pYV-) и 512 (pYV48МД,

pYV82MD). Для проведения экспериментов и выделения нуклеозидкиназ использовали гаметы и эмбрионы морского ежа *S. intermedius*. **Результаты.** Оба изученных токсина *Y. pseudotuberculosis* обладали спермиотоксичным действием и снижали оплодотворяющую способность спермиев морского ежа. LD₅₀ ТЛТ составила 1 мкг/мл, а ТСТ — 2 мкг/мл. Токсины влияли на развитие эмбрионов морского ежа, вызывая тяжелые морфологические повреждения, остановку развития эмбрионов на ранних этапах эмбриогенеза, разрушение клеток и гибель эмбрионов. При этом повреждающее действие ТЛТ наблюдалось при более низких его концентрациях по сравнению с ТСТ. ТЛТ ингибировал биосинтез ДНК и РНК при концентрациях 1 — 2 мкг/мл. ТСТ не оказывал влияния на биосинтез нуклеиновых кислот даже в высоких концентрациях, но ингибировал биосинтез белка в эмбрионах морского ежа. ТЛТ не снижал уровня включения меченых аминокислот клетками эмбрионов. ТЛТ оказывал ингибирующее действие на активность тимидин- и уридинкиназы морского ежа, тогда как ТСТ не влиял на активность этих ферментов. **Заключение.** Оба белковых токсина *Y. pseudotuberculosis* влияют на развитие эмбрионов морского ежа, однако механизмы воздействия ТЛТ и ТСТ на эмбрионы и протекающие в них процессы различаются.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 10—19

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, токсины, эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, биосинтез ДНК, РНК, белка, нуклеозидкиназы

*N.A. Terentjeva*¹, *N.F. Timchenko*², *V.A. Golotin*^{1,3}, *V.A. Rasskazov*¹

BIOLOGICAL ACTIVITY OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* TOXINS

¹Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, ²Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ³Far-Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Aim. Study of effect of heat-labile (HLT) and thermostable (HST) lethal toxins of *Yersinia pseudotuberculosis* on the development of embryos of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, processes of biosynthesis of nucleic acids and protein in embryo cells and activity of nucleoside-kinases of sea urchin. **Materials and methods.** *Y. pseudotuberculosis* strains 2517 (pYV-) and 512 (pYV48MD, pYV82MD) were used for isolation of HLT and HST. Gametes and embryos of sea urchin *S. intermedius* were used to carry out the experiments and isolate nucleoside-kinases. **Results.** Both of the studied toxins of *Y. pseudotuberculosis* possessed spermiotoxic effect and reduced fertilizing ability of sea urchin spermies. HLT LD₅₀ was 1 µg/ml, and HST — 2 µg/ml. Toxins affected the development of embryos of sea urchin resulting in severe morphologic damages, cessation of the development of embryos at early stages of embryogenesis, destruction of cells and death of embryos. Wherein, damaging effect of HLT was observed at lower concentrations compared with HST. HLT inhibited DNA and RNA biosynthesis at concentrations of 1-2 µg/ml. HST did not affect biosynthesis of nucleic acids even at high concentrations, but inhibited protein biosynthesis in sea urchin embryos. HLT did not reduce the level of inclusion of labeled amino acids into embryo cells. HLT had inhibiting effect on the activity of thymidine- and uridine-kinase of sea urchin, whereas HST did not affect these enzymes. **Conclusion.** Both of *Y. pseudotuberculosis* protein toxins affect the development of sea urchin embryos, however, mechanisms of action of HLT and HST on embryos and processes occurring in them differ.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 10—19

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, toxins, embryos of *Strongylocentrotus intermedius* sea urchin, DNA, RNA, protein biosynthesis, nucleoside-kinases

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Yersinia* широко распространены в окружающей среде, они изолированы из различных биотических и абиотических объектов [2]. Микроорганизмы способны проникать в клетки экто- и эндотермных орга-

низмов и растений, размножаться в тканях различных органов, продуцировать токсины, оказывать токсический эффект и вызывать гибель клеток [8]. Эти бактерии реализуют потенциал патогенности (адгезивность, инвазивность) в клетках организмов, повреждают их, размножаются в тканях различных органов, продуцируют токсины [8].

К настоящему времени есть сведения о нескольких токсинах *Yersinia pseudotuberculosis* [3 — 5, 12 — 14]. В данной работе представлены сведения о биологической активности термолабильного летального токсина (ТЛТ) и термостабильного летального токсина (ТСТ) *Y. pseudotuberculosis*. Эти токсины отличаются друг от друга по молекулярной массе, отношению к температуре, биологическим свойствам. Однако роль этих токсинов бактерий псевдотуберкулеза в патогенезе болезни не ясна. Остаются малоизвестными их мишени и механизм действия на клетки макроорганизма.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния ТЛТ и ТСТ *Y. pseudotuberculosis* на гамету и развитие эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, а также процессы биосинтеза клеточных биополимеров, протекающие в эмбрионах.

Гаметы и эмбрионы морского ежа широко используются как модельная система для биотестирования различных соединений, в том числе для исследований в областях фармакологии и токсикологии [1]. На ранних стадиях развития в клетках эмбрионов протекает интенсивный и достаточно синхронный синтез нуклеиновых кислот. Обладая способностью развиваться в морской среде без каких-либо добавок, эмбрионы могут включать экзогенные предшественники в состав клеточных биополимеров. Это дает возможность исследовать протекающие в эмбриональных клетках процессы биосинтеза нуклеиновых кислот и других важных биомолекул, а также действие различных агентов на эти процессы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *Y. pseudotuberculosis* 2517 O3 серотипа (Mollaret H., Франция), утративший плазмиду вирулентности (pYV-), и штамм 512, несущий плазмиды pYV48МД и pVM82МД. Токсины ТЛТ и ТСТ получены по методам, описанным Тимченко Н.Ф. и др. [8]. Для проведения экспериментов были использованы морские ежи *S. intermedius*, отловленные в заливе Петра Великого (Японское море). В процессе исследования использовали шейкер S-3.02.10М (Латвия), микроскоп с фотоаппаратом Motic AE21.

В работе использованы следующие реактивы: реактивы квалификации хч, [³H]-тимидин, [³H]-уридин, [³H]-аланин или [³H]-лейцин (Изотоп, Россия); DEAE-целлюлоза, DEAE-бумага и GF/C-фильтры (Whatman, Англия), DEAE-toyopearl (Toyo-Soda, Япония); blue sepharose (Amersham Biocsciences).

Яйцеклетки получали путем встряхивания морских ежей и стимуляции икрометания введением в целомическую полость ежа 1 мл 0,5 М КСl. Яйцеклетки собирали в стеклянные стаканы объемом 100 мл с морской водой. Осевшую икру отмывали от КСl профильтрованной морской водой. Сперму получали, сильно встряхивая самцов морских ежей.

Для оплодотворения к суспензии яйцеклеток в морской воде при мягком перемешивании добавляли сперму. Количество подбирали таким образом, чтобы на 1 яйцеклетку приходилось около 500 спермиев. Степень оплодотво-

рения определяли под микроскопом. Во всех экспериментах оплодотворение яйцеклеток составляло более 95%. Оплодотворенные яйцеклетки отмывали фильтрованной морской водой от излишков спермы.

Спермиотоксичность определяли, добавляя к спермиям в морской воде (1 ОЕ при 260 нм) разные концентрации токсинов (от 0,05 до 8 мкг/мл) и выдерживая 20 мин при 20°C. Затем к 1 мл неоплодотворенных яйцеклеток добавляли спермии, подсчитывали % оплодотворения яйцеклеток и наблюдали за дальнейшим развитием эмбрионов. Определяли концентрацию токсинов, при которой обработанные сперматозоиды оплодотворяли 50% яйцеклеток.

Для определения эмбриотоксичности к оплодотворенным и отмывым от избытка спермы яйцеклеткам добавляли токсины в концентрациях от 0,05 до 2 мкг/мл. Эмбрионы инкубировали при 20 — 22°C и непрерывном перемешивании. За развитием эмбрионов морского ежа наблюдали под микроскопом при увеличении (окуляр х объектив) 10x40 в течение 72 часов.

Для исследования биосинтеза нуклеиновых кислот использовали [³H]-тимидин и [³H]-уридин, для изучения биосинтеза белка — [³H]-аланин или [³H]-лейцин [9]. Меченые нуклеозиды или аминокислоты добавляли к суспензии эмбрионов до концентрации 5 мКи/мл. Через 1, 2, 4, 6, 24 часа с момента оплодотворения отбирали аликвоты по 0,2 мл и определяли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе на жидкостном альфа-бета радиометре Tri-Carb (PerkinElmer).

Нуклеозидкиназы выделяли из яйцеклеток морского ежа, хранившихся при -40°C. Яйцеклетки размораживали, гомогенизировали в 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5 и центрифугировали при 6000 g в течение 20 мин. Экстракт наносили на колонку (2,6 x 35 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, предварительно уравновешенную тем же буфером, со скоростью 60 мл/ч. Колонку промывали 400 мл Трис-НСl буфера рН 7,5, и адсорбированный белок элюировали линейным градиентом концентрации NaCl 0,1 — 0,5 М (2x800 мл) в том же буфере (скорость элюции 60 мл/ч, объем фракций 15 мл). Во фракциях определяли концентрацию белка и активность нуклеозидкиназ.

Фракции, содержащие активность тимидинкиназы, объединяли и пропускали через колонку с голубой сефарозой (1,5x10 см), предварительно уравновешенную 20 мМ Трис-НСl буфером, рН 7,5 с 2 мМ ЭДТА, 1 мМ β-меркаптоэтанолом (буфер А). Адсорбированный белок промывали 40 мл буфера А, и фермент элюировали 10 мМ АТФ в буфере А со скоростью 5 мл/ч (объем фракции 1 мл). Во фракциях определяли активность тимидинкиназы. Фракции с активностью тимидинкиназы объединяли и концентрировали ультрафильтрацией при давлении 3,5 атм./см² до объема 2 мл [6].

Фракции после ионообменной хроматографии, содержащие активность уридинкиназы, объединяли и диализовали в течение ночи против 2 л буфера А. Отдиализованный белковый раствор наносили на колонку с DEAE-toyorearl (1,6x15 см), промывали двумя объемами этого же буфера и элюировали градиентом концентрации 0 — 0,5 М NaCl (2 x 150 мл) в буфере А со скоростью 22 мл/час. Во фракциях объемом 5,0 мл определяли концентрацию белка и активность уридинкиназы.

Активность тимидинкиназы определяли по количеству связавшихся с DEAE-бумагой нуклеотидов, образовавшихся в результате реакции фосфорилирования тимидина. Инкубационная смесь в объеме 50 мкл содержала: 50 мМ трис-НСl, рН 9,0; 1 мМ АТФ; 5 мМ MgCl₂; 1 мкМ NaF; 1 мКи [³H]-тимидина.

После добавления фермента смесь инкубировали 30 мин при 37°C и наносили на фильтры из DEAE-бумаги размером 1x1 см. Фильтры высушивали, промывали последовательно 1 мМ бикарбонатом аммония, водой и этанолом, снова высушивали и определяли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе.

Активность уридинкиназы определяли в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 8,0; 1 мМ АТФ; 5 мМ MgCl₂; 1 мкМ NaF; 1 мкКи [³H]-уридина. Далее процедуру определения активности фермента проводили аналогично описанной для тимидинкиназы.

Концентрацию белка определяли по оптическому поглощению при 280 нм и по методу Bradford M.M. [10].

Все эксперименты по исследованию действия биологически активных соединений проводили в 3 повторностях и определяли средние величины и стандартное отклонение. Статистическую обработку проводили с помощью программы MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе определения биологической активности токсинов *Y. pseudotuberculosis* было исследовано влияние этих белков на оплодотворение яйцеклеток морского ежа спермиями и дальнейшее развитие эмбрионов.

Эмбрионы морских ежей являются удобным объектом при биотестировании различных физиологически активных веществ, в том числе при изучении токсических эффектов различных химических соединений [1]. К достоинствам этой модели относится возможность получения больших партий гамет и синхронно развивающихся эмбрионов, относительная простота инкубации в контролируемых условиях, а также возможность визуального наблюдения эффекта изучаемых веществ в ходе эмбрионального развития. Яйцеклетки морского ежа давно используются для изучения кинетики действия лекарственных препаратов. Спермии иглокожих являются уникальным объектом для определения токсичности различных соединений по их действию на подвижность гамет и их оплодотворяющую способность.

Данные по действию токсических белков *Y. pseudotuberculosis* на спермии морского ежа показали, что в присутствии токсинов оплодотворяющая способность сперматозоидов морского ежа снижалась с увеличением концентрации токсинов от 0,05 до 8 мкг/мл. Для ТЛТ 50% ингибирование оплодотворения (ЛД₅₀) наблюдалось при дозе около 1 мкг/мл, а для ТСТ — при 2 мкг/мл.

Эмбрионы, полученные при оплодотворении яйцеклеток морского ежа спермиями, обработанными токсинами, развивались синхронно с контрольными до стадии 32-64 бластомера (при концентрациях токсинов, соответствующих ЛД₅₀). На дальнейших стадиях развития эмбрионов наблюдали появление уродливых форм эмбрионов. Неоплодотворенные яйцеклетки лизировались. Со временем все большее количество эмбрионов образовывало конгломераты, которые также подвергались лизису и распадались на отдельные клетки. До стадии вылупления (9,5 часов) дошла лишь часть эмбрионов. Более 90% в случае ТЛТ и около 80% для ТСТ составляли лизирующиеся агрегаты эмбрионов, а также отдельные клетки, вышедшие через разрушенную оболочку эмбрионов. В контроле с необработанными токсинами спермиями практически 100% эмбрионов достигли стадии вылупления.

Для проведения экспериментов по исследованию действия токсинов на процесс развития эмбрионов *S. intermedius* ТЛТ или ТСТ в диапазоне концентраций от 0,05 до 2 мкг/мл вносили в суспензию оплодотворенных и отмытых от избытка спермы яйцеклеток. Степень оплодотворения составляла 98 — 100%.

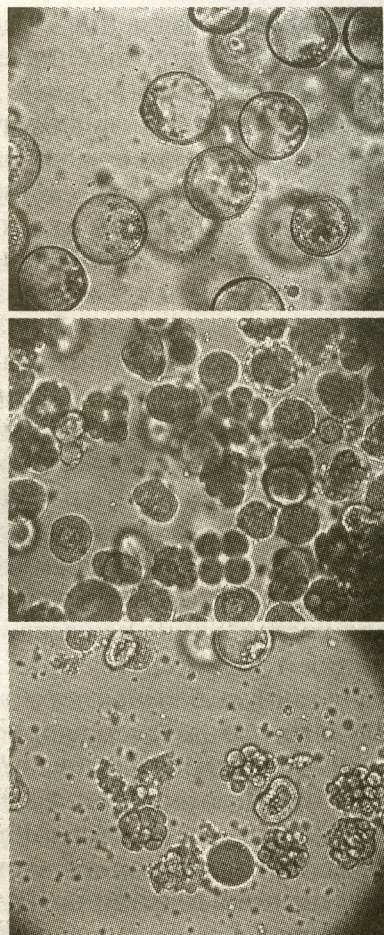
В процессе развития под влиянием токсинов происходило формирование ряда морфологических изменений эмбрионов *S. intermedius*. Их степень зависела как от исследуемого токсина, так и от его концентрации (рис.). Действие термолabileного летального токсина *Y. pseudotuberculosis* при концентрации 0,1 мкг/мл проявлялось только после 4 — 6 часов, до стадии ранней бластулы эмбрионы развивались без отклонений. На стадии средней бластулы 1 обнаруживалось около 10% поврежденных эмбрионов. Через 9,5 часов развития изменениям подверглось уже до 40% эмбрионов. Хотя эмбрионы морского ежа проходили через стадию выщипления, встречались и неподвижные эмбрионы.

Живые нормальные эмбрионы длительное время сохранялись при концентрациях токсина менее 0,2 мкг/мл. Через 2 суток при этих концентрациях выявлены отдельные эмбрионы, достигшие стадии плютеуса. Конгломераты эмбрионов лизировались. Через 72 часа нормальные эмбрионы не обнаруживались, были лишь уродливые формы, в том числе и эмбрионы, остановившиеся на предыдущих стадиях развития.

На стадии поздней гастролы при 1 мкг/мл токсина выявлены лишь единичные живые эмбрионы, около 90% составляли уродливые эмбрионы, распадающиеся агрегаты и отдельные рассыпавшиеся клетки.

В концентрации 1 — 2 мкг/мл ТЛТ (рис.) проявлял свое действие уже на стадии 2 — 4 бластомера. Появлялись единичные эмбрионы с клетками разного размера. На стадии 4 — 8 бластомеров наблюдались уродливые формы эмбрионов (до 15%), у которых клетки отделялись друг от друга, образуя «рыхлую» структуру. Происходила остановка развития некоторых эмбрионов на стадии 2 или 4 бластомеров, и далее они не делились. Останавливалось развитие эмбрионов и на последующих стадиях.

Термостабильный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* действовал на развитие эмбрионов морского ежа на ранних стадиях аналогично действию термолabileного летального токсина (рис.). Это выражалось в остановке развития, начиная со стадии 2 — 4 бластомера, появлении уродливых эмбрионов.



Действие токсинов *Y. pseudotuberculosis* на развитие эмбрионов морского ежа *S. intermedius*. Время инкубации — 16 часов, концентрация токсинов — 2 мкг/мл.

Сверху вниз: контроль без токсина; в присутствии 2 мкг/мл ТЛТ; в присутствии 2 мкг/мл ТСТ.

Однако эти изменения в развитии происходили при более высоких концентрациях ТСТ по сравнению с ТЛТ. При 0,05 мкг/мл ТСТ эмбрионы развивались так же, как и контрольные образцы до стадии вылупления (9,5 часов). Этот токсин не вызывал видимого воздействия на эмбрионы в концентрациях менее 0,5 мкг/мл до 6 часов развития. Образование конгломератов эмбрионов началось после стадии вылупления. На стадии средней гаструлы появились уродливые эмбрионы с кишкой, выпяченной наружу. Клетки сохранившихся эмбрионов продолжали делиться и проходили стадии развития, соответствующие контрольным эмбрионам без токсинов. Часть эмбрионов, развивающихся при концентрациях белка 0,2 мкг/мл и менее, достигали стадии плютеуса, и даже через 72 ч наблюдались живые эмбрионы. Уродливые эмбрионы и агрегаты подвергались полному лизису.

Для поиска мишени действия биологически активных соединений в первую очередь исследуют их влияние на скорость синтеза таких важнейших клеточных биополимеров, как ДНК, РНК и белок. На ранних этапах развития эмбрионов морского ежа в их клетках происходит интенсивный синтез нуклеиновых кислот. Биосинтез ДНК в эмбрионах является в основном, репликативным, что делает развивающиеся эмбрионы привлекательной моделью для исследования веществ, влияющих на этот процесс [11]. Специфическим индикатором синтеза ДНК, а также клеточного роста считается включение радиоактивно меченного тимидина. Включение меченого уридина может служить показателем скорости синтеза РНК.

Нами было исследовано влияние токсических белков *Y. pseudotuberculosis* ТЛТ и ТСТ на включение [³H]-тимидина и [³H]-уридина в состав нуклеиновых кислот развивающихся эмбрионов морского ежа, а также на биосинтез белка в эмбриональных клетках, определяемый по включению радиоактивно меченных аланина и лейцина.

Через 4 часа инкубации эмбрионов морского ежа с ТЛТ наблюдалось снижение уровня включения экзогенного тимидина в клетки эмбрионов на 35 — 45% по сравнению с контролем без токсина, начиная с дозы 1 мкг. Небольшое ингибирование синтеза ДНК токсином сохранялось и через сутки развития эмбрионов. Ингибирующий эффект ТЛТ наблюдался также при исследовании включения экзогенного уридина клетками эмбрионов *S. intermedius*, особенно через 24 часа инкубации, когда уровень включения меченого уридина многократно увеличился. Ингибирование при 1 мкг/мл составило 40%, а при 2 мкг/мл ТЛТ — около 70%.

ТСТ *Y. pseudotuberculosis* не влиял на включение радиоактивно меченных тимидина и уридина в нуклеиновые кислоты развивающихся эмбрионов морского ежа в интервале концентрации от 10 до 200 мкг/мл, но ингибировал биосинтез белка в эмбриональных клетках [9]. При концентрации токсина 10 мкг/мл ингибирование включения лейцина составило 20%, а при 50 мкг/мл ТСТ эффективность включения меченых аминокислот снижалась на ~70%. Высокие концентрации этого токсина, необходимые для ингибирования белкового синтеза, возможно, обусловлены скоростью проникновения его в клетки эмбрионов. На ранних стадиях развития эмбрионы морского ежа окружены оболочкой оплодотворения, и она может являться природным барьером для проникновения в клетку.

Термолабильный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* практически не затрагивал белковый синтез в клетках эмбрионов. В течение 5 часов инкубации

присутствие ТЛТ не снижало уровня включения меченых аланина и глицина [7].

Определение скорости включения экзогенных меченых предшественников — широко используемый метод для изучения синтеза биополимеров в клетках и влияния на эти процессы различных биологически активных соединений. На первых этапах эмбрионального развития у морского ежа происходит очень интенсивный синтез ДНК, необходимый для быстрого деления клеток. Клетки дробятся, не успевая увеличиваться в размерах. Увеличение уровня включения уридина через сутки свидетельствует о протекании интенсивных метаболических процессов, связанных с биосинтезом РНК. Ингибирование включения радиоактивно меченных тимидина и уридина может свидетельствовать о влиянии токсина на биосинтез ДНК и РНК. Однако меченые нуклеозиды претерпевают внутри клетки сложные метаболические превращения, и это не дает возможности конкретизировать мишень действия токсина. Ингибирующее действие может быть обусловлено, в частности, влиянием токсина на ферменты полимеризации ДНК или РНК, на биосинтез предшественников и т. д. Для выяснения механизма действия токсинов необходимы эксперименты с индивидуальными ферментами.

Для включения в состав нуклеиновых кислот экзогенные рибо- и дезоксирибонуклеозиды должны транспортироваться через клеточные мембраны и фосфорилироваться в клетке до нуклеозидтрифосфатов, являющихся непосредственными субстратами для РНК- или ДНК-полимеризующих ферментов. Ключевую роль в этом процессе играют нуклеозидкиназы, катализирующие первую ступень фосфорилирования нуклеозидов до их монофосфатов. Активность тимидинкиназы, отвечающей за фосфорилирование тимидина, обнаружена в подавляющем большинстве исследованных организмов, включая вирусы, бактерии, клетки растений и животных [15]. Активность этого фермента, как правило, коррелирует со скоростью синтеза ДНК и высока в быстро делящихся клетках. В то же время, данных о рибонуклеозидкиназах в настоящее время недостаточно.

Следующим этапом работы стало выяснение действия токсинов *Y. pseudotuberculosis* на активность нуклеозидкиназ морского ежа. Ранее из яйцеклеток морского ежа была очищена тимидинкиназа и исследованы ее свойства [6]. Для проведения экспериментов с токсинами *Y. pseudotuberculosis* нами была выделена уридинкиназа из яйцеклеток морского ежа.

Термолабильный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* оказывал некоторый ингибирующий эффект на активность нуклеозидкиназ морского ежа, катализирующих фосфорилирование тимидина и уридина. Однако даже при очень высоких концентрациях ТЛТ (20 — 50 мкг/мл) ингибирование не достигало 50%. Причем, степень ингибирования практически была одинаковой как для уридинкиназы, так и для тимидинкиназы. В то же время, ингибирование биосинтеза нуклеиновых кислот, определяемое по включению тимидина и уридина, наблюдалось уже при концентрациях токсина 1 — 2 мкг/мл. Биосинтез ДНК снижался на ~40%, а ингибирование биосинтеза РНК составило около 70%. Можно предположить, что наблюдаемое ингибирование ферментов биосинтеза предшественников ТЛТ *Y. pseudotuberculosis* носит неспецифический характер.

Термостабильный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* не влиял на активность тимидин- и уридинкиназ даже в концентрации 100 мкг/мл. Этот факт

согласуется с отсутствием влияния этого токсина на включение радиоактивно меченных тимидина и уридина в нуклеиновые кислоты развивающихся эмбрионов морского ежа, а также изолированных из клеток эмбрионов морского ежа ядер [9].

Представленная работа посвящена изучению биологической активности двух белковых токсинов — термолabileного и термостабильного летальных токсинов *Y. pseudotuberculosis*. В качестве модельной системы использованы гаметы и развивающиеся эмбрионы морского ежа *S. intermedius*. Преимуществом этого объекта является возможность изучения действия токсинов на уровне целых клеток, на процессы биосинтеза важнейших биополимеров клетки — белка и нуклеиновых кислот, а также на активность некоторых ферментов, вовлеченных в эти процессы.

Оба исследуемых токсина *Y. pseudotuberculosis* обладали спермиотоксичным действием, причем токсичность ТЛТ в отношении спермиев морского ежа в два раза превышала токсичность ТСТ, а ЛД₅₀ составила соответственно 1 и 2 мкг/мл. Действие токсинов *Y. pseudotuberculosis* на развивающиеся эмбрионы морского ежа проявлялось в изменениях их морфологии, остановке развития некоторых эмбрионов на ранних этапах эмбриогенеза, разрушении клеток и гибели эмбрионов. При этом повреждающее действие ТЛТ наблюдалось при более низких его концентрациях по сравнению с ТСТ.

Исследование влияния токсинов на включение предшественников биосинтеза белка, ДНК и РНК выявило различие механизмов их действия на эти процессы. Термолabileный летальный токсин практически не затрагивал белковый синтез в клетках эмбрионов. Синтез ДНК и РНК, определяемый по включению экзогенных [³H]тимидина и [³H]уридина клетками эмбрионов морского ежа, этот токсин ингибировал уже при концентрации 1 — 2 мкг/мл. Кроме того, ТЛТ оказывал ингибирующее действие и на активность выделенных из яйцеклеток морского ежа тимидинкиназы и уридинкиназы.

В противоположность этому, ТСТ ингибировал биосинтез белка в эмбрионах морского ежа, но не влиял на биосинтез нуклеиновых кислот даже в высоких концентрациях. Этот белок не оказывал действия на активность нуклеозидкиназ морского ежа.

Таким образом, оба белковых токсина *Y. pseudotuberculosis* влияют на развитие эмбрионов морского ежа *S. intermedius*, однако механизмы воздействия ТЛТ и ТСТ на эмбрионы морского ежа и протекающие в них процессы различаются. Очевидно, мишени действия токсинов в эукариотических клетках различны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бузников Г.А., Подмарев В.И. Морские ежи *Strongylocentrotus drobachiensis*, *S. nudus*, *S. intermedius*. Объекты биологии развития. М., Наука, 1975.
2. Кузнецов В.Г., Лаженцева Л.Ю., Елисейкина М.Г., Шульгина Л.В., Тимченко Н.Ф. Распространение бактерий рода *Yersinia* в морской воде и гидробионтах. Журн. микробиол. 2006, 3: 117-120.
3. Недашковская Е.П., Тимченко Н.Ф., Беседнов А.Л., Вертиев Ю.В. Термостабильный токсин *Yersinia pseudotuberculosis*. Журн. микробиол. 2006, 4: 5-9.
4. Персиянова Е.В., Адамов Р.Р., Сурин А.К., Псарева Е.К., Ермолаева С.А., Тимченко Н.Ф. Цитотоксический некротизирующий фактор *Yersinia pseudotuberculosis*, возбудителя Дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки. Бюлл. СО РАМН. 2013, 33 (2): 16-20.

5. Покровский В.К., Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Григорьева Г.А. Термолabileный летальный токсин *Yersinia pseudotuberculosis*. Журн. микробиол. 2008, 6: 63-66.
6. Терентьев Л.Л., Терентьева Н.А., Захарова Л.А., Рассказов В.А. Тимидинкиназа из яйцеклеток морского ежа. Биохимия. 1990, 55 (В. 12): 2293-2299.
7. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Персиянова Е.В., Рассказов В.А. Действие термолabileного летального токсина *Yersinia pseudotuberculosis* на эмбриогенез и биосинтез ДНК, РНК и белка в эмбрионах морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Тихоокеанский медицинский журнал. 2010, 3: 81-84.
8. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток, 2004.
9. Тимченко Н.Ф., Терентьев Л.Л., Недашковская Е.П., Разник Н.В., Рассказов В.А. Действие термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* на биосинтез ДНК, РНК и белка в эукариотических клетках. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2002, 1: 22-25.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 1976, 72: 248-254.
11. Kukhanova M., Kravetsky A., Terentyeva N. et al. Inhibition of replicative DNA synthesis in nuclei of *Strongylocentrotus intermedius* urchin embryos by 2',3'-dideoxy-3'-aminonucleoside-5'-triphosphates. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 783: 221-226.
12. Lockmann H.A., Gillespie R.A., Baker B.D. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* produces a cytotoxic necrotizing factor. Inf. Immun. 2002, 70 (5): 2708-2714.
13. Pha K., Navarro L. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. World J. Biol. Chem. 2016, 7 (1): 1-13.
14. Timchenko N.F., Adgamov R.R., Ermolaeva S.A. Variability in the functional domains of the Rho-modifying toxins of *Yersinia pseudotuberculosis*. Adv. Exp. Med. Biol. 2010, 954: 261-266.
15. Van Rompay A.R., Johansson M., Karlsson A. Substrate specificity and phosphorylation of antiviral and anticancer nucleoside analogues by human deoxyribonucleoside kinases and ribonucleoside kinases. Pharmacol. Ther. 2003, 100 (2): 119-139.

Поступила 01.06.16

Контактная информация: Терентьева Наталья Александровна, к.б.н.,
690022, Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159, р.т. 8(423)231-07-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Д.А.Левченко, В.Д.Кругликов, А.С.Водопьянов, С.В.Титова,
И.В.Архангельская, Н.Б.Непомнящая, М.И.Ежова*

ГИС: ВОЗМОЖНОСТИ АНАЛИЗА ДАННЫХ ФЕНО- И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ ЭЛЬ ТОР, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Ростовский-на-Дону противочумный институт

Цель. Применение авторской ГИС «Холера 1989-2014» для систематизации атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы (stxAB-tcpA-, stxAB-tcpA+), выделенных из водных объектов окружающей среды, по фено- и генотипу. *Материалы и методы.* Изучена выборка из 304 штаммов *Vibrio cholerae* O1. Проведено выявление 39 генов, связанных с патогенностью. Дискриминационную способность набора генов определяли по формуле Симпсона. Кластерный анализ проводили по методу UPGMA. *Результаты.* С помощью ГИС был проведен анализ многолетних данных о циркуляции водных штаммов *V. cholerae* O1 на территории субъектов страны. Показана возможность систематизации фенотипов изолированных штаммов по заданным параметрам. Разработана экспериментальная программа для выявления наличия/отсутствия различных генов и их комбинаций для генотипирования. *Заключение.* Установлено, что ГИС позволяет проводить анализ фенотипов по заданным параметрам, а также осуществлять ориентировочную

систематизацию генотипов атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 по оптимально достаточной детекции 14 генов.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 19—25

Ключевые слова: ГИС «Холера 1989-2014», холерные вибрионы O1 серогруппы, динамика выделения, фено- и генотипирование

D.A.Levchenko, V.D.Kruglikov, A.S.Vodopianov, S.V.Titova, I.V.Arkhangel'skaya, N.B.Nepomnyaschaya, M.I.Ezhova

GIS: CAPABILITIES OF DATA ANALYSIS OF PHENO- AND GENOTYPING OF EL TOR O1 SEROGROUP CHOLERA VIBRIOS ISOLATED FROM AQUATIC OBJECTS OF THE ENVIRONMENT IN RUSSIA FEDERATION

Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Russia

Aim. Application of the authors' GIS «Cholera 1989-2014» for systematization of atoxigenic strains of serogroup O1 cholera vibrios (ctxAB-tcpA-, ctxAB-tcpA+), isolated from aquatic objects of the environment by pheno- and genotype. **Materials and methods.** A sample of 304 *Vibrio cholerae* O1 strains was studied. Isolation of 39 genes related to pathogenicity was carried out. Discrimination ability of a set of genes was determined by Simpson formula. Cluster analysis was carried out by UPGMA method. **Results.** Analysis of multi-year data on aquatic *V. cholerae* O1 strains in country's subject was carried out using GIS. A possibility of systematization of phenotypes of the isolated strains by defined parameters was shown. An experimental program for detection of presence/lack of various genes and their combinations for genotyping was developed. **Conclusion.** GIS was established to allow to carry out analysis of phenotypes by defined parameters, as well as implement approximate systematization of genotypes of atoxigenic strains of cholera vibrios O1 by optimally sufficient detection of 14 genes.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 19—25

Key words: GIS «Cholera 1989-2014», cholera vibrios serogroup O1, isolation dynamics, pheno- and genotyping

ВВЕДЕНИЕ

Проведение мониторинговых исследований проб из объектов окружающей среды на холеру являются важнейшей составляющей эпидемиологического надзора, в том числе для предупреждения водного пути распространения инфекции [4].

Территория Российской Федерации не является эндемичной по холере, в то же время, ежегодное выделение атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы (ctxAB-) из водных объектов окружающей среды указывает на необходимость выявления потенциальных и реальных рисков контаминации *Vibrio cholerae* O1 и устранения указанного риска [6]. В отсутствии у штаммов холерного вибриона генов холерного токсина особое значение имеет наличие ряда генетических детерминант дополнительных токсинов, количество и уровень экспрессии которых могут различаться от штамма к штамму [3]. В то же время, обращает на себя внимание появление клонов, не имеющих полного кластера коровой области CTXф, но содержащих кластер VPI (tcpA и toxT), которые могут происходить из токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 в результате утраты CTXф. В то же время, за счет наличия гена tcpA и, вероятно, более высокой способности колонизировать кишечник штаммы (ctxAB-) могут вызывать спорадические случаи и вспышки диарейных заболеваний у людей (Каменск-Шахинский, Ростовская область 2005 г. и Республика Калмыкия, 2011 г.) [1, 4, 5].

Цель настоящего исследования заключалась в разработке подхода к систематизации фено- и генотипирования атоксигенных штаммов O1 серогруппы с использованием авторской геоинформационной системы (ГИС) «Холера 1989–2014» как инструмента для проведения информационно-аналитических исследований, связанных со штаммами *V. cholerae*, изолированными из водных объектов окружающей среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовано 304 атоксигенных штамма холерных вибрионов O1 серогруппы, в том числе с генетической характеристикой *ctxA-tcpA+*, выделенных с 1991 г. на разных территориях России и отобранных по введенным заданным параметрам для изучения их сходства и различия с помощью ГИС «Холера 1989–2014» [1, 2], интегрированной в ГЕО-информационный портал Ростовского-на-Дону противочумного института.

ПЦР-генотипирование исследуемых штаммов проводили по набору следующих генов: все гены коровой области профагов CTX, *pre-CTX* (*ser*, *orfU*, *ace*, *zot*, *ctxAB*) и RS-элементов (*rstR*, *rstA*, *rstB*, *rstC*); сайт интеграции CTXφ (*attRS*); гены острова патогенности VPI — структурной единицы токсинорегулируемых пилей *tcpA* и регулятора *toxT*; гены острова патогенности VPI-2 (*int* — «верхний краевой» фрагмент острова, ген нейраминидазы *panH* и «нижний краевой» фрагмент *use*); гены цитотоксического кластера RTX (*rtxA* — 5'-концевой участок гена высокомолекулярного цитотоксина; последовательность, кодирующая его ACD-домен, продукт которого вызывает деполимеризацию и ковалентное связывание актина в клетках кишечника; *rtxC* — ген предполагаемого активатора токсина *RtxA*); ген *cef* (*CHO cell elongating factor*) — цитотонического фактора, вызывающего удлинение клеток CHO аналогично холерному токсину; ген гемагглютинин/протеазы *hapA* — ключевой протеазы холерных вибрионов, способной в высоких дозах вызывать увеличение проницаемости кишечной ткани; ген глобального регулятора *toxR*; ген структурной единицы маннозочувствительных пилей адгезии *mshA*; кластеры генов контактзависимых систем секреции третьего типа — T3SS (*vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*), шестого типа — T6SS (*vasA*, *vasF*, *vasK*, *vgrG3*), а также ее транслокона *hcr* и ключевого эффектора ACD-*VgrG1*, который является «двойником» и возможным предшественником ACD-*RtxA* и обладает такой же активизирующей активностью; *tolQRA* — кластер генов, необходимый для проникновения фага CTXφ в бактериальную клетку и поддержания целостности клеточной стенки; гены шигаподобного (*slt1*) и термостабильного (*stn/sto*) токсинов; гены термостабильного прямого гемолизина (*tdh*) и родственного ему гемолизина (*trh*) *V. parahaemolyticus*; гены *wbe* и *wbf*, определяющие принадлежность к O1 и O139 серогруппам соответственно.

Дискриминационную (разделение по признаку) способность исследуемого набора генов определяли по формуле Симпсона (Struelens M.J. et al., 1996): $D=1-[1:N(N-1)]\sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$, где *D* — индекс дискриминирующей силы, *N* — число штаммов, *S* — число типов и *n_j* — количество штаммов *j* типа.

Дендрограмма была построена при помощи кластерного анализа по методу UPGMA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В период с 1989 по 2015 гг., включая работу в рамках Референс-центра по мониторингу холеры (с 2008 г.), в лаборатории микробиологии холеры были идентифицированы 1080 штаммов холерных вибрионов. Из них подавляющее большинство (938) штаммов относились к O1 серогруппе, поэтому в данной

работе именно на представителях данной группы штаммов было сконцентрировано наше внимание. Кроме того, было выделено и идентифицировано 133 штамма *V. cholerae* PO-вариант, 9 штаммов *V. cholerae* O139.

С помощью ГИС была проведена информационно-аналитическая разработка в аспекте анализа многолетних данных о циркуляции в водных объектах окружающей среды штаммов *V. cholerae* O1. Так, в 2015 г. нами было изучено 118 штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор, которые были выделены из объектов окружающей среды на 6 административных территориях (Ростовская, Иркутская, Челябинская области, Забайкальский, Краснодарский край, Республика Калмыкия). Наибольшее количество культур, поступивших в референс-центр, было изолировано на территории Краснодарского края из реки Агура — 98 штаммов (83%). В 1990 г. в воде открытых водоемов было обнаружено 32 штамма холерных вибрионов O1 на 6 административных территориях. В 1998 г. было выделено 44 штамма на 18 территориях, в 2002 г. — 44 штамма в 17 субъектах, в 2003 г. — 49 штаммов на 11 административных территориях. Следует отметить, что за исследуемый период пики наибольшего выделения штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы приходились на 2011 г. — 96 штаммов (10 территорий) и на 2015 г. — 118 штаммов.

При анализе распределения выделенных штаммов по субъектам Российской Федерации за последние 25 лет было установлено, что наибольшее количество штаммов *V. cholerae* O1 было изолировано на территории Республики Калмыкия — 314 штаммов (33,5%), Ростовской области — 140 штаммов (14,9%) и Краснодарского края — 113 штаммов (12%). На территориях остальных субъектов — от нескольких десятков до единичных штаммов (Республика Бурятия, Астраханская, Курганская, Нижегородская, Пензенская, Псковская, Тульская, Челябинская, Ярославская области).

Все изолированные штаммы *V. cholerae* O1 были типичны по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам. Как уже упоминалось, подавляющее большинство выделенных культур (938) относились к биовару Эль Тор. Из них к серовару Огава принадлежали 566 штаммов (60,4% от общего количества), к серовару Инаба — 364 (38,8%), к серовару Гикошима — 8 (0,8%).

Штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы с генетической характеристикой *ctxA-tcrA+* выделяли на территориях Ростовской области (с 2002 по 2015 гг. — 18 штаммов), Республики Калмыкия (с 2003 по 2015 гг. — 38 штаммов) и Хабаровского края (в 2013 г. — 2 штамма).

При проведении ПЦР-генотипирования штаммов холерных вибрионов по 39 нуклеотидным последовательностям, связанным с факторами патогенности, установлено, что гены *attRS*, *cef*, *hapA*, *tolQRA*, *wbe*, *toxR*, *hcr* присутствовали у всех штаммов и характерны для всех холерных вибрионов O1 серогруппы. В то же время, установлено отсутствие генов *wbf*, *rstR*, *slt1*, *tdh*, *trh*, *cep*, *orfU*, *ace*, *zot*, *ctxAB*. Гены *rstA*, *rstB*, *rstC*, *tcpA*, *toxT*, *int*, *nanH*, *vce*, *rtxA*, *rtxC*, *mshA*, T3SS (*vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*), T6SS (*vasA*, *vasF*, *vasK*, *vgrG3*), ACD-VgrG1, ACD-RtxA, *stn/sto* были выявлены в различных сочетаниях.

Нами была разработана экспериментальная программа с использованием формулы Симпсона, определяющая целесообразность определения наличия/отсутствия различных генов и их комбинаций для генотипирования, что позволило выделить штаммы с разными генотипами среди одинаковых по фенотипическому признаку.

В результате установлено, что при исследовании 304 штаммов по 39 генам

было выявлено 66 генотипов с дискриминационной силой (D)=0,965, а по 14 генам — 64 генотипа с D =0,964.

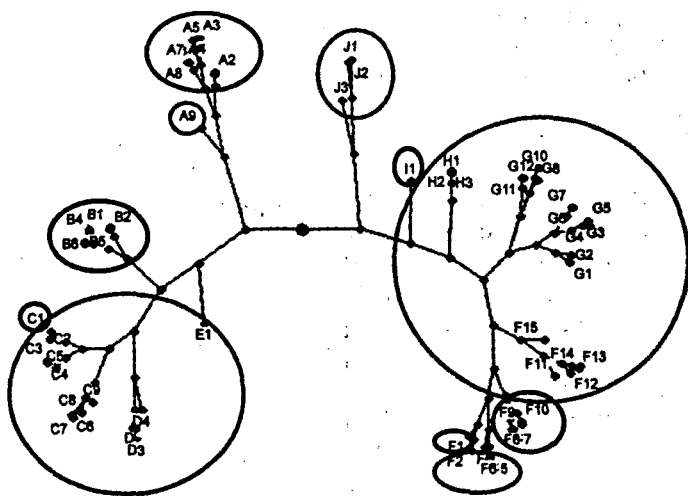
Таким образом, при проведении сравнительного анализа свойств штаммов *V. cholerae* O1 El Tor с разным набором генетических детерминант дополнительных факторов патогенности по 14 генам (*rstA*, *rtxC*, *ACD-rtxA*, *VPI (tcpA)*, *VPI-2 (int, nanH, vce)*, *mshA*, *stn|sto*, *T3SS (vcsN2, vspD)*, *T6SS (vasK, vgrG1, vgrG3)*) позволило разделить 304 штамма на 64 генотипа, объединенные в 10 кластеров (A — J): *V. cholerae* O1 *ctxA-tcpA+* (58 штаммов) — генотипы A1-A8, B1-B6, C1, I1, F1, F7-F10; *V. cholerae* O1 *ctxA-tcpA-* (246 штаммов) — генотипы A9, C2-C9, D1-D4, E1, J1-J3, H1-H3, G1-G12, F2-F6, F11-F15.

Дендрограмма по результатам кластерного анализа, отражающая генетическую близость штаммов, представлена на рис., на котором штаммы с генетической характеристикой *ctxA-tcpA+* выделены черным цветом, а наибольшая часть атоксигенных штаммов (*ctxA-tcpA-*) вошла в кластер, обозначенный темно-серым цветом.

При анализе распределения ПЦР-генотипов холерных вибрионов O1 по административным территориям Российской Федерации установлено, что наиболее часто встречались представители кластера D (31 штамм на 23 административных территориях). В кластер F вошел 161 штамм с 13 территорий России. Холерные вибрионы кластеров I и E обнаруживались только на территории Республики Калмыкия и Ростовской области (по одному штамму соответственно). Кластер J, состоящий из 15 штаммов, выявлен на территориях Республики Калмыкия и Тюменской области, кластер H (3 штамма) — на территориях Амурской, Ленинградской и Ростовской областей. Кластер A включал в себя наибольшую часть штаммов с генетической характеристикой *ctxA-tcpA+* и был выявлен на территориях Республики Калмыкия, Ростовской области и Хабаровского края. На территориях Ростовской области и Республики Калмыкия выделялись штаммы со схожими генотипами A5 и A6.

На территории Республики Калмыкия было выделено 56 атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1, которые были отнесены к 36 генотипам.

Стоит отметить, что штаммы, входящие в генотип G9, были выделены в 2012 г. — 2 штамма из водоемов: р. Элистинка и пруд Колонский; в 2014 г. — 1 штамм из пруда Заячий и в 2015 г. — 3 штамма в этом же водоеме. С генотипом F14 всего на данной территории изолировано 12 штаммов: в 2012 г. из пруда Колонский — 4, из р. Элистинка — 7 штаммов и в 2013 г. — 1 штамм из пруда Колонский. На территории Ростовской области выделе-



Дендрограмма ПЦР-генотипов штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы, выделенных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации с 1991 по 2015 гг.

но 34 атоксигенных штамма, которые были отнесены к 19 генотипам, однако представители одного генотипа встречались на данной территории не более одного года.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование ГИС в качестве информационно-аналитического инструмента позволило наглядно проследить пространственную и временную динамику выделения изучаемых штаммов холерных вибрионов на всех административных территориях страны. Вместе с тем, мы полагаем, что необходимо наличие географических координат стационарных точек отбора проб в паспортах на изолированные штаммы (для большей точности полученных данных).

Полученные данные дали нам возможность ориентировочно предполагать, что атоксигенные штаммы холерных вибрионов *ctxA-tcrA*- могут переживать в пресноводных водоемах на определенных территориях в течение определенного времени (от одного года до двух лет). Генетическую неоднородность популяции *V. cholerae* O1 Эль Тор можно объяснить необходимостью приспособления к условиям окружающей среды, в процессе которой не исключается смена генотипа (утрата/приобретение генов патогенности, персистенции и др.).

Для отработки подходов к систематизации генотипов атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 возможно использовать ориентировочное генотипирование по 14 генам, оптимально достаточным для выявления различий между штаммами, с последующим сравнением со штаммами, ранее выделенными в данном регионе, а также в целом по стране.

Исходя из данных, представленных на дендрограмме ПЦР-генотипов штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы, выделенных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации с 1991 по 2015 гг., можно предположить общность происхождения штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с генетической характеристикой *ctxA-tcrA*+ и *ctxA-tcrA*-, входящих в кластеры А и С. В то же время, в кластеры В и I вошли только культуры *ctxA-tcrA*+, которые, скорее всего, имеют завозное происхождение.

Таким образом, в системе эпидемиологического надзора за холерой важное значение имеет использование ГИС как инструмента информационного анализа (по различным задачам), возможности которой продемонстрированы на примерах анализа данных количественной и временной динамики обнаружения, а также фено- и генотипирования холерных вибрионов O1 серогруппы Эль Тор, изолированных из водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации, что способствует своевременному определению направленности и объема профилактических мероприятий на каждой конкретной административной территории страны. Одним из перспективных направлений совершенствования ГИС является внесение в паспорта выделенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor географических координат стационарных точек отбора проб из водных объектов для исследования на холеру, что позволит расширить рамки аналитической работы с помощью геоинформационной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Водопьянов С.О. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxA-tcrA*+, выделенных из водных объектов Российской Федерации,

охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы. Здоровье населения и среда обитания. 2014, 9: 32 —34.

2. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С., Архангельская И.В., Ежова М.И., Ускова Н.Н. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014621055. Геоинформационная система. Холера 1989-2014, 2014.
3. Монахова Е.В. Факторы патогенности нехолерогенных штаммов холерных вибрионов. Автореф. дис. д-ра биол. наук. Ростов-на-Дону, 2012.
4. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербакова С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. Журн. микробиол. 2016, 1: 89-101.
5. Осина Н.А., Каляева Т.Б., Бугоркова Т.В., Касьян И.А., Оброткина Н.Ф. Результаты мониторинга холерных вибрионов в водных экосистемах на территории Республики Калмыкия. Здоровье населения и среда обитания. 2013, 2 (239): 28-30.
6. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Водопьянов С.О. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006-2015 гг. Прогноз на 2016 г. Пробл. особо опасных инф. 2016, 1: 20-27.

Поступила 10.05.16

Контактная информация: Левченко Дарья Александровна,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863)240-91-33

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*И.И.Корсакова, В.А.Антонов, Н.П.Храпова,
Т.В.Замарина, Е.В.Пименова, Е.Э.Ким, Л.К.Меринова,
Т.В.Сенина, Г.А.Ткаченко, С.С.Савченко, Н.П.Агеева,
Е.В.Молчанова, Я.А.Лопастейская, Е.В.Прохватилова*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА НА ОСНОВЕ ПРИНЦИПОВ ПОЛИФАЗНОГО ТАКСОНОМИЧЕСКОГО ПОДХОДА

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Определить оптимальный набор наиболее эффективных методов идентификации и внутривидового типирования возбудителей сапа и мелиоидоза. *Материалы и методы.* Использованы бактериологические, иммунохимические, молекулярно-генетические методы. *Результаты.* Изучена возможность идентификации коллекционных штаммов патогенных и близкородственных буркхольдерий в полуавтоматических системах. Разработаны способы выявления информативных переменных участков геномов указанных микроорганизмов, выбраны методы их генетического типирования. Установлена эффективность применения преципитирующих МКА для дифференциации буркхольдерий. Обобщены данные о диагностических возможностях иммуноглобулинов, флуоресцирующих на основе моноклональных антител различной эпитопной направленности, для обнаружения и идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Созданы экспериментальные серии амплификационных тест-систем для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза в формате ПЦР в режиме реального времени. *Заключение.* Предложен ряд методов идентификации и типирования возбудителей сапа и мелиоидоза.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 25—34

Ключевые слова: возбудители сапа и мелиоидоза, геномы патогенных буркхольдерий, моноклональные антитела, внутривидовое типирование

I.I.Korsakova, V.A.Antonov, N.P.Khrapova,
T.V.Zamarina, E.V.Pimenova, E.E.Kim, L.K.Merinova,
T.V.Senina, G.A.Tkachenko, S.S.Savchenko, N.P.Ageeva,
E.V.Molchanova, Ya.A.Lopasteiskaya, E.V.Prokhvatilova

IDENTIFICATION OF CAUSATIVE AGENTS OF GLANDERS AND MELIOIDOSIS BASED ON PRINCIPLES OF POLYPHASE TAXONOMIC APPROACH

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Determine an optimal set of the most effective methods of identification and intra-species typing of causative agents of glanders and melioidosis. **Materials and methods.** Bacteriologic, immunochemical, molecular-genetic methods were used. **Results.** A possibility to identify collection strains of pathogenic and closely related *Burkholderia* in semiautomatic systems is studied. Means of detection of informative variable genome segments of the specified microorganisms were developed, methods of their genetic typing were selected. Effectiveness of application of precipitating mAbs for differentiation of *Burkholderia* was established. Data on diagnostic possibilities of immunoglobulins fluorescing based on monoclonal antibodies of various etiotropic directionality for detection and identification of *B. mallei* and *B. pseudomallei* are generalized. Experimental series of amplification test-systems for identification of glanders and melioidosis causative agents in real-time PCR format are created. **Conclusion.** A number of methods for identification and typing of glanders and melioidosis causative agents is proposed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 25–34

Key words: glanders and melioidosis causative agents, pathogenic *Burkholderia* genomes, monoclonal antibodies, intra-species typing

ВВЕДЕНИЕ

Полифазная таксономия объединяет и использует всю имеющуюся многоуровневую информацию (от молекулярной до экологической) для выделения консенсусных таксономических групп. На сегодняшний день такой подход широко применяется при идентификации бактерий рода *Burkholderia* [15]. Для установления видовой принадлежности культур *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*, а также их дифференциации от других близкородственных буркхольдерий, имеющих с ними высокий уровень гомологии, используют изучение культурально-морфологических и биохимических свойств микроорганизмов [5], постановку иммунодиагностических [7] и молекулярно-генетических тестов [13]. Особенности клинического течения мелиоидоза, в том числе и развитие у пациентов септицемии в первые двое суток от начала заболевания, принадлежность *B. pseudomallei* и *B. mallei* к микроорганизмам I — II группы патогенности требуют наиболее раннего определения вида возбудителя.

Цель работы — определить оптимальный набор наиболее эффективных методов идентификации и внутривидового типирования возбудителей сапа и мелиоидоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификационные коды и переменные фенотипические признаки коллекционных штаммов патогенных и близкородственных буркхольдерий определяли в полуавтоматических системах идентификации NEFERMtest 24 и API 20NE. Для опытов по генетической трансформации использовали ауксотрофные мутанты, индуцированные методом химического НГ-мутационеза

[6]. Методики тиражирования антителопродуцирующих гибридом *in vitro* и *in vivo*, накопления, очистки и контроля моноклональных антител (МКА) представлены ранее [10]. Температуры плавления и отжига олигонуклеотидных праймеров для ПЦР рассчитывались по [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Коллекционные штаммы патогенных и близкородственных буркхольдерий были исследованы в полуавтоматических системах идентификации.

Результаты идентификации по системе Nefermtest 24 оказались вариабельными. Четыре из пяти исследованных штаммов возбудителя мелиоидоза определялись как *B. pseudomallei* с вероятностью 77,3%, а один — 99,9%. Уровень определения *B. mallei* оказался выше (вероятность 94,89 — 100% для двух третей штаммов), однако штаммы Олоф и Конный были отнесены к другим видам. Отмечен высокий процент ошибок при установлении видовой принадлежности *Burkholderia thailandensis*: три из пяти исследованных штаммов определены как *B. pseudomallei* (вероятность 98,99 — 99,9%), а два не были идентифицированы. Точность определения *Burkholderia ceracia* варьировала в пределах от 16,14 до 99,69%.

Использование системы API 20NE оказалось более информативным: 12 из 15 исследованных штаммов *B. ceracia* с вероятностью от 95,2 до 99,9% по определителю были отнесены к виду *B. ceracia*, три штамма (320, 5809 и 5812) как представители этого вида не определены. Для штаммов *B. pseudomallei* точность определения составила 99,9%, *B. thailandensis* ошибочно идентифицированы как *B. pseudomallei* с вероятностью 82,6%.

Проведена сравнительная оценка эффективности селективных сред для различных видов буркхольдерий. Основой для всех сред служил триптиказосоевый агар (ТСА, «Difco», США), а селективными факторами выступали кристалл виолетт и антибиотики.

Для выделения *B. ceracia* применялась селективная среда ВСМ следующего состава: ТСА («Difco», США) с добавлением 600 000 ЕД/л полимиксина, 10 мг/л гентамицина, 2,5 мг/л ванкомицина. Рост культур других видов микроорганизмов, часто встречающихся в медицинской практике, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, на этой среде практически полностью подавлялся.

B. pseudomallei выделяли на среде L. Ashdown с добавлением 5 мг/л кристалл виолетта, 50 мг/л нейтрального красного, 4 мг/л гентамицина, при росте на которой мелиоидозные колонии приобретали темно-красный цвет за счет сорбции из среды нейтрального красного, вокруг них наблюдалось просветление среды. При культивировании *B. thailandensis* на селективной среде L. Ashdown наблюдали колонии розового цвета без выраженного просветления среды вокруг них, что позволяло отличать эти виды буркхольдерий.

B. ceracia, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* устойчивы к гентамицину, на отобранных нами селективных средах (ВСМ и среде L. Ashdown) проявляли способность к росту, практически не отличающуюся от стандартной питательной среды (ТСА). Штаммы *B. mallei* к гентамицину чувствительны, характеризовались отсутствием роста на вышеуказанных селективных средах.

Для выделения *B. mallei* была взята транспортная среда для патогенных буркхольдерий [1], состоящая из ТСА («Difco», США) с добавлением 10 мг/л ампициллина, 2,5 мг/л полимиксина, 2,5 мг/л генцианового фиолетового.

Возможность применения генетической трансформации для идентификации культур *B. pseudomallei* основывается на естественной способности

этого микроорганизма воспринимать с определенной частотой гомологичную хромосомную ДНК и ДНК близкородственного вида *V. mallei*. В качестве реципиента был отобран двумаркерный мутант *V. pseudomallei* C-141 pur90his107, который по обоим селективируемым признакам трансформировался с частотой $n \cdot 10^{-6}$, а также 60806pur90met48 с более низкой трансформационной активностью.

В процессе работы исследована и трансформирующая активность *V. thailandensis*. С этой целью были получены индуцированные нитрозогуанидином мутанты *V. thailandensis* 264 с различными маркерами ауксотрофности, использованные далее как реципиенты.

Установлено, что в качестве доноров дикие штаммы *V. thailandensis* могут трансформировать ауксотрофные реципиенты *V. pseudomallei* с частотой, не превышающей $1,3-2,8 \cdot 10^{-8}$. При этом собственная реципиентная активность мутантов *V. thailandensis* в гомологичных скрещиваниях находилась в пределах $4,2 \cdot 10^{-7}-2,6 \cdot 10^{-6}$.

В общей идентификационной схеме в скрещиваниях между *V. pseudomallei*, *V. mallei*, *V. thailandensis* и филогенетически более отдаленным видом *V. ceracia* возбудитель мелиоидоза выявлялся с наибольшей частотой при передаче хромосомного материала от гомологичного донора ($n \cdot 10^{-7}-n \cdot 10^{-6}$) и далее от доноров *V. mallei* ($n \cdot 10^{-7}$) и *V. thailandensis* ($n \cdot 10^{-8}$ и менее). Донорная активность *V. ceracia* по отношению к *V. pseudomallei* не обнаружена.

В свою очередь, штаммы *V. pseudomallei* участвовали в трансформации реципиентов *V. thailandensis*, но не трансформировали штаммы *V. mallei*. В пределах использованного набора штаммов не наблюдалось трансформационной передачи от *V. mallei* к *V. thailandensis*, тогда как *V. pseudomallei* эффективно трансформировался ДНК возбудителя сапа.

Одним из направлений совершенствования методов идентификации возбудителя мелиоидоза признано получение МКА к гликопротеину капсулы 200 kDa *V. pseudomallei* [8], наличие которого на поверхности микробной клетки является характерным фенотипическим признаком вирулентных, не способных ассимилировать арабинозу Aga^- клинических изолятов и Aga^- изолятов из внешней среды. Данный антиген отсутствует у ассимилирующих арабинозу Aga^+ авирулентных изолятов из внешней среды [8], поэтому диагностические препараты, разработанные на его основе, лишены перекрестной активности в отношении *V. thailandensis*, близкородственной буркхольдериям III группы патогенности.

В работе использованы экспериментальные образцы препаратов для метода флуоресцирующих антител на основе семи вариантов МКА различной эпиптопной направленности к антигену 200 kDa *V. pseudomallei*. Значения аффинности различных вариантов МКА колебались в диапазоне от $9 \cdot 10^5$ до $8 \cdot 10^7 M^{-1}$. Рабочие разведения экспериментальных препаратов были равны 1:8 — 1:16.

Иммунофлуоресцентный анализ изучаемых культур буркхольдерий показал, что экспериментальный препарат на основе МКА 6A₁₁ в рабочем разведении специфически взаимодействовал с микробными клетками 100% музейных штаммов *V. mallei* и 70% *V. pseudomallei*, но не окрашивал клетки близкородственных буркхольдерий и других видов бактерий. Экспериментальные иммуноглобулины на основе МКА 5H₁₁ в рабочем разведении специфически окрашивали микробные клетки 80% музейных штаммов *V. pseudomallei* и одного из 13 музейных штаммов *V. mallei*. При этом данный препарат не взаимодействовал с клетками *V. thailandensis*, *V. ceracia*, *Burkholderia gladioli* и гетерологичных микроорганизмов.

Реакция иммунодиффузии (РИД) с применением преципитирующих МКА, узнающих гликопротеин капсулы возбудителя мелиоидоза 200 kDa, направлена на идентификацию чистых культур микроорганизмов, предположительно относящихся к группе патогенных буркхольдерий. Она позволяет получить информацию как о наличии, так и об относительном количестве этого маркера вирулентности возбудителя мелиоидоза в образце испытуемого материала. При постановке РИД с водно-солевыми экстрактами (ВСЭ) возбудителей мелиоидоза, сапа, близкородственных буркхольдерий и ряда гетерологичных микроорганизмов установлено, что все 10 типов испытанных МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* обладали преципитирующей активностью, но в разной степени: они позволяли выявлять от 9 до 81% типичных штаммов возбудителя мелиоидоза. Наилучшими в этом отношении были МКА 3С₆, 6А₁₁ (81%) и 4А₁₀, 6Е₇ (72%), 7 вариантов моноклональных антител образовывали преципитаты только с ВСЭ *B. pseudomallei* и не обнаруживали антиген 200 kDa в ВСЭ возбудителей сапа и гетерологичных микроорганизмов.

Олигонуклеотидные ДНК-зонды для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза выбраны в результате анализа секвенированных нуклеотидных последовательностей геномов *B. mallei* ATCC 23344 (<http://www.tigr.org>) и *B. pseudomallei* K96243 (<http://www.sanger.ac.uk>), а также различных нуклеотидных последовательностей буркхольдерий, представленных в GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Так, на основе консервативных последовательностей участка гена 23S рибосомальной РНК, фрагмента гена *orf13* из кластера генов III типа секреции и флагеллярного гена *fliC* были выбраны олигонуклеотидные последовательности праймеров и гибридизационных зондов, которые по результатам компьютерного анализа специфически детектировали фрагменты указанных генов возбудителей сапа и мелиоидоза.

Определена оптимальная концентрация флуоресцентных зондов, составившая 6 пМ на одну реакцию, а также температура отжига в зависимости от ДНК-мишени. Опытным путем установлено время каждого этапа реакции, которое варьировало в зависимости от технической характеристики амплификатора. Условия полимеразной цепной реакции адаптированы для проведения амплификации ДНК на термоциклере «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Москва) с последующей детекцией по конечной точке на детекторе флуоресценции «Gene» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Москва) и для амплификации в режиме реального времени на приборах «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Австралия) и «SmartCycler» («Cepheid», США). При детекции в режиме реального времени наблюдали повышение чувствительности ПЦР на один — два порядка в сравнении с детекцией по конечной точке.

ПЦР с олигонуклеотидными праймерами и зондами, направленными на обнаружение генов 23S рРНК, *orf13* и флагеллярного гена *B. mallei* и *B. pseudomallei*, позволила выявить $1 \cdot 10^3$ — $1 \cdot 10^4$ м.к./мл возбудителей сапа и мелиоидоза в 100% проб чистых культур, а $1 \cdot 10^2$ м.к./мл — в 60–66,6% случаев. В контрольных пробах, содержащих лишь ДНК гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1 \cdot 10^7$ м.к./мл, получены отрицательные результаты. ДНК возбудителя мелиоидоза удалось обнаружить и в составе смеси с ДНК микробов-контаминантов с помощью реакции амплификации с указанными праймерами и зондами. Следовательно, избыток гетерологичной ДНК в пробе, содержащей ДНК возбудителя мелиоидоза, не оказывал ингибирующего влияния на ПЦР и не вызывал появления ложноположительных фрагментов амплификации.

Кроме того, изучена возможность использования нескольких генетических методов (мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов — MLVA, DFR-анализ) для проведения внутривидовой дифференциации патогенных буркхольдерий.

Поиск простых повторяющихся последовательностей аннотированных геномов возбудителя сапа на уже известных локусах в составе генома *B. pseudomallei* позволил сконструировать тест-систему для генотипирования *B. mallei* методом VNTR, которая была апробирована на 14 штаммах возбудителя сапа из лаборатории коллекционных штаммов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Наиболее эффективными для проведения внутривидового типирования штаммов возбудителя сапа оказались локусы VNTR 5 и VNTR 9: с их помощью выявлено 13 генотипов в коллекции музейных штаммов *B. mallei*, 12 из которых являлись уникальными, т. е. обнаружены только у одного штамма. Сопоставление MLVA-профилей 14 коллекционных штаммов *B. mallei* с профилями 4 полученных из GenBank штаммов показало, что разработанная схема генотипирования на основе анализа числа тандемных повторов пяти локусов позволяет разделить указанные 18 штаммов на 17 типов.

На наборе коллекционных штаммов *B. pseudomallei* была апробирована предложенная K. Duangsonk et al. [9] схема внутривидового DFR-типирования, в результате чего 18 исследованных штаммов возбудителя мелиоидоза удалось разделить на 13 VAT-типов.

В процессе разработки схемы VAT-анализа возбудителя сапа и поиска ДНК-мишеней проведен сравнительный анализ 4 аннотированных геномов штаммов *B. mallei* ATCC 23344, *B. mallei* NCTC 10247, *B. mallei* NCTC 10229 и *B. mallei* SAVP1, доступных в генетических базах данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.insdc.org/>, www.ebi.ac.uk/), и составлена полная библиотека вариабельных фрагментов генома возбудителя сапа. В итоге определено 9 пар олигонуклеотидных затравок, способных обеспечить дифференциацию аннотированных геномов возбудителя сапа *in silico*, из которых 4 пары фланкировали различающиеся последовательности на I хромосоме и 5 пар на II хромосоме.

Разработанная нами схема генотипирования возбудителя сапа состоит из 9 реакций амплификации. При исследовании данным методом 18 штаммов *B. mallei* (4 из которых — геномы штаммов из GenBank, анализированные *in silico*) по предложенной схеме внутривидовой дифференциации было выделено 15 типов. Из 9 сконструированных праймеров только праймеры VAT2-Ch1 и VAT6-Ch2 не позволяли различать исследуемые музейные штаммы *B. mallei*, но дифференцировали штаммы возбудителя сапа, представленные в генетических базах данных, что свидетельствовало о возможности их использования для генотипирования *B. mallei*.

В целом, для внутривидовой дифференциации возбудителя сапа на основе дифференцирующих регионов генома (DFR) разработано 9 олигонуклеотидных флуоресцентно-меченных зондов, позволяющих проводить детекцию наличия дифференцирующих последовательностей ДНК по конечной точке и в режиме реального времени. Апробация схемы DFR-типирования на наборе коллекционных штаммов возбудителя сапа показала ее высокую информативность и дискриминирующую силу.

С целью оценки диагностических возможностей экспериментальных наборов реагентов по выявлению и идентификации близкородственных видов буркхольдерий проведена апробация многоуровневой системы идентифика-

ции и типирования возбудителей сапа и мелиоидоза в контаминированных (зашифрованных) пробах [4]. Для проведения исследований с помощью ПЦР использовали 1 коммерческий набор реагентов «Burk23S — Epr» и 5 экспериментальных генодиагностических средств. По результатам испытаний методом ПЦР в короткие сроки были правильно идентифицированы все возбудители в зашифрованных пробах (обнаружена ДНК *B. pseudomallei*, *B. ceracia*, *B. thailandensis*).

В рамках указанного комплексного исследования [4] апробированы 7 типов экспериментальных моноклональных флуоресцирующих мелиоидозных иммуноглобулинов, приготовленных на основе моноклональных антител из панели, полученной к различным эпитомам антигена 200 kDa *B. pseudomallei*. Для постановки ТИФМ использовали 2 варианта экспериментального набора реагентов «Тест-система иммуноферментная моноклональная для выявления водорастворимых антигенов возбудителя мелиоидоза», показавших недостаточную чувствительность. На сегодняшний день эти тест-системы могут быть рекомендованы в качестве средства обнаружения растворимых антигенов возбудителя мелиоидоза на этапе идентификации и дифференциации буркхольдерий II и III-IV групп патогенности. Традиционное бактериологическое исследование позволило идентифицировать *B. ceracia*, *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* в пробах через 72 ч. После идентификации выделенных культур и повторного исследования проб с помощью перечисленных выше методов был выдан окончательный ответ с указанием вида буркхольдерий [4].

ОБСУЖДЕНИЕ

Последовательное комплексное применение методов и средств диагностики, позволяющих проводить специфическую индикацию, идентификацию патогена и типирование выявленного микроорганизма, является основой для детекции и анализа возбудителей инфекционных заболеваний. Полифазный таксономический подход сочетает в себе методы определения фенотипических и генотипических признаков бактерий. В последние годы он широко применяется для идентификации буркхольдерий [15].

B. mallei, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, которая может выделяться вместе с возбудителем мелиоидоза из объектов внешней среды, характеризуются чрезвычайно высоким уровнем гомологии между собой, что обуславливает присутствие лишь незначительных отличий в составе антигенов данных видов буркхольдерий [11]. Поэтому большой интерес представляет выбор оптимального сочетания наиболее эффективных методов идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

При работе с указанными микроорганизмами II группы патогенности полуавтоматическая система API 20 NE безусловно имеет ценность для предварительной идентификации культур. Однако следует помнить, что при анализе данных по использованию API 20 NE и проверке точности определения видовой принадлежности культур генотипическими методами в референтных лабораториях выявлено, что в 10% случаев отмечаются ложноположительные, а в 5% ложноотрицательные результаты [12]. Система Nefermtest 24 существенно уступает по своей диагностической ценности API 20 NE. Принципиальным является также тот момент, что для окончательной идентификации культур, предположительно относящихся к патогенным буркхольдериям, требуется постановка дополнительных тестов, таких как подвижность бактерий, рост при 42 °С, устойчивость к гентамицину, вирулентность для золотистых хомячков. Таким образом, полуавтоматические системы могут быть использованы

для идентификации патогенных буркхольдерий при соблюдении требований безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности и проведения ряда дополнительных тестов при паспортизации культур.

Анализ данных по эффективности селективных сред показал, что для выделения *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* следует использовать среду L. Ashdown, *B. ceracia* — среду BCSM, *B. mallei* — среду для патогенных буркхольдерий [1].

Приведенные данные подтверждают возможность использования в качестве дополнительного теста, наряду с регламентированными методами идентификации, генетической трансформации как специфичного и достаточно простого метода определения видовой принадлежности патогенных буркхольдерий, основанного на их природной компетентности. В качестве реципиентов и доноров при этом могут быть применены как штаммы *B. pseudomallei*, так и *B. thailandensis*. Очевидно, что достоверность результата определяется, в первую очередь, состоянием природной трансформабельности реципиента.

Достигнутые в последние десятилетия значительные успехи в совершенствовании методов и средств обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза в немалой степени обусловлены внедрением гибридной технологии в практику получения высокоактивных иммуноглобулиновых ингредиентов заданной специфичности. При использовании МКА для изготовления диагностических препаратов и тест-систем различного целевого назначения становится возможным выявлять один из двух или оба вида буркхольдерий II группы патогенности при отсутствии взаимодействия с антигенами других видов микроорганизмов. Близкое антигенное родство возбудителей мелиоидоза, сапа с условно патогенной *B. thailandensis* и другими непатогенными видами буркхольдерий затрудняет возможность получения отдельного моноклонального антитела, способного узнавать только *B. pseudomallei*, все различные клинические изоляты этого микроорганизма и одновременно дифференцировать их от *B. mallei* и остальных близкородственных микроорганизмов [11]. Известно, что по способности ассимилировать L-арабинозу и наличию на поверхности клетки антигена 200 kDa, являющегося маркером вирулентности, можно дифференцировать вирулентные и авирулентные штаммы возбудителя мелиоидоза, выделяемые из проб клинического материала и объектов внешней среды [8]. В целях совершенствования лабораторной диагностики мелиоидоза ведется разработка препаратов и тест-систем на основе МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei*.

Одним из регламентированных методов экспресс-обнаружения микроорганизмов в различных объектах исследования является метод флуоресцирующих антител, позволяющий получать предварительный ответ в течение 2 — 3 ч от момента начала исследования, а также идентифицировать искомые виды микроорганизмов на этапах ускоренного лабораторного анализа [3, 7].

Производимые Волгоградским научно-исследовательским противочумным институтом иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сапные моноклональные (№ ФСР 2011/11614) и мелиоидозные моноклональные (№ ФСР 2011/11615) позволяют специфически выявлять соответственно возбудителей сапа и мелиоидоза. Последние обладают перекрестной активностью в отношении *B. thailandensis*. Разработанный экспериментальный препарат на основе МКА 6A₁₁ в рабочем разведении с указанным микроорганизмом не взаимодействует.

Проведенные исследования показали, что олигонуклеотидные флуоресцентные зонды, являющиеся фрагментами генов *orf13*, *fliC*, а также консер-

вативных последовательностей участка гена 23S рРНК, могут быть использованы для конструирования диагностических амплификационных тест-систем в связи с их высокой специфичностью, чувствительностью и возможностью идентифицировать патогенные буркхольдерии в выделенных культурах, биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке и в режиме реального времени.

В качестве маркеров при дифференциации или паспортизации штаммов многих видов микроорганизмов, имеющих медицинское значение, служат вариабельные нуклеотидные последовательности, такие как одонуклеотидные замены, тандемные повторы и протяженные дифференцирующие регионы — фрагменты ДНК, присутствующие в геноме не у всех штаммов определенного вида. В качестве скринингового исследования штаммов патогенных буркхольдерий предлагается метод RAPD [14]. Для развернутого исследования штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* рекомендуется мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов (MLVA) и анализ дифференцирующих регионов ДНК (DFR). Благодаря использованию высоко вариабельных ДНК-мишеней, данные методы характеризуются высокой дискриминирующей способностью даже при исследовании клональных микроорганизмов с очень консервативным геномом (*B. mallei* относится к числу таких микроорганизмов) [14].

По результатам DFR-типирования 18 исследованных штаммов возбудителя мелиоидоза удалось разделить на 13 VAT типов. Метод DFR можно рекомендовать для быстрого генетического типирования штаммов *B. pseudomallei*.

В геномах секвенированных штаммов *B. mallei* отсутствует большинство вариабельных локусов, выявленных с помощью субтрактивной гибридизации у *B. pseudomallei* и на основе которых проводится типирование штаммов возбудителя мелиоидоза [9]. Поэтому появилась необходимость найти новые локусы для типирования штаммов возбудителя сапа. Созданные в ходе исследования 9 олигонуклеотидных флуоресцентно-меченных зондов дали возможность определять наличие дифференцирующих последовательностей ДНК как по конечной точке, так и в режиме реального времени. Результаты DFR-типирования возбудителя сапа с флуоресцентной детекцией позволили дополнить электронный каталог геномных портретов бактерий.

Таким образом, анализ результатов исследования позволил предложить для Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза ряд методов их идентификации и типирования. На этапах индикации нативного материала, подозрительного на контаминацию бактериями рода *Burkholderia*, можно использовать, наряду с регламентированными, экспериментальные диагностические препараты для ПЦР и МФА, способные в короткие сроки предварительно идентифицировать близкородственные буркхольдерии до вида. Для дополнительной характеристики чистой культуры возбудителя и выдачи окончательного ответа возможно применение экспериментальных иммуноферментных тест-систем и метода генетической трансформации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жога Л.К., Илюхин В.И., Самыгин В.М. Транспортная среда для патогенных псевдомонад. Клиническая лабораторная диагностика. 1995, 1: 38-40.
2. Мазин А.В., Кузнецов К.Д., Краев А.С., Холодилов Н.Г. Методы молекулярной генетики и геномной инженерии. Новосибирск, Наука, Сиб. отделение, 1990.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М., Шико, 2013.
4. Прохвятилова Е.В., Антонов В.А., Викторов Д.В., Храпова Н.П., Ткаченко Г.А., Илюхин

- В.И., Захарова И.Б., Гришина М.А., Плеханова Н.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Булатова Т.В., Корсакова И.И., Савченко С.С., Бондарева О.С., Тетерятникова Н.Н., Сенина Т.В., Лопастейская Я.А., Батулин А.А., Куликова А.С. Сравнительная оценка информативности иммунологических и молекулярно-генетических методов и средств на этапах специфической индикации возбудителя мелиоидоза. Клиническая лабораторная диагностика. 2014, 12: 55-59.
5. Ряпис Л.А., Илюхин В.И., Вострова Е.И., Джуженов А. А. Лабораторная диагностика клинически значимых видов псевдомонад. Лаб. дело. 1988, 12: 66-71.
 6. Ряпис Л.А., Тарасова Т.Д. Перспективы применения хромосомной трансформации для идентификации возбудителей мелиоидоза. Журн. микробиол. 1988, 8: 16-19.
 7. Храпова Н.П., Алексеев В.В., Корсакова И.И., Дрефс Н.М., Ломова Л.В., Булатова Т.В., Напалкова Г.М. Применение сапных и мелиоидозных моноклональных антител различной эпитопной направленности для обнаружения и идентификации патогенных буркхольдери. Проблемы особо опасных инфекций. 2011, 107: 66-69.
 8. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P. et al. Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the in vitro growth of virulent Ara- and avirulent Ara+ Burkholderia pseudomallei. Acta tropica. 2000, 74: 221-228.
 9. Duangsonk K., Gal D., Mayo M. et al. Use of a variable amplicon typing scheme reveals considerable variation in the accessory genomes of isolates of Burkholderia pseudomallei. J. Clin. Microbiol. 2006, 44: 1323-1334.
 10. Goding J.W. Monoclonal antibodies: principles and practice. Acad. Press, 1986.
 11. Kim H.Y., Tsai S., Lo S.C. et al. Production and characterization of chimeric monoclonal antibodies against Burkholderia pseudomallei and B. mallei using the DHFR expression system. PLoS one. 2011, 5: e19867.
 12. Shelly D.B., Spilker T., Gracely E.J. Utility of commercial systems for identification of Burkholderia cepacia complex from cystic fibrosis sputum culture. J. Clin. Microbiol. 2000, 38: 3112-3115.
 13. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S. et al. Development of 5-nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the Burkholderia mallei/Burkholderia pseudomallei complex. Diagn. Mol. Pathol. 2004, 13: 247-253.
 14. U'Ren J.M., Schupp J.M., Pearson T. et al. Tandem repeat regions within the Burkholderia pseudomallei genome and their application for high resolution genotyping. BMC Microbiol. 2007, 1: 7-23.
 15. Vandamme P. Polyphasic taxonomy in practice: the Burkholderia cepacia challenge. WFCC Newsletter. 2002, 34: 17-24.

Поступила 10.05.16

Контактная информация: Корсакова Ирина Игоревна, к.м.н.,
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)37-37-74

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

А.Я.Никитин¹, А.К.Носков¹, Т.П.Баландина²

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ ИНФЕКЦИЯМИ, ПЕРЕДАЮЩИМИСЯ IXODES PERSULCATUS, НА СЕВЕРЕ И ЮГЕ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

¹Иркутский научно-исследовательский противочумный институт; ²Управление федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Иркутской области, Иркутск

Цель. Оценить степень эпидемического риска проявления клещевого энцефалита (КЭ) и иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ) в муниципальных образованиях (МО) Иркутской области с различными природно-климатическими условиями. *Материалы и методы.* Сравнивали заболеваемость КЭ и ИКБ за 2001 — 2015 гг. в МО Иркутской области, расположенных севернее или южнее 55 параллели, то есть находящихся в условиях разной суровости резко континентального климата. Анализировали данные усредненные по пятилетиям. *Результаты.* Во все пятилетия на севере области заболеваемость ИКБ в

два-три раза превышала КЭ, в то время как на юге различия отсутствовали. Кроме того, в МО, расположенных севернее 55 параллели, в 2001 — 2015 гг. не произошло, как на юге области, снижения заболеваемости КЭ и ИКБ. *Заключение.* Отсутствие снижения заболеваемости населения на севере КЭ и ИКБ и преобладание последней нозоформы требует совершенствования в этих МО комплекса профилактических мероприятий с акцентом на развитие неспецифических мер, включая акарицидные обработки, совершенствование работы центров экспресс-диагностики трансмиссивных инфекций, приобщение населения к использованию в период высокой активности клещей защитных костюмов.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 34—40

Ключевые слова: таежный клещ, клещевой вирусный энцефалит, клещевые боррелиозы, Иркутская область

A. Ya. Nikitin¹, A. K. Noskov¹, T. P. Balandina²

POPULATION MORBIDITY BY INFECTIONS TRANSMITTED VIA *Ixodes persulcatus* IN THE NORTH AND SOUTH OF IRKUTSK REGION

¹Irkutsk Research Institute for Plague Control; ²Administration of the Federal Service for Surveillance on Consumers' Rights Protection and Human Wellbeing for Irkutsk Region, Irkutsk, Russia

Aim. Evaluate the degree of epidemic risk of emergence of tick-borne encephalitis (TBE) and ixodes ticks' borreliosis (ITB) in municipalities (MPs) of Irkutsk region with various natural-climate conditions. *Materials and methods.* Morbidity was compared for TBE and ITB during 2001 — 2015 in MPs of Irkutsk region located to the north or south of the 55th parallel, i.e. in the conditions of different severity of sharply continental climate. 5-year average data were analyzed. *Results.* ITB morbidity was 2 — 3 times higher than TBE for all the 5-year periods in the north of the region, whereas in the south — differences were not present. Moreover, in MPs located to the north of the 55th parallel in 2001 — 2015 a decrease of TBE and ITB morbidity did not occur, as in the south of the region. *Conclusion.* The lack of population morbidity reduction by TBE and ITB in the north and prevalence of the latter nosoform requires enhancement of a complex of prophylaxis measures in these MPs with an accent in development of non-specific means, including acaricidal treatment, enhancement of operations of centers of express diagnostics of transmissible infections, familiarizing of the population with the use of protective suits during periods of high activity of ticks.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 34—40

Key words: taiga tick, tick-borne viral encephalitis, tick-borne borrelioses, Irkutsk region

ВВЕДЕНИЕ

На территории России сохраняется напряженная эпидемиологическая обстановка по клещевому энцефалиту (КЭ) и иксодовым клещевым боррелиозам (ИКБ). Основным переносчиком возбудителей этих заболеваний на всей азиатской и значительной части европейской территории страны является таежный клещ (*Ixodes persulcatus*) [1, 4 — 6]. Несмотря на единство переносчика и совмещенный характер природных очагов КЭ и ИКБ, зоны высокого эпидемического риска проявлений этих инфекций часто не совпадают [2 — 8, 12, 13]. В этой связи, дифференциация территорий по уровню заболеваемости важна не только для совершенствования тактики профилактики инфекционных болезней, но позволяет лучше понять влияние экологических факторов и роль в эпидемическом процессе сочленов паразитарных триад.

Цель работы — оценить степень эпидемического риска проявления КЭ и

ИКБ в муниципальных образованиях (МО) Иркутской области с различными природно-климатическими условиями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованы материалы Референс-центра по мониторингу природно-очаговых заболеваний бактериальной и вирусной этиологии Иркутского противочумного института. Анализировали заболеваемость КЭ и ИКБ за 2001 — 2015 гг. в МО Иркутской области с учетом расположения их территорий (по координатам административных центров) севернее и южнее 55 параллели, что определяет разную степень суровости резко континентального климата, соответственно тепло- и влагообеспеченность, типы преобладающих растительных формаций, продолжительность периода вегетации и т.д. [4, 11, 14].

Регулярность проявления заболеваний и временные тренды изменений показателей оценивали на основе данных усредненных по пятилетиям: 2001 — 2005 гг., 2006 — 2010 гг. и 2011 — 2015 гг. Для оценки интенсивности эпидемического процесса рассчитывали индекс повторяемости проявлений болезни, представляющий отношение числа лет со случаями ее регистрации к периоду наблюдений. Материалы по Усть-Ордынскому Бурятскому округу (УОБО), вошедшему в состав Иркутской области в 2008 г., рассмотрены без оценки динамики эпидемического процесса.

Статистическая обработка данных проведена стандартными методами вариационной статистики с использованием программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зона распространения таежного клеща в Иркутской области проходит от ее южных границ, оптимальных для обитания переносчика до 60 — 62° северной широты, где он встречается мозаично по локальным тепло- и влагообеспеченным участкам. Повсеместно в местах изучения зараженности клещей выявлена его инфицированность вирусом клещевого энцефалита и боррелиями [2, 4 — 8, 11, 14].

В табл. 1 приведена заболеваемость населения КЭ и ИКБ на территориях 18 МО Иркутской области, расположенных южнее 55 параллели и характеризующихся в течение трех изученных пятилетних периодов регулярным выявлением больных. Отметим, что обе нозоформы во второе и третье пятилетие регистрировали в среднем достоверно реже, чем в первый период (для КЭ при сравнении I пятилетия со II и III $P < 0,01$; для ИКБ — $P < 0,05$). Вместе с тем, между II и III пятилетиями значимые различия по заболеваемости населения КЭ и ИКБ отсутствуют, что указывает на произошедшую стабилизацию интенсивности эпидемического процесса, то есть на недостаточность применяемых мер профилактики для улучшения эпидемиологической обстановки. В связи с этим, не очевидно, что снижение заболеваемости в 2001 — 2005 гг. произошло благодаря проведенным профилактическим мероприятиям. Это могло быть следствием цикличности проявлений природно-очаговых трансмиссивных инфекций.

Для рассматриваемых МО (табл. 1) в первое пятилетие (2001 — 2005 гг.) средняя заболеваемость населения КЭ ($14,9 \pm 2,46^0/0000$) в 1,7 раза выше, чем ИКБ ($8,6 \pm 1,44^0/0000$). Эти различия статистически значимы ($P < 0,05$). Именно преобладанием проявлений КЭ над ИКБ ранее характеризовали территорию Иркутской области [3], что, как будет показано ниже, неверно.

Все три пятилетия соотношение двух нозоформ (ИКБ/КЭ) в МО, находящихся южнее 55°, остается неизменным со случайной вариацией показателя

Таблица 1. Заболеваемость населения КЭ и ИКБ в МО Иркутской области с регулярной регистрацией болезней, расположенных южнее 55 параллели (I — период 2001 — 2005 гг.; II — 2006 — 2010 гг.; III — 2011 — 2015 гг.)

Муниципальные образования	Средняя заболеваемость КЭ по пятилетиям (%/1000)			Средняя заболеваемость ИКБ по пятилетиям (%/1000)			Отношение ИКБ/КЭ по пятилетиям		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Ангарск	13,3	5,8	5,6	9,7	7,5	3,3	0,7	1,30	0,6
Жигаловский район	18,9	11,9	3,6	5,6	7,9	10,9	0,3	0,66	3,1
Зима	7,4	1,8	3,5	5,7	1,8	7,2	0,8	1,00	2,1
Зиминский район	14,6	2,7	6,4	5,3	2,7	4,0	0,4	0,99	0,6
Иркутск	11,5	5,1	11,9	5,4	3,7	5,5	0,5	0,73	0,5
Иркутский район	22,9	9,2	5,1	12,7	7,5	2,3	0,6	0,82	0,5
Качугский район	43,6	9,8	2,0	26,0	7,9	1,8	0,6	0,80	0,9
Куйтунский район	8,6	1,7	3,3	3,6	2,8	4,5	0,4	1,66	1,4
Саянск	13,5	5,0	6,8	7,9	5,0	2,6	0,6	1,00	0,4
Слюдянский район	32,4	7,0	8,8	5,7	3,2	4,5	0,2	0,46	0,5
Тулун	6,1	2,0	3,2	5,0	3,3	3,5	0,8	1,61	1,1
Тулунский район	14,4	3,5	3,9	21,5	6,4	1,5	1,5	1,81	0,4
Усолье	4,5	2,8	8,4	5,2	3,7	4,1	1,1	1,34	0,5
Усольский район	2,9	3,9	5,1	7,2	5,4	4,6	2,4	1,40	0,9
Усть-Удинский район	21,7	7,4	14,7	2,3	3,7	5,4	0,1	0,50	0,4
Черемхово	5,3	7,2	5,4	6,6	5,7	5,4	1,2	0,80	1,0
Черемховский район	19,1	13,6	5,6	9,6	7,7	3,3	0,5	0,57	0,6
Шелеховский район	7,8	4,2	3,6	8,9	5,1	10,9	1,1	1,23	3,1
Среднее значение для МО ($\bar{x} \pm m$)	14,9±2,46	5,8±0,83	6,0±0,79	8,6±1,44	5,1±0,48	4,2±0,54	0,8±0,13	1,0±0,10	0,9±0,17

около единицы (табл. 1). Территория УОБО, позже включенного в состав Иркутской области, также находится южнее 55 параллели. В пяти районах УОБО с постоянной регистрацией КЭ и ИКБ (Аларский, Осинский, Боханский, Эхирит-Булаганский, Баяндаевский районы) соотношение в проявлении нозоформ составило $1,0 \pm 0,32$, то есть не отличается от значений показателя других МО (табл. 1). Однако средний уровень заболеваемости населения в УОБО значительно выше, чем в этих МО (КЭ в 2,0 раза, ИКБ в 2,9), что предполагает необходимость принятия организационных решений, направленных на увеличение эффективности проводимых в округе мер профилактики инфекций, передающихся иксодовыми клещами.

Величина индекса повторяемости проявления инфекций в МО из табл. 1 для КЭ в первое пятилетие составила $0,9 \pm 0,04$, во второе — $0,8 \pm 0,05$; в третье — $0,8 \pm 0,05$; для ИКБ, соответственно: $0,8 \pm 0,07$; $0,8 \pm 0,07$ и $0,7 \pm 0,06$. Все различия статистически не значимы, то есть, для обеих нозоформ, несмотря на снижение заболеваемости во второй и третий периоды по сравнению с первым (табл. 1), интенсивность эпидемического процесса не изменилась.

В МО Иркутской области, расположенных севернее 55 параллели, где регулярно регистрировали случаи заболеваний, не выявлено достоверных изменений проявлений КЭ и ИКБ во времени, причем во все периоды преобладали боррелиозы (табл. 2). Индекс повторяемости проявлений КЭ по пятилетиям составил: $0,8 \pm 0,11$; $0,8 \pm 0,11$; $0,8 \pm 0,08$. Для ИКБ, соответственно: $0,9 \pm 0,10$; $0,9 \pm 0,07$; $0,9 \pm 0,07$. То есть, интенсивность эпидемического процесса за 2001 — 2015 гг. на севере области не изменилась.

Отсутствие снижения заболеваемости населения КЭ и ИКБ в МО севернее 55 параллели, в отличие от территорий, расположенных южнее, вероятно, связано с меньшей эффективностью мер их профилактики в этих районах области.

Таблица 2. Заболеваемость населения КЭ и ИКБ в МО Иркутской области с регулярной регистрацией болезней, расположенных севернее 55 параллели (I — период 2001 — 2005 гг.; II — 2006 — 2010 гг.; III — 2011 — 2015 гг.)

Муниципальные образования	Средняя заболеваемость КЭ по пятилетиям (‰/0000)			Средняя заболеваемость ИКБ по пятилетиям (‰/0000)			Отношение ИКБ/КЭ по пятилетиям		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Братск	1,2	1,5	1,0	4,5	3,6	2,1	3,8	2,4	2,0
Братский район	2,6	1,9	2,3	1,5	3,5	2,2	0,6	1,8	0,9
Тайшет	4,8	2,3	1,6	10,1	11,1	12,6	2,1	4,8	8,0
Усть-Илимск	3,5	7,3	13,8	7,8	17,8	20,8	2,2	2,4	1,5
Усть-Илимский район	1,8	5,6	5,3	8,7	22,5	22,2	4,8	4,0	4,2
Чунский район	10,5	8,9	11,7	12,6	13,5	11,6	1,2	1,5	1,0
Среднее значение для МО ($\bar{X} \pm m$)	4,1±1,39	4,6±1,28	5,9±2,24	7,5±1,63	12,0±3,11	11,9±3,55	2,4±0,65	2,8±0,53	3,0±1,13

В МО Иркутской области, расположенных севернее 55 параллели с регулярной регистрацией болезней, заболеваемость КЭ в 2001 — 2005 гг. была ниже (табл. 2), чем на юге (табл. 1). Однако со второго пятилетия эти различия нивелировались из-за снижения уровня проявления болезни на юге. За счет аналогичного характера изменения проявлений ИКБ на юге области отсутствие различий по заболеваемости населения между территориями севера и юга в первый пятилетний период сменилось в последующем стойким превышением регистрации боррелиозов на севере области (табл. 1 и 2).

Все три пятилетних периода на севере Иркутской области средняя заболеваемость ИКБ в два-три раза превышала КЭ (табл. 2), а на юге области показатели их проявления не различались (табл. 1). Таким образом, северные территории более эпидемически опасны по ИКБ, по сравнению с КЭ. Хронологический анализ проявления двух нозоформ не выявил уменьшения значений отношения ИКБ/КЭ в высоких широтах, которое можно было бы ожидать в виду изменения условий существования паразитарной триады в период потепления климата.

Учитывая, что нарастание проявлений ИКБ по отношению к КЭ ранее

Таблица 3. Интенсивность эпидемического процесса проявления КЭ и ИКБ в МО Иркутской области с нерегулярной регистрацией болезней (I — период 2001 — 2005 гг.; II — 2006 — 2010 гг.; III — 2011 — 2015 гг.)

Муниципальные образования	Индекс повторяемости проявлений КЭ по пятилетиям			Индекс повторяемости проявлений ИКБ по пятилетиям		
	I	II	III	I	II	III
Муниципальные образования, расположенные южнее 55 параллели						
Балаганский район	0,2	0,4	0,6	0,4	0,0	0,2
Ольхонский район	0,6	0,6	0,6	0,0	0,2	0,2
Заларинский	0,6	0,4	0,0	0,2	0,6	0,0
Нижнеудинский	0,0	0,2	0,0	1,0	1,0	0,0
Среднее значение для МО ($\bar{X} \pm m$)	0,35±0,150	0,40±0,082	0,30±0,173	0,40±0,216	0,45±0,222	0,10±0,058
Муниципальные образования, расположенные севернее 55 параллели						
Бодайбинский район	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,6
Железногорск	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,8
Нижнеилимский район	0,0	0,2	0,0	0,0	0,4	0,8
Усть-Кутский район	0,0	0,2	0,0	1,0	1,0	1,0
Казачинский	0,6	0,0	0,6	0,8	0,6	0,8
Тайшетский	0,6	0,0	0,0	1,0	1,0	0,6
Среднее значение для МО ($\bar{X} \pm m$)	0,20±0,126	0,07±0,042	0,13±0,099	0,50±0,198	0,57±0,150	0,77±0,061

установлено в субъектах на севере Уральского федерального округа [3], полагаем, выявленная зависимость особенностей эпидемических процессов по этим инфекциям от географической широты (суровости климата) имеет универсальный характер.

Кроме МО Иркутской области с регулярной (при рассмотрении пятилетних периодов за 2001 — 2015 гг.) регистрацией случаев КЭ и ИКБ выделено 10 районов, где проявление одной или обеих нозоформ отсутствовало (табл. 3). Для этих территорий на основе расчета индекса повторяемости проявлений болезни проведено сравнение средних показателей интенсивности эпидемического процесса. Показано, что во все три пятилетних периода для КЭ повторяемость выше на юге (различия достоверны для второго периода), а для ИКБ — на севере (различия достоверны для третьего периода), что соответствует характеристике этих территорий проведенной для МО с регулярной заболеваемостью (табл. 1 и 2).

Таким образом, Иркутская область не может быть целиком отнесена к субъектам с преобладанием КЭ над ИКБ. На севере и юге области характер проявления двух нозоформ различен. Кроме того, в МО, расположенных севернее 55 параллели, в 2001 — 2015 гг. не произошло снижения заболеваемости населения КЭ и ИКБ, как на юге. Полагаем, что одной из причин преобладания ИКБ над КЭ на севере области может быть более высокая устойчивость системы «клещ-боррелии» к внешним воздействиям, благодаря чему боррелиозы и являются наиболее распространенным трансмиссивным зоонозом. Известно, что присутствие спирохет в организме клещей модулирует их двигательную и поисковую активность [1, 9], удлиняет продолжительность жизни [10], посредством подавления синтеза Т-лимфоцитов и комплемента млекопитающих способствует лучшему насыщению переносчика кровью [1, 15]. «Выгоду» от подобных межвидовых отношений будут получать внутривидовые группы клещей с большей экстенсивностью заражения боррелиями, каковыми являются особи с аномалиями экзоскелета [1]. А так как на *I. ricinus* экспериментально показано, что у самок с аномалиями доля потомков, имеющих нарушения экзоскелета, в 3 — 4 раза выше, чем у особей без изменений [1], то в северных популяциях следует ожидать увеличения встречаемости клещей с отклонениями строения. Соответствующее смещение в структуре популяций таежного клеща на севере и юге Иркутской области было зарегистрировано [11, 14].

Длительное отсутствие снижения заболеваемости населения севера области инфекциями, передающимися иксодовыми клещами, несмотря на относительно невысокую численность переносчика, требует дальнейшего развития в этих МО всего комплекса мер профилактики. Преобладание ИКБ над КЭ предполагает необходимость развития методов неспецифической профилактики, включая акарицидные обработки, благоустройство территорий, санитарное просвещение с целью приобщения охотников, рыбаков, населения к использованию в период активности клещей специальных защитных костюмов и/или инсектоакарицидно-репеллентных средств, а также совершенствование работы центров экспресс-диагностики трансмиссивных инфекций. Наиболее актуально это для г. Усть-Илимск и Усть-Илимского района, Чунского МО, г. Тайшет, заболеваемость ИКБ в которых в 2 — 5 раз выше, чем на юге Иркутской области. Из МО, расположенных южнее 55 параллели, особое внимание к развитию комплекса мер профилактики должно быть уделено пяти из шести районов УОБО, Усть-Удинскому и Жигаловскому МО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А. Н., Дубинина Е. В., Юшкова О. В. Функционирование паразитарной системы «клещ-возбудители» в условиях усиливающегося антропогенного пресса. Санкт-Петербург, Инсанта, 2008.
2. Богомазова О.Л., Безгодов И.В., Успенский В.Б., Миряшкин Н.А., Верховина М.М., Казанова В.Б., Осипова Т.Н., Романенко Е.Г., Козлова И.В., Данчинова Г.А. О риске заражения населения клещевыми инфекциями в местах массового отдыха в Бодайбинском районе Иркутской области. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2014, 25: 82-84.
3. Завальский Л.Ю., Штанников А.В., Бикетов Д.С., Храмов М.В., Дятлов И.А. Сравнительный анализ заболеваемости клещевым боррелиозом и клещевым энцефалитом в регионах Российской Федерации с помощью географических информационных систем за период 2000-2006 гг. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010, 6: 4-10.
4. Злобин В.И., Борисов В.А., Верховина М.М., Малов И.В., Холмогорова Г.Н. Клещевой энцефалит в Восточной Сибири. Иркутск, РИО ВСНЦ СО РАМН, 2002.
5. Козлова И.В., Верховина М.М., Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Рар В.А., Фоменко Н.В., Ткачев С.Е., Богомазова О.Л., Борисов В.А., Туваков М.К., Злобин В.И. Сочетанные очаги трансмиссивных клещевых инфекций на территории Прибайкалья. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 4 (53): 40-46.
6. Козлова И.В., Злобин В.И., Воробьева М.С., Верховина М.М. Экспресс-диагностика и экстренная профилактика иксодовых клещевых инфекций. М., Компания БОРГЕС, 2009.
7. Лисак О.В., Козлова И.В., Сунцова О.В., Богомазова О.Л., Дорощенко Е.К., Чумаченко И.Г., Черноиванова О.О., Ревизор А.О. Современная эпидемиологическая ситуация в отношении трансмиссивных клещевых инфекций в северных районах Иркутской области. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2012, 5 (87): 97-101.
8. Ляпунов А.В., Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Туник Т.В., Чапоргина Е.А., Арбатская Е.В., Каверзина А.С., Петрова И.В., Савелькаева М.В., Горбунова Е.Л. Риск заражения «клещевыми» инфекциями на территориях северных районов Предбайкалья. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2011, 5 (81): 145-148.
9. Наумов Р.Л. Поисксовая активность зараженных боррелиями таежных клещей *Ixodes persulcatus*. Паразитология. 1999, 3 (33): 251-256.
10. Наумов Р.Л. Продолжительность жизни лесного и таежного клещей (*Ixodidae*), зараженных и не зараженных боррелиями группы *burgdorferi*. Паразитология. 2003, 6 (37): 527-532.
11. Никитин А.Я., Панова Т.С., Алексеев А.Н., Дубинина Е.В., Богомазова О.Л., Козлова Ю.А. Частота аномалий экзоскелета у самок таежного клеща в популяциях из пригородов Иркутска и Братска. Известия Иркутского государственного университета. 2011, 1 (4): 95-98.
12. Носков А.К., Трушина Ю.Н., Туранов А.О., Адельшин Р.В., Хаснатинов М.А., Трухина А.Г., Андаев Е.И. Клинико-эпидемиологические особенности иксодовых клещевых боррелиозов в Забайкальском крае. Проблемы особо опасных инфекций. 2014, 4: 25-29.
13. Туранов А.О., Носков А.К., Трухина А.Г., Борисова Т.И., Андаев Е.И. Особенности клещевого вирусного энцефалита в Забайкальском крае. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2015, 5 (105): 47-51.
14. Панова Т.С. Экологические и морфологические особенности популяций таежного клеща в контрастных условиях обитания (на примере территорий юга и севера Иркутской области). Автореф. дис. канд. биол. наук. Иркутск, 2011.
15. Stevenson V., El-Hage N., Hines M.A. et al. Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. Infect. Immun. 2002, 2 (70): 491-497.

Поступила 23.06.16

Контактная информация: Никитин Алексей Яковлевич, д.б.н., 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р.т. (3952)22-01-37

О.В.Бухарин¹, О.Е.Челпаченко¹, Е.И.Данилова², И.Н.Чайникова^{1,2}, Н.Б.Перунова¹,
Е.В.Иванова¹, И.А.Никифоров¹, Л.П.Федотова¹, Т.А.Бондаренко¹, А.В.Салгина¹

МИКРОСИМБИОЦЕНОЗ КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ С РЕАКТИВНЫМ АРТРИТОМ

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Оренбургский государственный медицинский университет

Цель. Изучить состояние кишечного микросимбиоза у детей с реактивным артритом (РеА) с оценкой биопленкообразования (БПО) микросимбионтов и способности изменять уровень цитокинов (их антицитокиновую активность) в условиях *in vitro*. **Материалы и методы.** Проведено исследование кишечного микросимбиоза бактериологическим методом 34 детей с РеА и 25 условно здоровых детей от 3 до 16 лет. Идентификация микроорганизмов осуществлялась с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии, антицитокиновая активность (АЦА) микросимбионтов — по методике Бухарина О.В. с соавт. (2011), биопленкообразование — по O'Toole G.A., Kolter R. (1998). **Результаты.** На основании различий видового состава кишечной микробиоты сконструирована дискриминантная модель, позволившая отделить группу детей с РеА от здоровых лиц. Микросимбиоз пациентов с РеА характеризовался увеличением численности условно патогенных микроорганизмов (УПМ) (энтеробактерий, кластридий, бактериоидов, грибов рода *Candida*), повышением их БПО и уровня АЦА. **Заключение.** Полученные данные вносят вклад в расшифровку механизмов развития спондилоартритов и раскрывают роль микробного фактора при данной патологии. Гиперколонизация кишечника человека УПМ, обладающих выраженной способностью к БПО и регулирующих уровень цитокинов, способствует усилению артритогенного потенциала и служит дополнительным маркером риска развития артрита у детей.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 41—48

Ключевые слова: микросимбиоз кишечника, антицитокиновая активность, биопленкообразование, реактивный артрит, дети

О.В.Бухарин¹, О.Е.Челпаченко¹, Е.И.Данилова², И.Н.Чайникова^{1,2}, Н.Б.Перунова¹,
Е.В.Иванова¹, И.А.Никифоров¹, Л.П.Федотова¹, Т.А.Бондаренко¹, А.В.Салгина¹

GUT MICROSymbiOCEnOSIS IN CHILDREN WITH REACTIVE ARTHRITIS

¹Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Orenburg State Medical University, Russia

Aim. To study the state of gut microsymbiocenosis in children with reactive arthritis (RA), with the assessment of biofilm formation (BFF) of microsymbionts and the ability to change cytokine levels (their anticytokine activity) *in vitro*. **Materials and methods.** The investigation of gut microsymbiocenosis by means of bacteriological method was conducted in 34 children with RA and 25 relatively healthy 3 — 16 year- old children. Microorganisms were identified with the help of MALDI-TOF mass-spectrometry, anticytokine activity (ACA) of microsymbionts — according to Bukharin O.V. et al. (2011), biofilm formation — according to O'Toole G.A., Kolter R. (1998). **Results.** On the ground of species composition differences of gut microbiota discrimination model was created which allowed to separate the group of children with RA from healthy individuals. Microsymbiocenosis of patients with RA was characterized by increasing number of opportunistic microorganisms (OM) (enterobacteria, clostridia, bacteroides, and *Candida*), BFF and ACA level. **Conclusion.** The obtained data greatly contribute to the deciphering of spondyloarthritis and disclose the role of microbial factor under given pathology. Hypercolonisation of human gut with OM, having pronounced ability to BFF and regulating cytokine level, promotes strengthening of arthritogenic potential and serves as additional marker of arthritis development risk in children.

Key words: gut microsymbiocenosis, anticytokine activity, biofilm formation, reactive arthritis, children

ВВЕДЕНИЕ

Реактивные артриты (ReA), входящие в группу спондилоартритов, занимают лидирующее положение в структуре ревматических воспалительных заболеваний и ассоциируются с острой или персистирующей кишечной, носоглоточной и урогенитальной инфекцией [5]. Наряду с генетической предрасположенностью (ассоциация ReA с антигеном HLA-B27), антигенной мимикрией [7, 8, 15] в последние годы в качестве одного из патогенетических механизмов формирования патологии суставов рассматриваются нарушения состояния микросимбиоза толстого кишечника [6 — 8]. В настоящее время активно изучается участие нормобиоты в поддержании стабильности локального, так называемого кишечного гомеостаза (gut homeostasis, термин широко используемый зарубежными исследователями) [10]. Структурными и функциональными компонентами этого гомеостаза являются: доминантная и ассоциативная микрофлора, продукты ее метаболизма, разновидности эпителиальных, миелоидных, лимфоидных клеток кишечника, компоненты муцина, ферменты, белки, антимикробные пептиды и другие молекулы и клетки [9]. В этом аспекте интерес представляют цитокины, являющиеся той организующей системой, которая формирует и реализует весь комплекс защитных реакций при внедрении патогенов, в том числе иммунную толерантность к нормальной микробиоте, проницаемость кишечного барьера, колонизационную резистентность, мукозальный иммунитет и воспаление [7, 9, 10]. При определенных условиях (высокая микробная нагрузка, особенности генотипа хозяина и др.) патогены и условно патогенные микросимбионты (УПМ) способны модифицировать цитокины (деградация, нейтрализация, блокирование с помощью синтеза белков, имитирующих цитокины или их рецепторы, связывание цитокинов белками наружной мембраны), а также использовать их в качестве ростовых факторов, благодаря наличию у бактерий рецепторов к цитокинам [11, 12], регулируя тем самым иммунный гомеостаз.

Альтернативой кишечной микробиоте в условиях эубиоза являются изменения в составе и функции кишечной микрофлоры (дисбиоз). Одним из диагностических критериев выявления дисбиотических состояний толстого кишечника служит снижение содержания доминантных анаэробных симбионтов — бифидобактерий, которым принадлежит ключевая функция в распознавании «свой-чужой» на основе оппозитного феномена усиление/подавление важнейших физиологических характеристик выживания микросимбионтов пары «доминант-ассоциант» [2]. Предполагается, что первичная дискриминация чужеродного материала бифидофлорой — инициальный этап последующего «сигналинга» в регуляции иммунных механизмов гомеостаза хозяина через дендритные клетки [1]. На формирование оптимального цитокинового баланса в биотопе кишечника влияют количественные изменения уровня и профиля секреции цитокинов при контакте клеток микробиоты и их метаболитов с эффекторами врожденного и адаптивного иммунитета, а также за счет прямого взаимодействия их с цитокинами (антицитокиновая активность, АЦА) [3]. Поддерживаемый микробиотой цитокиновый баланс обеспечивает оптимальное функционирование кишечного биотопа в условиях высокой антигенной нагрузки [9, 13]. При дисбиозе кишечника, стрессе и иммунной недостаточности условно патогенные представители

кишечной микробиоты могут реализовывать артритогенный потенциал, способствуя формированию артритов [7, 8].

В поддержании и сохранении кишечного гомеостаза наряду с участием цитокиновой сети важная роль принадлежит и межмикробному взаимодействию кишечных микросимбионтов, в частности, биопленкообразованию (БПО), обеспечивающему стратегию выживания в биотопе хозяина [2]. БПО, защищая УПМ от иммунных механизмов, предоставляет возможность беспрепятственного проникновения микробов в сосудистый кровоток с последующей транслокацией в синовиальную оболочку суставов, где формируются стойкие очаги эндогенной инфекции, трудно поддающиеся лечению антимикробными средствами из-за неспособности разрушать бактериальную биопленку ассоциантов — возбудителей воспалительного процесса. Отсюда хронизация и рецидивирующее течение инфекционного процесса; требующие индивидуальной этиотропной терапии [4, 10].

Учитывая сложные межмикробные взаимоотношения под влиянием иммунорегуляторных механизмов и триггерной роли микроорганизмов и их антигенов в формировании РеА, целью работы явилось изучение состояния кишечного микросимбиоза у детей, страдающих РеА, с оценкой БПО и способности микросимбионтов изменять уровень цитокинов (их антицитокиновую активность) в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе получены данные обследования 59 человек, разделенных на 2 группы. Первая обследуемая группа была представлена 34 детьми (от 3 до 16 лет) с РеА, вторую группу (группа сравнения) составили 25 условно здоровых детей. Для постановки диагноза РеА использовали критерии Международного совещания по РеА (Берлин, 1996). Исследование микробиоценоза кишечника осуществлялось в соответствии с «Методическими рекомендациями по применению бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника» (М., 1986). Выделение и идентификация анаэробных микроорганизмов проводились в соответствии с руководством «Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual» (2002). Для верификации результатов идентификации все изоляты были дополнительно идентифицированы по их белковым профилям с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра «Microflex» («Bruker Daltonics», Германия). Оценка состояния кишечного микробиоценоза по степеням проводилась в соответствии с приказом МЗ РФ от 9 июня 2003 года № 231.

Антицитокиновая активность (АЦА) в отношении провоспалительных (TNF- α , INF- γ , IL-6) и противовоспалительного (IL-10) цитокинов определяли путем соинкубирования экзометаболитов бактерий и грибов с рекомбинантными цитокинами по методике [3] и выражали в пг/мл и в % — изменения количества цитокинов в опыте по сравнению с исходным уровнем в контроле. Способность микроорганизмов к БПО определяли по методике [14]. БПО выражали в условных единицах, рассчитывая коэффициент биопленкообразования ($K_{\text{БПО}}$): $K_{\text{БПО}} = \text{ОДк} / \text{ОДб}$, где ОДк — оптическая плотность опытных проб и проб группы сравнения, а ОДб — оптическая плотность питательного бульона.

Полученные результаты были обработаны параметрическими и непараметрическими методами в компьютерной оболочке Windows с помощью Microsoft Excel и программы «Биостат» с использованием программы STATISTICA 10 и определением критерия Хи-квадрат; достоверность различий между показателями составляла $p < 0,05$. Для выявления этиологической значимости микроорганизмов в формировании РеА был проведен дискриминантный анализ данных бактериоло-

гического исследования кишечного микросимбиоза здоровых детей в сравнении с детьми с РеА.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выявления особенностей состояния микросимбиоза дистального отдела толстого кишечника у детей с РеА по результатам бактериологического исследования была сконструирована дискриминантная модель двух групп пациентов — больных реактивным артритом и условно здоровых. Для этого была сформирована презентативная клиническая выборка, информационно описывающая 21 случай больных РеА и 10 случаев здоровых детей. Все тесты включали значения логарифмов КОЕ для каждого из 51 микроорганизмов, выступающих в роли независимых переменных. Средствами комплекса STATISTICA 10 по этим данным был проведен пошаговый дискриминантный анализ исследуемого микробного разнообразия. В итоге была построена дискриминантная модель, включающая только 22 из 51 микроорганизмов, чьи независимые вклады в общую дискриминацию выборки определены как наиболее значимые. Значения полученной дискриминантной функции уверенно разде-

Таблица 1. Факторная структура дискриминантного корня к рисунку

<i>Escherichia coli</i> Lac ±	-0.077
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-0.038
<i>Bacteroides vulgatus</i>	-0.035
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.033
<i>Actinomyces israelii</i>	-0.032
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-0.032
<i>Bacteroides caccae</i>	-0.032
<i>Bacillus</i> spp.	-0.017
<i>Propionibacterium acnes</i>	-0.016
<i>Enterococcus faecalis</i>	-0.014
<i>Clostridium indolis</i>	-0.014
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-0.012
<i>Escherichia coli</i> Lac+	-0.007
<i>Actinomyces oris</i>	-0.006
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.002
<i>Bifidobacterium longum</i>	0.004
<i>Cronobacter</i> spp.	0.013
<i>Staphylococcus arletae</i>	0.015
<i>Proteus</i> spp.	0.015
<i>Kocuria varians</i>	0.015
<i>Escherichia coli</i> Lac-	0.016
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0.021
<i>Bacteroides uniformis</i>	0.022

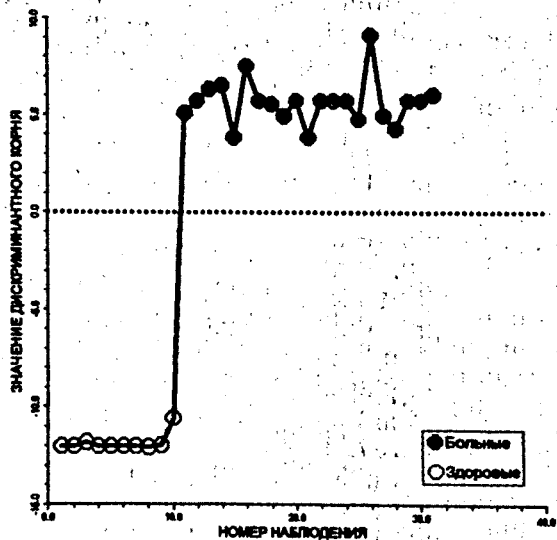


График дискриминантного корня клинической выборки.

Примечание. Всего 31 наблюдение (10 здоровых, 21 больной).

ляли сравниваемые множества больных и здоровых детей. Отсортированная по собственным значениям факторная структура канонического дискриминантного корня и его график представлены на рис. и в табл. 1. Дискриминантный корень с приведенной на рис. структурой точно разделяет здоровых детей и больных РеА. Все фигуративные точки графика с положительными значениями этого корня относятся к случаям болезни, а отрицательные значения характеризуют здоровых детей. Интерпретируя представленный график, следует отметить, что его отрицательные значения связаны с повышением роли: *Escherichia coli* лактозопозитивной (Lac+), *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides vulgatus*. Положительные значения корня

свидетельствуют об увеличении КОЕ *Bacteroides uniformis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *E.coli* лактозонегативной (Лас-). Числовые значения каждого корня соответствовали микроорганизмам, отсортированным по факторным нагрузкам. Это позволило оценить роль конкретных микросимбионтов кишечника в процедуре дискриминации наблюдений по двум сравнимаемым группам. Из рис. видно, что корень ROOT1 (99% общей дисперсии) абсолютно точно разделяет здоровых детей и больных реактивным артритом. Все фигуративные точки диаграммы со значениями этого корня меньше четырех относятся к случаям РеА, тогда как остальные характеризуют здоровых детей.

Исследование состояния микросимбиоза кишечника детей обследуемых групп показало, что у детей с РеА эубиоз выявлялся у 23,5±7,2% детей, дисбиоз I степени — у 11,7±5,6%, дисбиоз II степени — у 47,1±8,6%, дисбиоз III степени — у 17,7±6,6% больных. В группе сравнения отмечалось преобладание детей с эубиозом — 41,2±9,8%, дисбиоз I степени, равно как и дисбиоз II степени был выявлен у 29,4±6,2% обследуемых. Таким образом, у большинства детей с РеА выявлялись существенные нарушения микросимбиоза толстого кишечника.

Анализ частоты выделения микросимбионтов показал увеличение случаев высеваемости у детей с РеА по сравнению со здоровыми *Clostridium perfringens* (41,2±7,7% против 11,7±7,7%, $p<0,05$) и бактероидов (68,1±8,1% против 12,5±6,5%, $p<0,05$). Что касается факультативно-анаэробного спектра кишечного микросимбиоза детей с РеА, то по сравнению с группой здоровых детей отмечалось повышение частоты встречаемости гиперколонизации дистального отдела толстого кишечника условно патогенной грамотрицательной бактериальной флоры: *E. coli* Лас- (соответственно 35,3±8,2% против 4,0±3,9%, $p<0,05$), бактерий рода *Citrobacter* (29,4±7,8% против 4,0±3,9%, $p<0,05$), протея (8,8% против 0%, $p<0,05$). Представители кронобактерий и буркхольдерии высевались только у больных РеА с одинаковой частотой — 3,0±2,9%. Наряду с этим, у пациентов с РеА, по сравнению со здоровыми, также отмечено увеличение количества грампозитивной флоры: стафилококков (40,0±8,4% у больных против 12±6,5% у здоровых), стрептококков (3,0±2,9% — выделялись только у больных), бацилл (11,7±5,4% — высевались только у больных) и значительный рост высеваемости грибов рода *Candida* (соответственно 61,8±8,4% против 8,0±5,4%, $p<0,05$).

Анализ данных по сравнительной характеристике К_{БПО} микроорганизмов, выделенных из кишечника детей обеих групп, показал, что наиболее высокая способность к БПО выявлена для штаммов бифидобактерий, являющихся представителями доминантной микрофлоры кишечного микросимбиоза. Характерно, что выраженность К_{БПО} бифидобактерий, выделенных от здоровых детей, была значительно выше, чем у детей с РеА (18,0±0,25 против 11,03±0,98 у.е., $p<0,05$). Вместе с тем, для большинства УПМ, выделенных от детей с РеА, по сравнению со здоровыми, выявлено увеличение К_{БПО} с наибольшими значениями показателя для штаммов клебсиелл (9,35±0,21 против 1,14±0,04 у.е., $p<0,05$), *E.coli* Лас- (4,08±0,18 против 0,80±0,001 у.е., $p<0,05$), *Candida* spp. (5,20±0,90 против 0,96±0,02 у.е., $p<0,05$), а также изолятов *Cronobacter* spp., *Bacillus* spp., которые высевались из кишечника только детей с РеА (соответственно 12,1±0,10 и 5,20±0,9 у.е.). У представителей облигатно-анаэробной флоры (*Clostridium* spp., *Bacteroides* spp.), выделенных от детей с РеА, по сравнению со здоровыми, К_{БПО} был также значительно выше (соответственно 9,50±0,80 против 3,30±0,01 у.е., $p<0,05$ и 9,61±0,80 против 6,60±0,02 у.е., $p<0,05$). В то же время, способность к БПО существенно снижалась для штаммов актиномицетов и пропионибактерий от больных детей, по сравнению со здоровыми (соответственно 0,31±0,60 против 2,51±0,01 у.е., $p<0,05$ и 1,41±0,90 против 2,81±0,02 у.е., $p<0,05$).

Таблица 2. Влияние экзометаболитов микросимбионтов толстого кишечника, выделенных у детей обследуемых групп, на уровень провоспалительных и противовоспалительного цитокинов (АЦА)

Цитокины Микроорганизмы	АЦА (пг/мл, %)							
	TNF-α		INF-γ		IL-6		IL-10	
	Здоровые	РеА	Здоровые	РеА	Здоровые	РеА	Здоровые	РеА
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,1±0,2 (44,2%)	3,7±0,2 (51,0%)	45,2±0,62 (86,0%)	23,6±0,4 (32,4%)*	6,4±0,3 (42,0%)	4,0±0,3 (25,0%)*	15,6±0,4 (57,2%)	15,4±0,4 (52,6%)
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,5±0,15 (76,0%)	7,2±0,3 (73,0%)	10,1±0,18 (20,0%)	30,1±0,6 (60,1%)*	1,6±0,12 (9,8%)	8,75±0,25 (54,7%)*	7,7±0,24 (38,3%)	14,7±0,37 (73,0%)*
<i>E. coli</i>	7,2±0,3 (73,0%)	6,8±0,09 (70,0%)	49,2±0,7 (98,1%)	29,4±0,5 (59,0%)*	15,8±0,4 (98,8%)	7,7±0,23 (48,0%)*	13,5±0,34 (67,6%)	11,1±0,28 (40,3%)*
<i>Citrobacter</i> spp.	5,7±0,18 (58,0%)	8,1±0,2 (83,0%)*	27,7±0,5 (55,0%)	49,5±0,7 (98,4%)*	2,6±0,13 (16,2%)	2,0±0,21 (12%)	8,9±0,27 (44,5%)	16,6±0,49 (82,7%)*
<i>Staphylococcus</i> spp.	4,7±0,2 (48,0%)	6,4±0,08 (65,0%)*	7,0±0,26 (14,0%)	47,7±0,4 (95,0%)*	7,3±0,17 (45,2%)	13,1±0,34 (81,5%)*	16,0±0,51 (80,0%)	12,5±0,3 (61,2%)*
<i>Candida</i> spp.	4,4±0,21 (45,0%)	6,1±0,3 (62,0%)*	10,0±0,19 (20,0%)	25,8±0,43 (51,3%)*	5,9±0,2 (37,0%)	5,6 ± 0,29 (35,0%)	11,4±0,2 (56,8%)	9,8±0,19 (49,3%)

Примечание. * Наличие достоверных различий между показателями АЦА у детей обследуемых групп при $p < 0,05$.

Учитывая взаимодействие микробиоты с эффекторными молекулами и клетками иммунной системы с последующим включением сигнальных путей регуляции иммунного гомеостаза [9, 10], мы провели сравнительный анализ способности экзометаболитов микросимбионтов, выделенных от детей обеих групп, изменять концентрацию про- и противовоспалительных цитокинов после контакта *in vitro* с рекомбинантными цитокинами. Результаты исследования АЦА микросимбионтов представлены в табл. 2. Оказалось, что независимо от источника выделения (здоровые, дети с РеА), экзометаболиты бифидобактерий снижали уровень провоспалительных цитокинов (особенно в отношении INF-γ) с большей степенью выраженности для штаммов бифидобактерий, выделенных от здоровых детей. Вместе с тем, у представителей ассоциативной микрофлоры (лактобациллы, стафилококки, цитробактеры и грибы рода *Candida*), изолированных из фекалий детей с артритом, выявлено увеличение значений АЦА для большинства исследуемых провоспалительных цитокинов по сравнению с уровнем АЦА штаммов, выделенных от здоровых детей. Наконец, в отношении IL-10 среди всех исследуемых микроорганизмов различия выявлялись для лактобацилл, цитробактеров (увеличение уровня АЦА для изолятов, выделенных от больных детей) и стафилококков (снижение значений АЦА для штаммов от детей с артритом). Следует отметить, что доминантные анаэробы — бифидобактерии, независимо от источника выделения, наряду со способностью влиять на содержание провоспалительных цитокинов, существенно снижали (в среднем на 78% от исходного уровня цитокина) и уровень IL-10, что характеризует их достаточно высокий иммунорегуляторный потенциал, позволяющий координировать соотношение цитокинов в микроокружении при непосредственном контакте с ними.

Суммируя результаты анализа уровня АЦА экзометаболитов кишечных микросимбионтов, выделенных от детей с РеА, в отношении про- и противовоспалительных цитокинов, отметили существенное изменение выраженности и направленности АЦА, определяющей, наряду с другими факторами, локальный цитокиновый баланс, который регулирует взаимодействие в системе «комменсал-хозяин» [9, 13]. Это дает основание рассматривать выявленные особенности АЦА штаммов микросимбионтов от детей с РеА как маркер наличия данного заболевания.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования позволили оценить особенности состояния кишечного микросимбиоза детей с РеА, которые свидетельствуют о существенном вкладе микробиоты кишечника в развитие указанного вида артрита. Во-первых, выявленные у детей с РеА нарушения кишечного микросимбиоза, которые, по сравнению со здоровыми детьми, встречаются значительно чаще и характеризуются гиперколонизацией кишечного биотопа отдельными представителями УПМ: энтеробактерии, клостридии, бактероиды и грибы рода *Candida*. Не исключено вовлечение в повреждение суставных тканей, обнаруженных в микробиоте толстого кишечника детей с РеА, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Burkholderia glumae*, *Cronobacter* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Candida* spp. с высоким уровнем колонизации, поскольку для них характерен феномен «антигенной мимикрии» в отношении клеток синовиальной оболочки суставов, а также влияние на индукцию и репертуар Тreg с усилением воспалительного процесса [7, 9, 13]. Указанные изменения в составе микробиоты детей с РеА могут приводить к ослаблению контроля хозяина над комменсальной микрофлорой, способствуя развитию аутоиммунной патологии.

Во-вторых, как было отмечено, при формировании РеА установлено ослабление БПО у доминантной микрофлоры — бифидобактерий и, напротив, увеличение уровня БПО у выявленных в достаточно высоком количестве ассоциантов-комменсалов от детей с РеА. Известно, что для УПМ способность к БПО рассматривается как важнейший механизм выживания и проявления их патогенного потенциала [2, 4].

В-третьих, определенное значение в развитии артрита могут иметь выявленные у детей с РеА особенности непосредственного воздействия экзометаболитов кишечных микросимбионтов на уровень цитокинов. Используемый в настоящей работе метод сокультивирования экзометаболитов бактерий и грибов с рекомбинантными цитокинами позволил количественно оценить суммарную способность компонентов, входящих в состав экзометаболитов (пептиды, белки, ферменты, кислоты, полисахариды), изменять концентрацию цитокинов в среде и, вероятно, в окружении дендритных клеток, участвующих в инициальном «сигналинге» регуляции иммунитета [9]. Формирование же определенного цитокинового баланса в кишечнике человека под влиянием микроорганизмов создает соответствующее микроокружение как для кишечной микрофлоры, так и для энтероцитов, выполняющих важнейшую роль в колонизационной резистентности. Выявленная способность экзометаболитов штаммов бифидобактерий, независимо от источника выделения (состояние зубиоза/дисбиоза у здоровых и детей с РеА), изменять в условиях сокультивирования концентрацию цитокинов, оппозитных по регуляции воспаления, свидетельствует о возможности опосредованного влияния бифидобактерий на дендритные клетки и процессы реализации эффекторного звена врожденного и адаптивного иммунитета за счет формирования оптимального цитокинового микроокружения (цитокинового баланса). Установленное в нашей работе значительное увеличение уровня АЦА в отношении как противовоспалительного цитокина IL-10 (для представителей родов *Citrobacter*, *Lactobacillus*), так и провоспалительных цитокинов практически для всех выделенных УПМ подтверждает существенное значение влияния их метаболитов на локальный и системный иммунный гомеостаз [2] и опосредованное участие в патогенезе воспалительных заболеваний суставов.

Таким образом, в соответствии с существующей гипотетической моделью патогенеза спондилоартрита, включающего РеА [7, 15], оказалось, что выявленные в данной работе нарушения кишечного микросимбиоза с гиперколониза-

цией УПМ, обладающих выраженной способностью к БПО и влиянием на уровень цитокинов, могут усиливать их артротогенный потенциал и служить в качестве дополнительных маркеров риска развития артрита у детей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Оренбургской области в рамках научного проекта №16-44-560553 «р_а» и фонда РГНФ — проект № 16-16-56004.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н. Роль бифидобактерий в формировании иммунного гомеостаза человека. Журн. микробиол. 2015, 6: 98-104.
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург, УрО РАН, 2014.
3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Смолягин А.И., Иванова Е.В. Антицитокиновая активность микроорганизмов. Журн. микробиол. 2011, 4: 56-61.
4. Малафеева Э.В., Гульнева М.Ю., Носков С.М., Романов В.А. Формирование биопленок условно патогенными микроорганизмами, выделенными у больных с ревматическими заболеваниями. Клиническая лабораторная диагностика. 2014, 11: 53-55.
5. Насонов Е.Л. Клинические рекомендации. Ревматология. Под ред. Е.Л. Насонова. М., ГЭОТАР-Медиа, 2008.
6. Челпаченко О.Е., Бухарин О.В., Данилова Е.И., Федотова Л.П. Современные представления о роли микробного фактора в развитии воспалительных ревматических заболеваний. Вестник уральской медицинской академической науки. 2015, 3 (54): 73-80.
7. Asquith M., Elewaut D., Lin P. et al. The role of the gut and microbes in the pathogenesis of spondyloarthritis. Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol. 2014, 28 (5): 687-702.
8. Diamanti A.P., Rosado M.M., Laganà B. et al. Microbiota and chronic inflammatory arthritis: an interwoven link. Transl. Med. 2016, 14 (1): 233. doi: 10.1186/s12967-016-0989-3.
9. Maynard C.L., Elson C.O., Robin D. et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. Nature. 2012, 489 (7415): 231-241.
10. Ohland C.L., Jobin C. Microbial activities and intestinal homeostasis: A delicate balance between health and disease. Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. 2015, 1 (1): 28-40.
11. Okuda J., Hayashi N., Tanabe S. et al. Degradation of interleukin 8 by the serine protease MucD of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Chemother. 2011, 17 (6): 782-792.
12. Oleksy A., Banbula A., Bugno M. et al. Proteolysis of interleukin-6 receptor (IL-6R) by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinases (gingipains) inhibits interleukin-6-mediated cell activation. Microb. Pathog. 2002, 32 (4): 173-181.
13. Omenetti S., Pizarro T.T. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome. Front. Immunol. 2015, 6: 639. doi: 10.3389/fimmu.2015.00639.
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. Rashid T., Ebringer A. Autoimmunity in rheumatic diseases is induced by microbial infections via crossreactivity or molecular mimicry. Autoimmune Dis. 2012, 2012: 539282. doi: 10.1155/2012/539282.

Поступила 23.02.16

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

*Е.М.Зайцев, А.В.Поддубиков, М.В.Брицина,
М.Н.Озерецковская, Н.У.Мерцалова, И.Г.Бажанова*

ПРОФИЛИ ЦИТОКИНОВ У МЫШЕЙ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ АКДС-ВАКЦИНОЙ С БЕСКЛЕТОЧНЫМ КОКЛЮШНЫМ КОМПОНЕНТОМ

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

Цель. Изучение цитокинового статуса мышей, иммунизированных вакцинами, содержащими бесклеточный коклюшный компонент. **Материалы и методы.** В работе использованы разработанные в НИИВС им. И.И.Мечникова бесклеточная коклюшная вакцина (БКВ) и адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина (АКБДС-вакцина), содержащие комплекс протективных антигенов коклюшного микроба. Мышей линии F₁ (СВА×С₅₇Bl₆) массой 12 — 14 г иммунизировали внутрибрюшинно 3-кратно с интервалом 7 дней БКВ и АКБДС-вакциной в прививочной дозе 0,5 мл для человека, содержащей 25 мкг коклюшного компонента. В качестве контрольной группы использовали интактных мышей. Уровень цитокинов IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 определяли после каждой иммунизации в иммуноферментном анализе с использованием коммерческих тест-систем фирмы «Cusabio» (Китай). **Результаты.** В динамике иммунного ответа после введения БКВ и АКБДС-вакцины установлено повышение уровня цитокинов IFN-γ, IL-2, IL-5, IL-12 и отсутствие стимуляции продукции IL-4. **Заключение.** Полученные данные указывают на то, что иммунизация мышей БКВ и АКБДС-вакциной приводила к активации продукции цитокинов, характерных для иммунного ответа при коклюшной инфекции и иммунизации цельноклеточными АКДС-вакцинами.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 49—53

Ключевые слова: бесклеточная коклюшная вакцина, адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина с бесклеточным коклюшным компонентом, цитокины

*Е.М.Zaitsev, A.V.Poddubikov, M.V.Britsina,
M.N.Ozeretskovskaya, N.U.Mertsalova, I.G.Bazhanova*

PROFILES OF CYTOKINES IN MICE DURING IMMUNIZATION WITH ADTP-VACCINE WITH ACELLULAR PERTUSSIS COMPONENT

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Study cytokine status in mice immunized with vaccines containing acellular pertussis component. **Materials and methods.** Vaccines developed in Mechnikov RIVS — acellular pertussis vaccine (aPV) and adsorbed pertussis-diphtheria-tetanus vaccine (aDTaP), containing a complex of protective antigens of pertussis microbe — were used in the study. F₁ (CBA×C₅₇Bl₆) line mice weighing 12 — 14 g were immunized intraperitoneally 3 times at an interval of 7 days with aPV and aDTaP at human immunization dose (0.5 ml), containing 25 μg of pertussis component. Intact mice were used as a control group. Levels of IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 cytokines were determined after each immunization in enzyme immunoassay using commercial test-systems from Cusabio (China). **Results:** An increase of levels of IFN-γ, IL-2, IL-5, IL-12 and lack of stimulation of production of IL-4 was established in dynamics of immune response after administration of aPV and aDTaP vaccines. **Conclusion.** The data obtained indicate that immunization of mice with aPV and aDTaP vaccines resulted in activation of production of cytokines characteristic for immune response during pertussis infection and immunization with whole-cellular aDTP-vaccines.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 49—53

Key words: acellular pertussis vaccine, adsorbed pertussis-diphtheria-tetanus vaccine with acellular pertussis component, cytokines

ВВЕДЕНИЕ

Во многих странах мира, несмотря на широкий охват прививками населения, регистрируют подъем заболеваемости коклюшем, в том числе среди привитых детей, подростков и взрослых. Высоким остается уровень скрытой заболеваемости в виде малосимптомных и бессимптомных форм [14]. Цельноклеточная АКДС-вакцина достаточно эффективна, однако относительно высокая реактогенность ограничивает ее использование для проведения ревакцинации детей, подростков и взрослых. Высокая реактогенность цельноклеточной вакцины привела в большинстве развитых стран к переходу на менее реактогенные вакцины, содержащие бесклеточный коклюшный компонент, что позволило значительно повысить охват населения прививками и существенно снизить частоту поствакцинальных осложнений [6]. Однако в ряде стран, перешедших на БКВ, наблюдается рост заболеваемости коклюшем, в том числе среди привитых детей [3]. Есть основания считать, что БКВ менее эффективны, чем цельноклеточная вакцина, и формируют менее напряженный и длительный иммунитет [5, 12, 13]. Важное значение для формирования иммунитета к коклюшу имеет направленность цитокинового ответа. Имеются данные о том, что коклюшная инфекция и вакцинация цельноклеточными коклюшными вакцинами активируют продукцию цитокинов, отличающихся от цитокинов, продуцирующихся при иммунизации БКВ [6, 8, 9]. Создание коклюшных вакцин, сочетающих высокую иммуногенность с низкой реактогенностью, является актуальной задачей. В НИИВС им. И.И. Мечникова разработаны БКВ и АКБДС-вакцина на основе комплекса протективных антигенов коклюшного микроба. По специфической активности и безопасности препараты отвечают требованиям ВОЗ [2]. Изучение влияния БКВ и АКБДС на профили цитокинов имеет важное значение для понимания механизмов формирования иммунитета к коклюшу. Цель настоящей работы — исследование динамики продукции ряда цитокинов при иммунизации БКВ и АКБДС-вакциной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали разработанные в НИИВС им. И.И. Мечникова БКВ и АКБДС-вакцину. Мышей линии F₁ (СВА×С₅₇Bl₆) массой 12 — 14 г иммунизировали внутрибрюшинно 3-кратно с интервалом в 7 дней БКВ и АКБДС-вакциной, в прививочной дозе (0,5 мл) для человека, содержащими 25 мкг коклюшного компонента. В качестве контрольной группы использовали интактных мышей. Забор крови осуществляли под легким «оглушающим наркозом»: смесь двух частей эфира (для наркоза) с одной частью хлороформа (для наркоза). Уровень цитокинов IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 определяли через 2 часа после каждой иммунизации и затем на 7, 14, 21 и 28 сутки после последней иммунизации в иммуноферментном анализе с использованием коммерческих тест-систем фирмы «Cusabio» (Китай) в соответствии с инструкцией по применению. Измерение проводили при длине волны 450 nm на спектрофотометре Thermoscientific.

Мыши линии F₁ (СВА×С₅₇Bl₆) массой 12-14 г были получены из питомника НЦ биомедицинских технологий (филиал «Андреевка»). Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Количественные данные выражали как среднее арифметическое значение (M) со средней ошибкой среднего арифметического (m). Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Excel (Microsoft, США) с применением параметрических методов сравнения при нормальном распределении (t-критерий Стьюдента).

РЕЗУЛЬТАТЫ

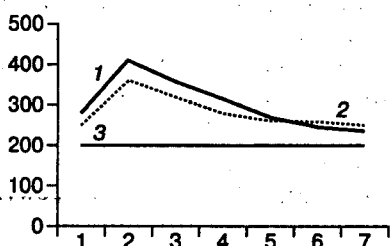
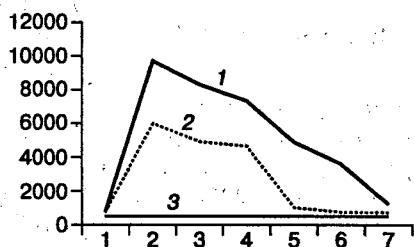
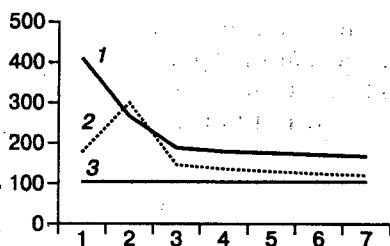
Исследована динамика продукции цитокинов IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IFN- γ у мышей при трехкратной иммунизации АКБДС-вакциной и БКВ. Выявленные изменения концентрации цитокинов выявлены в отношении IL-2, IL-5, IL-12 и IFN- γ .

Динамика продукции IL-2 характеризовалась достижением максимальных значений уже через 2 часа после первой иммунизации с последующим снижением в день второй иммунизации при статистически достоверных отличиях от контрольной группы. На все последующие сроки концентрация IL-2 в сыворотках иммунизированных мышей существенно не отличалась от показателей контрольной группы. У мышей, иммунизированных БКВ, концентрация IL-2 увеличивалась медленнее, достигая максимальных значений в день второй иммунизации с последующим снижением в день третьей иммунизации до уровня контрольной группы. При этом максимальный уровень IL-2 был несколько ниже, чем при иммунизации АКБДС-вакциной (рис., 1-й сверху).

Наиболее выраженными, по сравнению с контрольной группой, были изменения в концентрации IFN- γ . Резкое повышение уровня IFN- γ и достижение максимальных показателей было выявлено через 2 часа после второй иммунизации. Далее наблюдалось постепенное снижение концентрации IFN- γ при достоверных отличиях от контрольной группы до 21 дня после третьей иммунизации АКБДС-вакциной и до 14 дня после третьей иммунизации БКВ (рис., 2-й сверху).

У мышей, иммунизированных АКБДС-вакциной, концентрация IL-5 достигала максимальных значений в первый день после второй иммунизации с постепенным снижением до уровня контрольной группы. При иммунизации БКВ динамика IL-5 имела аналогичный характер (рис., 3-й сверху).

Концентрация IL-12 в сыворотках мышей контрольной группы составляла 70 ± 5 пг/мл. У иммунизированных мышей выраженное нарастание концентрации IL-12 выявлено в день второй иммунизации. Концентрация этого



Динамика IL-2 (рис. 1 сверху), IFN- γ (рис. 2 сверху), IL-5 (рис. 3 сверху).

По оси ординат — содержание цитокинов (пг/мл), по оси абсцисс — время после иммунизации: 1 — через 2 часа после первой, 2 — через 2 часа после второй, 3 — через 2 часа после третьей, 4, 5, 6 и 7 соответственно через 7, 14, 21 и 28 дней после третьей. 1 — АКБДС, 2 — БКВ, 3 — контроль.

интерлейкина у мышей, иммунизированных АКБДС-вакциной и БКВ, составляла 140 ± 8 пг/мл. В день третьей иммунизации уровень IL-12 составлял 110 ± 7 пг/мл, а на все последующие сроки исследования существенно не отличался от показателей контрольной группы.

Показано отсутствие стимуляции продукции цитокина IL-4 на всех этапах иммунизации БКВ и АКБДС-вакциной, поскольку уровень IL-4 у иммунизированных мышей составлял $8 \pm 0,7$ — $14 \pm 0,9$ пг/мл, а в контрольной группе — $10 \pm 0,5$ пг/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что иммунизация мышей БКВ и АКБДС-вакциной приводила к значимому повышению концентрации цитокинов IL-2, IL-5, IL-12, IFN- γ . В целом, динамика уровня этих цитокинов носила аналогичный характер и характеризовалась нарастанием с достижением максимальных значений и последующим снижением до уровня контрольной группы. Вместе с тем, выявлены определенные особенности динамики уровня отдельных цитокинов по срокам нарастания и достижения максимальных значений. Наиболее быстро активировалась продукция IL-2 — достоверно высокий уровень был зарегистрирован уже в первый день после первой иммунизации АКБДС-вакциной. При иммунизации БКВ уровень IL-2 достоверно отличался от контрольной группы в день после первой иммунизации, однако максимальные значения были выявлены в день второй иммунизации. Полученные данные указывают на активацию синтеза IL-2 после первичной антигенной стимуляции. Динамика IL-5, IL-12 и IFN- γ характеризовалась наибольшими показателями в день второй иммунизации, что указывает на стимуляцию синтеза этих цитокинов в результате первой и второй иммунизаций. Третья иммунизация не приводила к дополнительной стимуляции продукции этих цитокинов. Цитокиновый ответ на введение БКВ и АКБДС-вакцину носил аналогичный характер, однако концентрация цитокинов была несколько выше у мышей, иммунизированных АКБДС-вакциной. Это обстоятельство может быть обусловлено дополнительной стимуляцией цитокинового ответа дифтерийным и столбнячным анатоксинами, входящими в состав АКБДС-вакцины.

Таким образом, изучая динамику иммунного ответа мышей на БКВ и АКБДС-вакцину, мы выявили достоверное нарастание уровня цитокинов IFN- γ , IL-2, IL-5 и IL-12 при отсутствии стимуляции продукции IL-4. В формировании защиты от коклюшной инфекции важное значение имеет активация клеточного звена иммунитета, ассоциированная с продукцией определенного набора цитокинов. По литературным данным [6, 8, 9] при коклюшной инфекции и иммунизации цельноклеточными АКДС-вакцинами стимулируется преимущественно продукция цитокинов IFN- γ , IL-2 и IL-12, что обеспечивает формирование оптимального протективного ответа. Напротив, при иммунизации БКВ преимущественно активируется продукция цитокинов IL-4 и IL-5 при отсутствии или низком уровне продукции IFN- γ , IL-2 и IL-12. С этим типом цитокинового ответа связывают менее выраженную, по сравнению с цельноклеточными вакцинами, иммуногенность БКВ [4, 7, 8]. Предполагается, что создание БКВ нового поколения, стимулирующих продукцию набора цитокинов, характерных для коклюшной инфекции, позволит существенно повысить эффективность вакцинопрофилактики коклюша [10, 11]. Учитывая все эти данные, можно предположить, что преобладание при

иммунизации мышей разработанной нами АКБДС-вакциной продукции цитокинов, характерных для коклюшной инфекции, свидетельствует о ее высокой защитной активности на фоне низких токсических и сенсибилизирующих свойств, что было показано нами при проведении доклинических исследований [1, 2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцев Е.М., Брицина М.В., Бажанова И.Г. и др. Доклинические исследования адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины (АКДС-вакцины) с бесклеточным коклюшным компонентом. Журн. микробиол. 2013, 6: 43-49.
2. Захарова Н.С., Брицина М.В., Мерцалова Н.У. и др. Отечественная бесклеточная коклюшная вакцина. Журн. микробиол. 2008, 1: 35-41.
3. Allen A.C., Mills K.H. Improved pertussis vaccines based on adjuvants that induce cell-mediated immunity. Expert Rev. Vaccines. 2014, 13 (10): 1253-1264.
4. Ausiello C.M., Urbani F., la Sala A. et al. Vaccine and antigen — dependent type 1 and 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole — cell or acellular pertussis vaccines. Infect. Immun. 1997, 65 (6): 2168-2174.
5. Brummelman J., Wilk M.M., Han W.G. et al. Roads to the development of improved pertussis vaccines paved by immunology. Pathog. Dis. 2015, 73 (8): ftv067.
6. Higgs R., Higgins S.C., Ross P.J. et al. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. Mucosal Immunol. 2012, 5: 485-500.
7. Mahon B.P., Ryan M.S., Griffin F. et al. Interleukin 12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhance the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. Infect. Immun. 1996, 64 (12): 5295-5301.
8. McQuirk P., Mills K.H. A regulatory role for interleukin 4 in differential inflammatory responses in the lung following infection of mice primed with Th1 or Th2 — inducing pertussis vaccines. Infect. Immunol. 2000, 68 (3): 1383-1390.
9. Ryan M., Gotherfors L., Storsaeter J. et al. *Bordetella pertussis* — specific Th1/Th2 cell generated following respiratory infection or immunization with an acellular vaccine: comparison of the T cell cytokine profiles in infants and mice. Dev. Biol. Stand. 1997, 89: 297-305.
10. Ryan M., Murphy G., Ryan E. et al. Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. Immunology. 1998, 93 (1): 1-10.
11. Ross P.J., Sutton C.E., Higgins S. et al. Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular vaccine. PLoS Pathog. 2013, 9 (4): e1003264.
12. Smallridge W.E., Rolin O.Y., Jacobs N.T. et al. Different effects of whole cell and acellular vaccines on *Bordetella* transmission. J. Infect. Dis. 2014, 209 (15): 1981-1988.
13. Smits K., Pottier G., Smet J. et al. Different T cell memory in preadolescents after whole-cell or acellular pertussis vaccination. Vaccine. 2013, 32 (1): 111-118.
14. Souder E., Long S.S. Pertussis in the era of new strains of *Bordetella pertussis*. Infect. Dis. Clin. North. Am. 2015, 29 (4): 699-713.

Поступила 23.06.16

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

Е.А.Курбатова¹, Э.А.Ахматова¹, Н.К.Ахматова¹, Н.Б.Егорова¹,
Н.Е.Ястребова¹, Е.В.Сухова², Ю.Е.Цветков², Д.В.Яшунский², Н.Э.Нифантьев²

СИНТЕТИЧЕСКИЕ КОНЬЮГИРОВАННЫЕ АНАЛОГИ КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ПНЕВМОКОККА — ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского, Москва

Цель. Оценка способности капсульных полисахаридов (КП) *Streptococcus pneumoniae* серотипов 3 и 14 и их синтетических структурных аналогов, конъюгированных с бычьим сывороточным альбумином (БСА), выявлять антитела в поствакцинальных сыворотках мышей. **Материалы и методы.** Синтезированы олигосахариды, соответствующие одному, полутора и двум повторяющимся звеньям КП *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14, а также скваратным методом получены их конъюгаты с БСА. Содержание лигандов на одну молекулу БСА контролировали с помощью MALDI-TOFF спектрометрии. Иммунные сыворотки получали после двукратно внутривнутрибрюшинного введения мышам гликоконъюгатов, сорбированных на гидроксиде алюминия, или 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины. Определение уровня поствакцинальных антител класса G и его субизотипов проводили в ИФА. **Результаты.** Иммунизация мышей неогликоконъюгатами приводила к образованию преимущественно IgG1, распознающих КП *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14. Показано, что IgG1 у мышей, вакцинированных 13-валентной конъюгированной вакциной, распознавали КП *S. pneumoniae* серотипа 3, но слабо выявляли КП *S. pneumoniae* 14. Все конъюгированные синтетические олигосахариды характеризовались высокой способностью связывать антитела в сыворотке крови мышей, иммунизированных полисахаридной конъюгированной вакциной. Наиболее высокой способностью выявлять IgG1 к КП характеризовались БСА-тетрасахарид *S. pneumoniae* серотипа 3 и БСА-тетрасахарид *S. pneumoniae* серотипа 14. **Заключение.** Синтетические олигосахариды, конъюгированные с белком-носителем БСА, могут быть использованы для разработки диагностических тест-систем, предназначенных для определения уровня антител в поствакцинальных сыворотках привитых.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 54—60

Ключевые слова: капсульный полисахарид, конъюгат, синтетический олигосахарид, антитело, пневмококк

Е.А.Курбатова¹, Е.А.Ахматова¹, Н.К.Ахматова¹, Н.Б.Егорова¹,
Н.Е.Ястребова¹, Е.В.Сухова², Ю.Е.Цветков², Д.В.Яшунский², Н.Э.Нифантьев²

SYNTHETIC CONJUGATED ANALOGUES OF CAPSULE POLYSACCHARIDES OF PNEUMOCOCCUS — AN INSTRUMENT FOR DETECTION OF POST-VACCINATION ANTIBODIES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, ²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow, Russia

Aim. Evaluation of the ability of capsule polysaccharides (CP) of *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 and 14 and their synthetic structure analogues, conjugated with bovine serum albumin (BSA), to detect antibodies in post-vaccination sera of mice. **Materials and methods.** Oligosaccharides corresponding to one, one and a half and two repeating links of serotype 3 and 14 *S. pneumoniae* CP were synthesized, their conjugates with BSA were produced by squarate method as well. Ligand content per BSA molecule was controlled by MALDI-TOF spectrometry. Immune sera were obtained after 2 intraperitoneal administrations to mice of glucoconjugates adsorbed on aluminum hydroxide or 13-valent pneumococcal conjugated vaccine. Determination of levels of post-vaccination class G antibodies and their sub-isotypes was carried out in EIA. **Results.** Immunization of mice with neoglucoconjugates resulted in formation of predominantly IgG1 recognizing serotype 3 and 14 *S. pneumoniae* CP. IgG1 in mice immunized with a 13-valent conjugated vaccine recognized serotype 3 *S. pneumoniae* CP, but detected serotype 14 *S. pneumoniae* CP weakly. All the conjugated synthetic oligosaccharides were

characterized by a high ability to bind antibodies in blood of mice immunized with the polysaccharide conjugated vaccine. BSA-tetrasaccharide of serotype 3 *S. pneumoniae* and BSA-tetrasaccharide of serotype 14 *S. pneumoniae* were characterized by the highest ability to detect IgG1 against CP. *Conclusion.* Synthetic oligosaccharides, conjugated with BSA protein-carrier, may be used to develop diagnostic test-systems for determination of antibodies in post-vaccination sera.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 54—60

Key words: capsule polysaccharide, conjugate, synthetic oligosaccharide, antibody, pneumococcus

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение высоковирулентных и антибиотикорезистентных штаммов пневмококка, легко передающихся воздушно-капельным путем от больных и носителей, определяет значительную роль и перспективность вакцинопрофилактики для предупреждения распространения инфекций, вызываемых *Streptococcus pneumoniae*, снижения их тяжести и смертности.

Эффективная специфическая профилактика пневмококковой инфекции является одним из значимых достижений современной вакцинологии. Несмотря на наличие и широкое использование противопневмококковых вакцин, сконструированных на основе капсульных полисахаридов (КП) *S. pneumoniae* (Pneumovax) и конъюгированных с белком-носителем (Prevenar-7, 10 и 13, Synflorix), показатели заболеваемости и летальности остаются стабильно высокими (до 12%), особенно при инвазивной пневмококковой инфекции [11]. При этом следует помнить, что массовое применение рекомендуемых в настоящее время вакцин требует постоянного мониторинга за возможной сменой этиологически значимых серотипов *S. pneumoniae* и увеличением роли серотипов, не входящих в состав вакцины. В настоящее время существуют коммерческие диагностические ИФА наборы для определения поствакцинальных титров антител к КП *S. pneumoniae* (Anti-S. Pneumococcal vaccine Prevenar-7/PCV-7, Synflorix/PCV-10, Pneumovax (Alpha Diagnostic Int. Inc., USA). Тем не менее, для проведения мониторинга пневмококковой инфекции и оценки сероконверсии после вакцинации необходимо наличие легко воспроизводимых, стандартных и доступных тестов. Это определяет перспективу использования химически чистых препаратов, предпочтительно синтетических, содержащих протективные эпитопы КП пневмококка.

В предыдущих исследованиях были представлены данные, характеризующие высокую серотиповую специфичность конъюгированного дисахарида — повторяющегося звена КП *S. pneumoniae* серотипа 3, а также его способность ингибировать связывание антител в антимицробной сыворотке [4]. Наряду с этим установлено, что при иммунизации мышей конъюгированным гексасахаридом, соответствующим фрагменту цепи КП *S. pneumoniae* серотипа 14, происходило образование антител, взаимодействующих с КП этого серотипа [3]. Конъюгированные олигосахариды защищали мышей от заражения соответствующим серотипом пневмококка [5].

Цель работы — оценка способности капсульных полисахаридов *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14 и их синтетических структурных аналогов, конъюгированных с бычьим сывороточным альбумином, выявлять антитела в поствакцинальных сыворотках мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Олигосахариды, соответствующие одному, полутора и двум повторяющимся звеньям КП *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14, синтезированы в лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН им. Н.Д.Зелинского в соответствии с ранее описанным методом [7]. В результате синтеза получены ди- (1а), три- (2а) и тетрасахарид (3а), аналогичные фрагментам КП *S. pneumoniae* серотипа 3, и тетра- (4а), гекса- (5а) и октасахарид (6а), соответствующие фрагментам КП *S. pneumoniae* сероти-

па 14. Для индукции Т-зависимого иммунного ответа все синтезированные олигосахариды конъюгировали с БСА скваратным методом и получали соответствующие гликоконъюгаты (1b-6b) [9]. Содержание лигандов на одну молекулу БСА контролировали с помощью MALDI-TOFF спектрометрии.

Определение титра поствакцинальных IgG, включая IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 субизотипы, к гликоконъюгатам 1b-6b и к конъюгированной пневмококковой вакцине Превенар-13 в сыворотках крови мышей проводили в ИФА в соответствии с методом [6]. В частности, на дне лунок полистироловых планшет (Biomedicals, Россия) абсорбировали бактериальные КП *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14 или гликоконъюгаты 1b-6b. КП сорбировали на твердой фазе в концентрации 1 мкг/лунка, гликоконъюгаты — 0,4 мкг/лунка. Оптическую плотность (ОП) сыворотки определяли на ИФА-ридере (iMark, Япония) при длине волны 450 нм. ОП₄₅₀ < 0,2 считали точкой отсечения отрицательных результатов.

Бактериальные КП *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14 получали из среды культивирования пневмококка [1]. Присутствие КП в препарате подтверждено методом ЯМР-спектроскопии.

Иммунные сыворотки получали путем двукратного, с двухнедельным интервалом, внутривентрального введения мышам линии BALB/c гликоконъюгатов (1b-6b), сорбированных на гидроксиде алюминия (Sigma, США). Взятие крови проводили на 14 сутки после второй иммунизации мышей гликоконъюгатами 1b-3b в разовой дозе 20 мкг по углеводу и 4b-6b — 10 мкг в расчете на углевод.

Сыворотки к бактериальным КП получали при использовании той же схемы иммунизации конъюгированной пневмококковой вакциной Превенар-13 (Pfizer, США), содержащей КП тринадцати серотипов *S. pneumoniae* (в том числе КП серотипов 3 и 14), конъюгированных с рекомбинантным дифтерийным анатоксином CRM-197 и сорбированных на фосфате алюминия. Разовая иммунизирующая доза Превенара-13 в расчете на КП *S. pneumoniae* для каждого серотипа составляла 1,1 — 2,2 мкг на мышь, что соответствовало 1 — 1/2 дозы, рекомендуемой для человека.

Использовали метод Манна-Уитни для независимых выборок. Статистически достоверными считали различия при $P \leq 0,05$. Программное обеспечение — STATISTICA 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследования проведено изучение способности бактериальных КП *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14 выявлять IgG в сыворотках крови мышей, иммунизированных синтетическими конъюгированными олигосахаридами, соответствующими фрагментам КП двух серотипов пневмококка (рис. 1 — 3). Для этого были получены иммунные сыворотки к гликоконъюгатам (1b-6b), абсорбированным на гидроксиде алюминия. В процессе получения иммунных сывороток определяли оптимальную иммунизирующую дозу и кратность иммунизации мышей. Для этого использовали конъюгированный — дисахарид 1b — повторяющееся звено КП *S. pneumoniae* серотипа 3 в разовых дозах 5; 10 и 20 мкг по углеводу и гексасахарид 5b — полуторное звено КП *S. pneumoniae* серотипа 14 в разовых дозах 2,5; 5 и 10 мкг. Титр антител в сыворотках мышей, иммунизированных гликоконъюгатами, оценивали в ИФА, используя бактериальные КП *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14 соответственно для покрытия дна лунок планшет.

Однократная иммунизация мышей гликоконъюгатами не вызывала образования антител к КП серотипов 3 и 14 даже при использовании наибольшей из иммунизирующих доз — 10 и 20 мкг соответственно (рис. 1). После повторной иммунизации через 14 суток выявлено дозозависимое повышение титров IgG к КП обоих серотипов пневмококка. Наиболее высокий уровень антител к конъюгированному дисахариду *S. pneumoniae* серотипа 3 (1: 1200) и к конъюгированному гексасахариду *S. pneumoniae* серотипа 14 (титр 1:2400) получен при иммунизации наибольшими из испытанных доз — 20 и 10 мкг по углеводу соот-

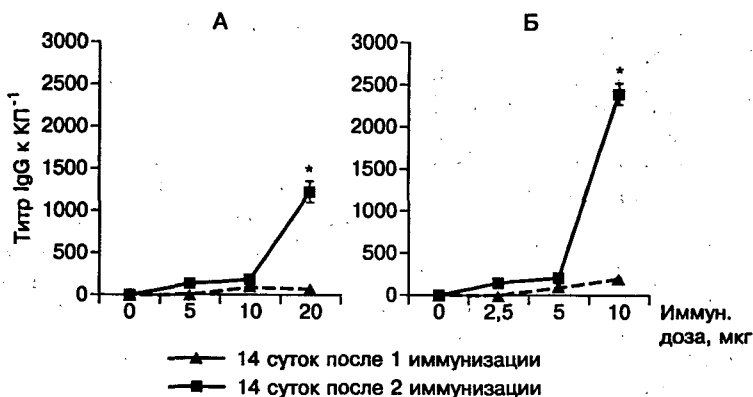


Рис. 1. Титр IgG к конъюгатам 1b и 5b в сыворотках крови мышей в зависимости от иммунизирующей дозы и кратности иммунизации.

В качестве покрывающего дно лунок антигена в ИФА использовали бактериальный КП *S. pneumoniae* серотипов 3 (А) и 14 (Б). Мыши BALB/c, самцы. Иммунизация 2-кратно внутрибрюшинно с интервалом 14 суток, кровь брали на 14 сутки после 1 и 2 иммунизации. Иммунизирующая доза — в расчете на углевод. Достоверность различий между однократной и двукратной иммунизацией * $P < 0,05$.

ответственно. Эти иммунизирующие дозы использовали в дальнейших исследованиях для получения иммунных сывороток к гликоконъюгатам (1b-6b).

Субизотиповой состав IgG оценивали в сыворотках мышей, иммунизированных неогликоконъюгатами 1b и 5b и бактериальным КП *S. pneumoniae* серотипа 3, конъюгированным с CRM, входящим в состав 13-валентной пневмококковой вакцины (рис. 2).

На 14 сутки после двукратной иммунизации мышей конъюгатами 1b и 5b (доза по углеводу 20 и 10 мкг соответственно), сорбированными на гидроксиде алюминия, в сыворотке крови преобладали IgG1 в титрах 1:3200 и 1:6400 соответственно,

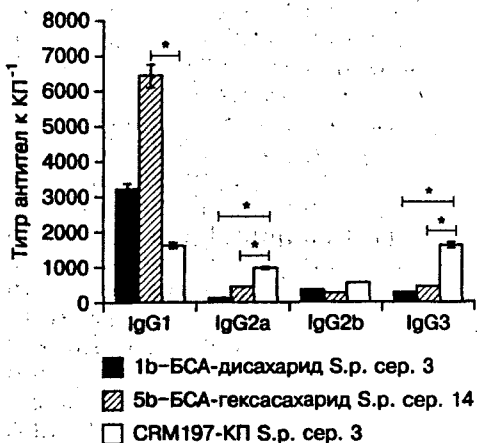


Рис. 2. Субизотипы IgG в сыворотке крови мышей, иммунизированных гликоконъюгатами 1b, 5b и капсульным полисахаридом *S. pneumoniae* серотипа 3, конъюгированным с CRM197.

Сыворотки получены после 2-кратной внутрибрюшинной иммунизации мышей. Достоверность различий в сопряженных группах * $P < 0,05$.

другие субизотипы определяли в титре 1:100 — 1:400. Иммунизация бактериальным КП-CRM197 *S. pneumoniae* серотипа 3 приводила к образованию более широкого спектра субизотипов (IgG1, IgG2a и IgG3). При этом уровень IgG1 в ответ на введение КП-CRM197 хотя и был высоким (1:1600), но оказался существенно ниже, чем при иммунизации конъюгатом 5b (1:6400), а титр IgG2a и IgG3 превышал значения, полученные при иммунизации конъюгатами 1b и 5b ($P < 0,05$). Образование высокого уровня IgG1 при иммунизации всеми исследованными препаратами явилось основанием для определения в дальнейшем исследованиях только этого субизотипа.

При использовании выбранной схемы иммунизации и оптимальных доз неогликоконъюгатов получены мышинные сыворотки к конъюгированным олигосахаридам с различной длиной цепи, относящиеся к КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (дисахарид-BCA 1b, три-

сахарид-БСА 2b, тетрасахарид-БСА 3b) и *S. pneumoniae* серотипа 14 (тетрасахарид-БСА 4b, гексахарид-БСА 5b, октасахарид-БСА 6b), соответствующие одному, полтора и двум повторяющимся звеньям КП соответственно.

Сыворотки к неогликоконъюгатам 1b-6b исследовали в ИФА на содержание IgG1 при иммобилизации на твердой фазе КП соответствующего серотипа пневмококка (рис. 3).

КП *S. pneumoniae* серотипа 3, сорбированный на твердой фазе, в наиболее высоком титре выявлял IgG1 в сыворотках, полученных к конъюгированному тетрасахариду 3b, что существенно отличалось от содержания антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных конъюгированным дисахаридом 1b ($P < 0,05$). При использовании в качестве покрывающего лунки антигена КП *S. pneumoniae* серотипа 14 самый высокий титр антител определяли в сыворотках крови мышей, иммунизированных конъюгированным октасахаридом 6b, который существенно превышал титр антител в сыворотках мышей, иммунизированных другими гликоконъюгатами 1b-4b независимо от их серотипа ($P < 0,05$). Можно предположить, что длина цепи синтетических олигосахаридов в значительной степени определяет их иммуногенность.

Основной задачей настоящего исследования являлась оценка способности неогликоконъюгатов выявлять антитела к КП в ИФА после иммунизации бактериальными КП, входящими в состав коммерческих пневмококковых вакцин. Для этого на дне лунок полистироловых планшет сорбировали гликоконъюгаты (1b-6b), а в качестве референс-препарата использовали КП соответствующего серотипа пневмококка. Титр антител определяли в сыворотках мышей, иммунизированных коммерческой 13-валентной пневмококковой вакциной (рис. 4).

Неогликоконъюгаты обладали высокой способностью выявлять IgG1 к КП в сыворотке крови мышей, иммунизированных 13-валентной пневмококковой вакциной. Самый высокий титр антител в отношении *S. pneumoniae* серотипа 3 получен при использовании в качестве покрывающих лунки антигенов конъюгата 3b с тетрасахаридом (1:12800). В отношении *S. pneumoniae* серотипа 14 титры антител были ниже, хотя наиболее высокий уровень IgG1 выявлял гликоконъюгат 4b с тетрасахаридом (1:3200). Важно отметить, что КП в этом случае выявлял антитела к пневмококковой вакцине в низком титре (1:200). Таким образом, наиболее высокой способностью

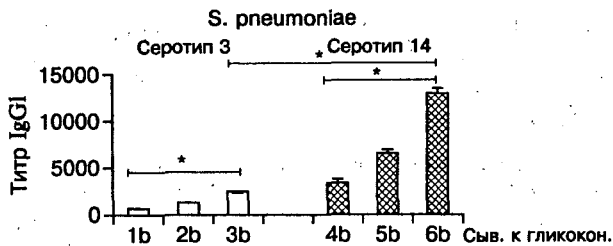


Рис. 3. IgG1, выявленные к капсульному полисахариду в сыворотках крови мышей, иммунизированных гликоконъюгатами (1b-6b).

Достоверность различий в сопряженных группах * $P < 0,05$.

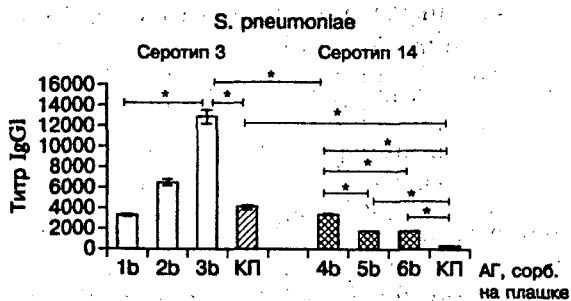


Рис. 4. IgG1 в сыворотках крови мышей, иммунизированных конъюгированной 13-валентной пневмококковой вакциной, выявленные с помощью неогликоконъюгатов и капсульных полисахаридов в ИФА.

В качестве покрывающих лунки антигенов в ИФА использованы неогликоконъюгаты 1b-3b *S. pneumoniae* серотипа 3 и 4b-6b *S. pneumoniae* серотипа 14, в качестве референс-препаратов — капсульные полисахариды соответствующих серотипов пневмококка. Сыворотка к 13-валентной пневмококковой вакцине получена на 14 сутки после 2-кратной внутрибрюшинной иммунизации мышей дозой 1,1 — 2,2 мкг/мышь КП каждого серотипа. Достоверность различий в сопряженных группах * $P < 0,05$.

выявлять IgG1 к КП *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14 обладали конъюгаты 3b и 4b, соответствующие тетрасахаридному фрагменту КП *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследована способность КП и конъюгатов БСА с синтетическими олигосахаридами, соответствующих различным фрагментам КП *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14, связывать антитела соответствующей специфичности в поствакцинальных сыворотках мышей. Для получения иммунных сывороток мышам вводили гликоконъюгаты, сорбированные на гидроксиде алюминия, что приводило к образованию преимущественно антител субизотипа G1, тогда как введение конъюгированной 13-валентной пневмококковой вакцины, сорбированной на фосфате алюминия, наряду с образованием IgG1 стимулировало выработку IgG2a и IgG3. Известно, что иммунный ответ на антигены, сорбированные на солях алюминия, реализуется главным образом по Th2 пути с выработкой соответствующих цитокинов и доминирующим образованием IgG1 [13].

КП *S. pneumoniae* серотипов 3 и 14, иммобилизованные на твердой фазе в ИФА, обладали способностью связывать антитела к КП. Независимо от серотипа пневмококка, увеличение длины олигосахарида в конъюгате с БСА, использованном для иммунизации мышей, приводило к увеличению уровня IgG1, обнаруживаемых в сыворотках с использованием КП, абсорбированного на дне лунок в ИФА. Ранее было показано, что с увеличением длины цепи олигосахаридов, соответствующих фрагментам КП *S. pneumoniae* серотипа 14, иммуногенность гликоконъюгатов возрастает [2, 12].

В настоящем исследовании впервые продемонстрирована способность неогликоконъюгатов выявлять в ИФА антитела в сыворотках мышей, иммунизированных пневмококковой вакциной Превенар-13, которую в настоящее время широко используют для профилактики пневмококковой инфекции. После вакцинации мышей 13-валентной конъюгированной вакциной происходило образование антител к КП, которые мы определяли в отношении серотипов 3 и 14, входящих в ее состав. Способность исследованных неогликоконъюгатов, иммобилизованных на твердой фазе, связывать IgG1 в зависимости от исследованного серотипа пневмококка, различалась. С увеличением длины цепи конъюгированных синтетических олигосахаридов *S. pneumoniae* серотипа 3, сорбированных на планшетах, антигенраспознающая способность антител к КП увеличивалась и была наибольшей при сорбции на планшете конъюгированного тетрасахарида 3b. Напротив, при использовании неогликоконъюгатов, соответствующих *S. pneumoniae* серотипа 14, наибольший уровень антител к КП определяли при иммобилизации на планшете конъюгированного тетрасахарида 4b, который снижался при иммобилизации на твердой фазе конъюгированного октасахарида 6b, содержащего в своем составе два тетрасахаридных повторяющихся звена. Эти различия подтвердились и при использовании в качестве покрывающих лунки антигенов высокомолекулярных КП. Если КП *S. pneumoniae* серотипа 3 выявлял IgG1 в сыворотке крови мышей, иммунизированных полисахаридной конъюгированной вакциной, примерно также, как БСА-трисахарид, но меньше, чем БСА-тетрасахарид, то КП *S. pneumoniae* 14 выявлял IgG1 в этой же сыворотке лишь в титре 1:200. Использование КП *S. pneumoniae* серотипа 14 в ИФА как покрывающего лунки антигена может дать ложноотрицательный результат при определении антител G1 субизотипа в сыворотках людей, вакцинированных пневмококковыми вакцинами. Возможно, такими свойствами обладают КП и ряда других серотипов пневмококка.

Такие результаты, демонстрирующие меньшую способность КП *S. pneumoniae* серотипа 14 выявлять IgG1 к КП в поствакцинальных сыворотках мышей, могут быть связаны с методом его получения и очистки, а также с особенностями физико-химической структуры КП. Известно, что капсульные полисахариды *S. pneumoniae* являются нецвиттерионовыми, то есть они имеют только положительно заряженные группы, за исключением КП *S. pneumoniae* серотипа 1, име-

ющего отрицательно заряженные группы. Капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 14 отличается от других серотипов, так как хотя и относится к нецвиттерионовым полисахаридам, но имеет нейтральный заряд [8].

Использование конъюгированных олигосахаридов в качестве покрывающих лунки антигенов дает возможность определить титр антител в тех случаях, когда использование бактериальных КП в ИФА дает сомнительный результат. Синтетические олигосахариды, конъюгированные с белком-носителем БСА, могут быть успешно использованы для разработки диагностических тест-систем для определения уровня антител в поствакцинальных сыворотках привитых, а также применяться в качестве покрывающих антигенов альтернативно природным и синтетическим КП [10], биотинилированным гликоконъюгатам [Курбатова Е.А. и др., 2016] и другим биомолекулярным системам [Ananikov V.P. et al., 2016].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант 14-50-00126).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ванеева Н.П., Ястребова Н.Е. Специфический иммунный ответ к отдельным капсульным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae* у здоровых доноров крови и лиц, иммунизированных пневмококковыми вакцинами. Журн. микробиол. 2015, 5: 20-26.
2. Генинг М.Л., Курбатова Е.А., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э. Разработка подходов к созданию углеводной конъюгированной вакцины третьего поколения против *Streptococcus pneumoniae*: поиск оптимальных олигосахаридных лигандов. Успехи химии. 2015, 8: 1100-1113.
3. Курбатова Е.А., Воробьев Д.С., Егорова Н.Б. и др. Иммуногенная активность конъюгата синтетического гексасахариды — родственного фрагменту цепи капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 14. Журн. микробиол. 2013, 6: 56-63.
4. Курбатова Е.А., Ахматова Н.К., Егорова Н.Б. и др. Эпитопная специфичность синтетического дисахариды, повторяющегося звена капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3. Журн. микробиол. 2015, 3: 46-53.
5. Курбатова Е.А., Воробьев Д.С., Ахматов Э.А. и др. Протективная активность гликоконъюгата на основе синтетического гексасахариды — родственного фрагменту цепи капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 14. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014, 157 (5): 630-633.
6. Курбатова Е.А., Воробьев Д.С., Семенова И.Б. и др. Разработка подходов к созданию экспериментальной тест-системы для оценки антигенной активности синтетических олигосахаридных лигандов, родственных фрагментам цепи капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* типа 14. Биохимия. 2013, 7: 1046-1052.
7. Сухова Е.В., Яшунский Д.В., Цветков Ю.Е. и др. Синтез олигосахаридных фрагментов капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* тип 14 и их неогликоконъюгатов с бычьим сывороточным альбумином. Известия АН. Серия химическая. 2014, 2: 511-521.
8. Avcı F.Y., Li X., Tsuji M., Kasper D.L. Carbohydrates and T cells: A sweet twosome. Semin Immunol. 2013, 25 (2): 146-151.
9. Karelin A.A., Tsvetkov Y.E., Paulovicova L. et al. Synthesis of a heptasaccharide fragment of the mannan from *Candida guilliermondii* cell wall and its conjugate with BSA. Carbohydr. Res. 2009, 344: 29-35.
10. Kochetkov N.K., Nifant'ev N.E., Backinowsky L.V. Synthesis of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 14. Tetrahedron. 1987, 43: 3109-3121.
11. Ludwig E., Bonnani P., Rohde G., Sayiner A. et al. The remaining challenges of pneumococcal disease in adults. Eur. Respir. Rev. 2012, 21: 177-187.
12. Safari D., Dekker H.A.T., Joosten A.F. Identification of the smallest structure capable of evoking opsonophagocytic antibodies against *S. pneumoniae* type 14. Infect. Immun. 2008, 76: 4615-4623.
13. Valiante N.M., O'Hagan D.T., Ulmer J.B. Innate immunity and biodefence vaccines. Cellular Microbiology. 2003, 5 (11): 755-760.

Поступила 10.05.16

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

*Е.А.Хромова, И.А.Семочкин, Э.А.Ахматова, В.Н.Столпникова,
С.А.Сходова, Е.В.Сорокина, Н.К.Ахматова, М.П.Костинов*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА: ВЛИЯНИЕ НА СУБПОПУЛЯЦИОННУЮ СТРУКТУРУ ЛИМФОЦИТОВ

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

Цель. Исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов у здоровых лиц под воздействием различных вакцин против гриппа в системе *in vitro*. *Материалы и методы.* Проводили оценку иммунофенотипических особенностей мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, активированных *in vitro* иммуноаdjувантными и безадjувантными вакцинами против гриппа у здоровых лиц с использованием метода проточной цитометрии. *Результаты.* Вакцина Гриппол плюс оказывала более выраженное стимулирующее действие по сравнению с субъединичной и сплит-вакцинами на NK-клетки, клетки с маркером ранней активации CD45/CD25, индуцировала численность естественных регуляторных клеток (CD4/CD25/Foxp3), нарастание количества В-клеток и уменьшала число клеточных типов с маркером апоптоза CD45/CD95. *Заключение.* Иммуноаdjувантная вакцина Гриппол плюс индуцировала формирование эффекторов как врожденного, так и приобретенного иммунитета и обладала наиболее мощным потенциалом в отношении активации различных типов иммунокомпетентных клеток по сравнению с безадjувантными вакцинами.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 61–65

Ключевые слова: иммуноаdjувантные и безадjувантные вакцины против гриппа, субпопуляционная структура лимфоцитов

*E.A.Chromova, I.A.Semochkin, E.A.Akhmatova, V.N.Stolpnikova,
S.A.Skhodova, E.V.Sorokina, N.K.Akhmatova, M.P.Kostinov*

COMPARATIVE ACTIVITY OF INFLUENZA VACCINES: EFFECT ON LYMPHOCYTE SUBPOPULATION STRUCTURE

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Study subpopulation structure of lymphocytes in healthy individuals under the effect of various influenza vaccines in an *in vitro* system. *Materials and methods.* Evaluation of immunophenotype features of PBMCs, activated *in vitro* by immune-adjuvanted and unadjuvanted vaccines against influenza in healthy individuals, was carried out by using flow cytometry method. *Results.* Grippol plus vaccine caused a more pronounced stimulating effect compared with subunit and split-vaccines on NK-cells, cells with markers of early activation CD45/CD25, induced the quantity of natural regulatory cells (CD4/CD25/Foxp3), increase of the number of B-cells and reduced the amount of cell types with apoptosis marker CD45/CD95. *Conclusion.* Immune-adjuvanted vaccine Grippol plus induced formation of effectors of both innate and adaptive immunity and possessed the most powerful potential regarding activation of various types of immune-competent cells compared with unadjuvanted vaccines.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 61–65

Key words: immune-adjuvanted and unadjuvanted vaccines against influenza, lymphocyte subpopulation structure

ВВЕДЕНИЕ

По своей социальной значимости грипп находится на первом месте среди инфекционных болезней человека. Заболеваемость гриппом и острыми респираторными инфекциями (ОРИ) превышает суммарный показатель по всем

остальным инфекциям. Единственным способом эффективного ограничения распространения гриппа и уменьшения тяжести его последствий является широкий охват вакцинацией групп риска населения — детей раннего возраста, пожилых людей и беременных [9]. На сегодняшний день существует более десятка разновидностей российских и зарубежных вакцин против гриппа как живых, так и инактивированных. Наибольшее применение, в силу своей высокой эффективности и малой реактогенности, получили инактивированные вакцины против гриппа, содержащие фрагменты вируса гриппа, а также иммуномодуляторы. Данные препараты хорошо зарекомендовали себя, т.к. имеют минимальное количество противопоказаний (в основном это аллергические реакции на отдельные их компоненты), и их применение возможно с 6-месячного возраста, в т.ч. и у беременных женщин. В настоящее время отсутствует информация о сравнительной активности адьювантных и безадьювантных вакцин и их влиянии на врожденные и приобретенные эффекторы иммунной системы на молекулярно-клеточном уровне.

Цель статьи — исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов у здоровых лиц под воздействием иммуноадьювантных и безадьювантных вакцин против гриппа в системе *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 16 здоровых женщин репродуктивного возраста (18 — 50 лет), у которых исследовали образцы венозной крови. Проводили оценку иммунофенотипических особенностей мононуклеарных лейкоцитов периферической крови (МЛПК), активированных *in vitro* иммуноадьювантными и безадьювантными вакцинами против гриппа. МЛПК выделяли с помощью одноступенчатого градиента плотности фиколл-урографина по методу [5] путем центрифугирования. Лейкомассу разводили средой 199 в 2 раза (ПанЭко, Россия), содержащей 25 ЕД/мл гепарина (Sigma), затем наслаивали на градиент плотности фиколл-урографина плотностью 1,077 г/см³ (Pharmacia) с последующим центрифугированием при 400 г 40 мин. МЛПК, образовавшие интерфазное кольцо, собирали и трехкратно отмывали в среде 199. После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 250 г.

Клетки (10⁶ кл/мл) инкубировали в СО₂ инкубаторе в течение 96 часов в присутствии различных вакцин (10 мкл/мл) против гриппа. Исследовали активность следующих вакцин; Инфлювак (субъединичная), Ваксигрип и Ультрикс (сплит-вакцины), Гриппол плюс (иммуноадьювантная).

Исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови проводили методом проточной цитометрии на приборе FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием FITC- и PE-меченных МАТ к CD45/CD3, CD3/CD4, CD3/CD8, CD16/56, CD3/CD16/56, CD45/CD20, CD45/HLA-DR, CD45/CD25, CD4/CD25/Foxp3, CD45/CD95. Изменение данных показателей после инкубации с различными вакцинами соотносили с контролем после инкубации без присутствия вакцины.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение изменения субпопуляций МЛПК у здоровых женщин детородного возраста показало отсутствие каких-либо статистически значимых различий между образцами, культивируемыми с различными видами вакцин, и

Влияние адьювантной и безадьювантных вакцин на субпопуляционную структуру лимфоцитов в культуре МЛПК у здоровых женщин

Показатель	Содержание лимфоцитов, % (M±σ)					Различия между группами
	Контроль	Инфлювак	Гриппол плюс	Ваксигрип	Ультрикс	
CD45/CD3	73,55±4,08	68,99±2,05	64,07±6,06	72,49±2,66	68,23±2,67	P _{1и2-5} >0,05
CD3/CD4	45,54±2,15	43,88±3,52	42,57±3,84	46,44±4,03	41,10±2,85	P _{1и2-5} >0,05
CD3/CD8	19,18±1,69	18,16±1,58	18,99±1,62	20,92±1,33	18,09±2,02	P _{1и2-5} >0,05
CD16/56	4,34±0,61	12,38±0,69*	14,54±0,62*	13,36±0,81*	10,70±0,68*	P _{3и1,2,4,5} <0,05
CD3/CD16/56	2,05±0,76	4,00±0,58*	4,34±0,17*	4,64±0,66*	4,05±0,34*	P _{2,3,4,5 и 1} <0,05
CD45/CD20	6,77±0,56	16,69±1,93*	10,49±1,79*	8,48±1,31	9,14±1,35	P _{2и1,3-5} <0,05; P _{3и1,4,5} <0,05
CD45/HLA-DR	14,86±0,27	20,03±1,63*	31,26±1,14*	27,90±2,58*	30,05±2,80*	P _{2и3-5} <0,05
CD45/CD25	3,23±0,42	6,88±0,49*	9,19±0,59*	6,63±0,46*	6,64±0,63*	P _{2и1,5} <0,05; P _{3и1,2,4,5} <0,05
CD4/CD25/Foxp3	1,48±0,54	1,69±0,53	2,53±0,73*	1,99±0,59	1,86±0,57	P _{3и1} <0,05
CD4/CD8	2,71±0,33	2,33±0,29	2,26±0,28	2,7±0,35	1,92±0,37	P _{1и2-5} >0,05
CD45/CD95	6,17±0,64	7,13±0,63	5,12±0,28*	6,24±0,42	5,98±0,67	P _{3и1,2,5} <0,05;

Примечание. * p<0,05 — достоверность различий с контрольной группой (Mann-Whitney U test).

контрольным образцом (без вакцины), в отношении общего пула Т-лимфоцитов с фенотипом CD45/CD3, Т-хелперов (CD3/CD4) и цитотоксических (CD3/CD8) лимфоцитов (табл.).

Однако было выявлено нарастание уровня количества естественных киллерных клеток (NK-клетки) с маркерами CD16/56 под воздействием вакцин Инфлювак (в 2,8 раза), Гриппол плюс (в 3,3 раза), Ваксигрип (в 3 раза) и Ультрикс (в 2,4 раза). Следует отметить, что в нашем исследовании более выраженное иммуностимулирующее действие на МЛПК оказывала иммуноадьювантная вакцина Гриппол плюс. NK-клетки относятся к ключевым эффекторам врожденного иммунитета, функцией которых является лизис опухолевых и инфицированных вирусами клеток [7] и регуляция врожденного и адаптивного иммунных ответов [4].

Также наблюдалось нарастание численности естественных киллерных Т-лимфоцитов (NKT), экспрессирующих молекулы CD3/CD16/56, примерно в 2 раза в образцах со всеми вакцинами: Инфлювак (в 2 раза), Гриппол плюс (в 2,1 раза), Ваксигрип (в 2,26 раза), Ультрикс (в 2 раза).

Что же касается клеток-антителопродуцентов В-лимфоцитов с фенотипом CD45/CD20, статистически значимое увеличение было выявлено под воздействием вакцины Инфлювак (увеличение в 2,5 раза), Гриппол плюс (увеличение в 1,5 раза).

Также было отмечено увеличение содержания клеток, экспрессирующих маркеры ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации, под влиянием всех исследуемых вакцин. При этом наиболее существенные изменения наблюдались в образце с иммуноадьювантной вакциной Гриппол плюс. Она повышала количество клеток с экспрессией маркера CD45/CD25 в 2,8 раза по сравнению с контролем, активность безадьювантных вакцин была ниже — Инфлювак увеличивал число клеток с данным маркером в 2,1 раза, Ваксигрип и Ультрикс — в 2 раза.

В отношении маркера CD45/HLA-DR наблюдалась следующая картина: Гриппол плюс повышал численность клеток в 2,1 раза, Инфлювак — в 1,3 раза, Ваксигрип — в 1,9 раза, Ультрикс — в 2 раза.

Одной из наиболее изученных популяций являются так называемые естественные регуляторные клетки тимусного происхождения (nTreg) с поверхностным фенотипом CD4+CD25+ и конститутивной экспрессией транскрипционного фактора Foxp3 (forkheadboxp3), ответственного за их регуляторную активность. Примечательно, что в нашем исследовании мы выявили увеличение клеток, экспрессирующих данный маркер, только в одном образце с иммуноадьювантной вакциной Гриппол плюс (увеличение в 1,7 раза).

Относительно маркера апоптоза CD45/CD95 мы выявили увеличение клеток в образце с вакциной Инфлювак (в 1,1 раза), в образцах с вакцинами Ваксигрип, Ультрикс показатели были идентичны с данными контроля, а в образце с вакциной Гриппол плюс мы обнаружили снижение количества клеток в 1,2 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияния различных вакцин против гриппа на субпопуляционную структуру лимфоцитов выявила следующее. Вакцина Гриппол плюс имела более выраженное стимулирующее действие по сравнению с субъединичной и сплит-вакцинами на НК-клетки, клетки с маркером ранней активации CD45/CD25, индуцировала численность естественных регуляторных клеток (CD4/CD25/Foxp3), нарастание количества В-клеток и уменьшала число клеточных типов с маркером апоптоза CD45/CD95. То есть иммуноадьювантная вакцина Гриппол плюс индуцировала формирование эффекторов как врожденного, так и приобретенного иммунитета. При взаимодействии с моноклеарами периферической крови человека полиоксидоний существенно повышает цитотоксичность НК-клеток по отношению к клеткам-мишеням. Этот эффект наблюдался практически у всех исследованных доноров, причем повышающий эффект особенно выражен у индивидуумов, у которых активность НК-клеток находилась на нижней границе нормы или была понижена [2].

Нарастание численности T-regs, возможно, можно объяснить иммунорегулирующим влиянием вакцины, содержащей адьювант полиоксидоний. Иммунорегуляторная функция nTreg реализуется как посредством секреции цитокинов, таких как TGF-β и ИЛ-10, так и контактного взаимодействия с эффекторными T-лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками [3].

Стимуляция субъединичной вакциной Инфлювак увеличивала количество клеток с маркером апоптоза CD45/CD95 и лучше всего стимулировала рост В-клеток. Экспрессия молекулы CD95 указывает на готовность к апоптозу и появляется чаще на клетках бластного ряда. Именно с этим явлением и связывают низкий уровень порога чувствительности пролиферирующих клеток к апоптозу под воздействием различных агентов у здоровых лиц [1]. А в отношении других популяций клеток Инфлювак в меньшей степени стимулировал нарастание числа иммунокомпетентных клеток. Известно, что в отсутствие адьюванта иногда может сформироваться слабый иммунный ответ, а при низкой концентрации антигена наивные T-лимфоциты могут стать толерогенными [8].

В отношении естественных киллерных T-лимфоцитов (НКТ) с маркером CD3/CD16/56 все вакцины имели одинаковое стимулирующее действие, увеличивая численность клеток примерно в 2 раза. НКТ, являясь фенотипически неоднородной популяцией клеток, дублируют функции НК и являются свя-

зующим звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом, однако их роль в настоящее время полностью не изучена [6].

Что же касается клеток с экспрессией маркера поздней активации CD45/HLA-DR, действие иммуноадьювантной вакцины и сплит-вакцин имело схожие результаты, увеличивая численность клеток примерно в 2 раза. Несколько хуже был результат с субъединичной вакциной Инфлювак (увеличение 1,3 раза). Данный маркер является также ключевой молекулой антигенной презентации, экспрессия его может свидетельствовать об активации клеточного звена и возможности представления антигенов (АГ), входящих в состав вакцины, антиген-представляющими клетками. Известно, с сохранением нативной структуры АГ и антигенной специфичности полиоксидоний осуществляет прочное связывание с АГ различной природы, обеспечивая физическую презентацию АГ антигенпредставляющими клетками [5]. Таким образом, резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что наиболее мощным потенциалом в отношении активации различных типов иммунокомпетентных клеток обладает иммуноадьювантная вакцина Гриппол плюс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахматова Н.К. Роль апоптоза лимфоцитов периферической крови в механизмах развития геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Дисс. к.м.н., Уфа, 2003.
2. Иванова А.С., Пучкова Н.Г., Некрасов А.В. и др. Механизмы адьювантных эффектов полиоксидония. Иммунология гемопоза. 2015, 13 (2): 30-92.
3. Казимирко Н.К., Акимова Е.Е., Завацкий В.Ю., Поляков А.С., Татаренко Д.П. Иммунология физиологической беременности. Молодой ученый. 2014, 3 (6): 132-137.
4. Biron C.A., Nguyen K. B., Pien G. C. et al. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu. Rev. Immunol. 1999, 17: 189-220.
5. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968, 267: 95-99.
6. De Martino M., Rossi M.E., Azzari C. et al. Viral load and cd69 molecule expression on freshly isolated and cultured mitogen-stimulated lymphocytes of children with perinatal hiv-1 infection. Clin. Exp. Immunol. 1999, 117 (3): 513-516.
7. French A. R., Yokoyama W. M. Natural killer cells and viral infections. Curr. Opin. Immunol. 2003, 15: 45-51.
8. Schettini J., Mukherjee P. Physiological role of plasmacytoid dendritic cells and their potential use in cancer immunity. Clin Dev. Immunol. 2008; 2008:106321. doi: 10.1155/2008/106321.
9. Siston A.M. et al. Pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus illness among pregnant women in the United States. JAMA. 2010, 303 (15): 1517-1525.

Поступила 27.04.16

Контактная информация: Хромова Екатерина Александровна,
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

В.Н.Царев, М.С.Подпорин, Е.В.Ипполитов, Г.А.Автандилов, Т.В.Царева

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭНДОДОНТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ФОРМ ПУЛЬПИТА И ПЕРИОДОНТИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОАКТИВИРУЕМОЙ ДЕЗИНФЕКЦИИ И УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ОБРАБОТКИ

Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова

Цель. Лабораторное обоснование применения комплексного воздействия ультразвуковой обработки и фотоактивируемой дезинфекции в экспериментах *in vitro* с использованием штаммов анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов, выделенных у пациентов с хроническими формами пульпита и периодонтита. *Материалы и методы.* Микробиологическое изучение корневых каналов проводили с помощью бактериологического метода (2 вида облигатно-анаэробных бактерий и 2 — микроаэрофильных стрептококков). Оценку влияния ультразвуковой обработки в комплексе с системой фотоактивируемой дезинфекции на микрофлору корневого канала проводили с использованием биореактора. Исследование биопленок системы корневых каналов зуба у больных хроническими формами пульпита (52 человека) и периодонтита (16 человек) проведены с использованием сканирующей электронной микроскопии. *Результаты.* Установлено наличие обильной микробной биопленки в устьях дентинных канальцев и obturation дентинных канальцев в отдельных случаях. В экспериментальной части исследования описаны особенности формирования кривых роста бактериальных популяций оральной микрофлоры (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*) в результате комплексного воздействия фотодинамической активации и ультразвука по сравнению с контролем. *Заключение.* Полученные данные позволяют заключить, что комплексное воздействие существенно угнетает рост микробных популяций оральных бактерий.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 66—73

Ключевые слова: хронический пульпит, корневые каналы, микробная биопленка, эндодонтическое лечение, ультразвуковая ирригация, фотодинамическая терапия, биореактор, антимикробная активность *in vitro*

V.N.Tsarev, M.S.Podporin, E.V.Ippolotov, G.A.Avtandilov, T.V.Tsareva

EXPERIMENTAL RATIONALE OF ENDODONTIC THERAPY OF CHRONIC FORMS OF PULPITIS AND PERIODONTITIS USING PHOTO-ACTIVATED DISINFECTION AND ULTRASOUND TREATMENT

Evdokimov Moscow State Medical-Stomatologic University, Russia

Aim. Laboratory rationale of application of a complex effect of ultrasound treatment and photo-activated disinfection in experiments *in vitro* using strains of anaerobic and microaerophilic microorganisms isolated from patients with chronic forms of pulpitis and periodontitis. *Materials and methods.* Microbiologic study of root canal was carried out using a bacteriologic method (2 species of obligatory-anaerobic and 2 — microaerophilic streptococci). Evaluation of the effect of ultrasound treatment in a complex with a system of photo-activated disinfection on microflora of root canal was carried out using a bioreactor. Study of biofilms of the root canal system of a tooth in patients with chronic forms of pulpitis (52 individuals) and periodontitis (16 individuals) were carried out using scanning electron microscopy. *Results.* The presence of an ample microbial biofilm in the ostiums of dentinal canaliculi and obturation of dentinal canaliculi in certain cases was established. Features of formation of growth curves for bacterial populations of oral microflora (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*) were described in the experimental part of the study as a result of a complex effect of photody-

dynamic activation and ultrasound compared with control lacking those. *Conclusion.* The data obtained allow to conclude that complex effect significantly suppresses the growth or microbial populations of oral bacteria.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 66—73

Key words: chronic pulpitis, root channels, microbial biofilm, endodontic therapy, ultrasound irrigation, photodynamic therapy, bioreactor, antimicrobial activity *in vitro*

ВВЕДЕНИЕ

В связи со стремительно развивающимися технологиями аэробного и анаэробного культивирования бактерий исследователями высказывается единодушное мнение, что осложнения кариеса зубов как важнейшей патологии полости рта имеют полибактериальный характер. Многие из них представляют большие сложности при культивировании. Среди патогенов, колонизирующих корневые каналы, выделяют грамотрицательные облигатно-анаэробные палочки группы *Bacteroides*, *F. nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum*, *Eubacterium lentium*, *Wolinella recta*, *Campylobacter sputorum* (составляют 85% от общего числа возбудителей). Существенное место занимают также микроаэрофильные стрептококки групп *sanguinis* и *mutans* [5, 10].

В России обращения в стоматологические поликлиники по поводу лечения осложнений кариеса доминируют в структуре стоматологической заболеваемости и составляет от 20 до 30% [6]. Эндодонтальная бактериальная инфекция является основной причиной такого тяжелого осложнения пульпита как некроз пульпы зуба, а при отсутствии адекватного лечения — прогрессирования с развитием одонтогенной инфекции головы и шеи или сепсиса [5].

В последние годы установлено, что сохранение жизнеспособных бактерий в системе дентинных канальцев может быть связано с формированием микробных биопленок на уровне так называемого «смазанного слоя», которые препятствуют или нейтрализуют действие антисептических препаратов и антибиотиков [4, 7].

Эндодонтическая обработка каналов остается основным этапом в комплексной терапии заболеваний пульпы. От того, как проведен этот этап, напрямую зависят отдаленные результаты лечения. Зачастую определяющую роль в недопущении дальнейших осложнений эндодонтического лечения является эффективная и качественная инструментальная обработка при пульпите и периодонтите. Основной протокол лечения может быть дополнен физиотерапевтическими методами воздействия на область корневых каналов, в частности, использованием физических факторов: ультразвука, медицинского озона и фотохимической реакции [2, 3].

Одним из наиболее популярных является в настоящее время метод фотоактивируемой дезинфекции. Он основан на использовании различных фотобиологических эффектов, вызываемых посредством сочетанного применения светового излучения, кислорода и фотосенсибилизатора [9].

Особое значение приобретает также качественная ирригация корневых каналов с активацией ирриганта с помощью ультразвукового файла пьезоэлектрической группы, что, возможно, повышает эффективность эндодонтического лечения с точки зрения очистки стенок дентинных канальцев, особенно в области апекса [1, 3].

Считается доказанным, что применение ультразвуковой активации ирри-

ганта в процессе обработки корневых каналов является более эффективной методикой по сравнению с традиционным ручным методом обработки [10]. В эндодонтии ультразвук стали применять благодаря эффекту кавитации (в жидкой среде — формирование пузырьков пара, сопровождающееся шумом и гидравлическими ударами) и акустическим вихревым потокам, возникающим вокруг эндодонтического файла в процессе работы. Вихревые потоки размывают детрит корневого канала на опилки и нагревают дезинфицирующий раствор, что значительно повышает качество эндодонтического лечения и создает условия для герметичной obturации корневого канала, что можно рассматривать как одно из перспективных направлений лечения [3, 9, 10].

Вместе с тем, четких клинико-лабораторных доказательств формирования биопленок в системе дентинных канальцев и их разрушения в процессе указанных видов воздействия в отечественной и зарубежной литературе нет.

В связи с вышеизложенным, целью нашего исследования являлось лабораторное обоснование применения комплексного воздействия ультразвуковой обработки и фотоактивируемой дезинфекции в экспериментах *in vitro* с использованием штаммов анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов, выделенных у пациентов с хроническими формами пульпита и периодонтита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были обследованы 52 пациента с диагнозом хронический пульпит, в том числе: 26 с диагнозом хронический фиброзный пульпит (ХФП) и 26 с хроническим гангренозным пульпитом (ХГП); 16 пациентов с диагнозом хронический периодонтит в фазе обострения. Возраст пациентов составил от 25 до 45 лет (для «чистоты» эксперимента, т.к. у пациентов более старшего возраста была выявлена общесоматическая патология); мужчин и женщин — 35 и 32 человек соответственно.

Всем пациентам проводили традиционную методику эндодонтического лечения в соответствии со стандартным протоколом Европейского общества эндодонтистов, которая сопровождалась взятием материала для проведения сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) системы дентинных канальцев.

В экспериментальной части исследования для оценки воздействия ультразвуковой активации ирриганта на штаммы микроорганизмов использовали аппарат пьезоэлектрической группы «Ultrasonic DTE-D5», а для проведения фотоактивируемой дезинфекции — аппарат «Fotosan 360» с применением в качестве фотосенсибилизатора толуидинового синего.

Структуру биопленки корневых каналов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии с использованием двулучевого микроскопа «Quanta 200 3D» (FEI Company, USA) в режиме высокого вакуума с предварительным напылением золотом (999°) в установке «SPI-Module Sputter/Carbon Coater System» (SPI Inc., USA).

Микробиологическое изучение патологического содержимого корневых каналов осуществляли с помощью бактериологического метода исследования, включавшего в обязательном порядке анаэробное культивирование, путем количественных высевов на питательную среду M144 (Himedia, Индия) с добавлением крови, которую использовали для культивирования грамотрицательных анаэробных и грамположительных микроаэрофильных бактерий. Посевы помещали в термостат при температуре 37°С на 48 часов (для анаэробных культур — в анаэроостат на 7 суток), после чего использовали автома-

тическую систему по подсчету количества колоний «Scan 500» (Interscience, Франция).

Из числа выделенных штаммов для экспериментальной части исследования были отобраны наиболее часто встречавшиеся у обследованных нами пациентов (2 вида облигатно-анаэробных бактерий и 2 — микроаэрофильных стрептококков): *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *S. sanguis*, *S. mutans*. Проводили оценку влияния ультразвуковой обработки в комплексе с системой фотоактивируемой дезинфекции на микрофлору корневого канала с использованием биореактора «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия). В настоящем исследовании данная система, предназначенная для культивирования микроорганизмов и оценки их роста в режиме реального времени, была использована нами впервые в отечественной практике для культивирования анаэробных бактерий пародонтопатогенной группы и микроаэрофильных стрептококков. Интерпретацию результатов проводили по изменению оптической плотности при длине волны $\lambda=850$ нм.

Для определения чувствительности выделенных штаммов применяли собственную модификацию метода серийных разведений, разработанную на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И.Евдокимова.

В стерильные пластиковые пробирки Eppendorf помещали в равном соотношении взвесь испытуемого штамма и фотосенсибилизатор (по 0,20 мл соответственно), что в конечном количестве равнялось 10^6 КОЕ (в логарифмическом выражении 6,0 соответственно). Концентрация ФС — средняя, экспозиций ультразвуковой обработки — 10 секунд.

При проведении эксперимента первоначально помещали наконечник ультразвукового аппарата непосредственно в бактериальную взвесь, включали на необходимый период времени, а затем добавляли ФС и помещали наконечник диодного аппарата в световое излучение на 30 секунд (в соответствии с инструкцией). В качестве контроля использовали бактериальную взвесь без последующей дальнейшей ее обработки.

Для культивирования микроорганизмов в биореакторе использовали 2 типа пробирок: пробирки 50 мл с мембранным фильтром (TubeSpin®) для аэробов и пробирки 50 мл по типу Falcon с крышкой без мембраны. В каждую пробирку добавляли 15 мл питательной среды и вносили заранее подготовленную бактериальную взвесь с помощью биохимической пипетки.

Пробирки помещали в биореактор и с помощью программного обеспечения задавали необходимые параметры культивирования в соответствии с разработанными рекомендациями.

Для каждого вида микроорганизмов использовались свои настройки биореактора. При общих для всех микроорганизмов 37°C и Volume: 15 ml λ : 850 nm использованы настройки: *P. gingivalis* (RPM: 1200 min^{-1} ; Measurement freq.: 3 h^{-1} ; Rev. Spin period: 1 sec); *F. nucleatum* (RPM: 1200 min^{-1} ; Measurement freq.: 2 h^{-1} ; Rev. Spin period: 2 sec); *S. sanguis* (RPM: 1500 min^{-1} ; Measurement freq.: 3 h^{-1} ; Rev. Spin period: 2 sec); *S. mutans* (RPM: 1700 min^{-1} ; Measurement freq.: 3 h^{-1} ; Rev. Spin period: 2 sec).

Культивирование пародонтопатогенных видов бактерий и микроаэрофильных стрептококков проводили в течение 5 суток. Регистрация точек кривой роста — каждый 4 час.

Результаты эксперимента отображались в графике динамики изменения оптической плотности на протяжении всего периода культивирования. По ключевым точкам кривых роста микробных популяций проводили статисти-

ческую обработку данных в 5 повторах и обрабатывали методом параметрической статистики для малой выборки по Манну-Уитни ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении сканирующей электронной микроскопии препаратов, приготовленных из спилов в области корневых каналов инфицированных зубов, установлено наличие высокого уровня микробной контаминации зоны корневого канала и дентинных канальцев. При увеличении $\times 1500$ видны устья дентинных канальцев, которые obturированы скоплениями микроорганизмов, формирующих биопленку. При увеличении $\times 5000$ хорошо различимы палочковидные (бактероидные) микробные клетки и округлые дрожжевые элементы грибов.

Как известно, система корневого канала зуба часто имеет сложную морфологию, особенно у зубов жевательной группы. Идеально круглый в поперечном сечении конусовидный корневой канал с одним апикальным отверстием является, пожалуй, редким исключением. Тем самым, достичь полноценной очистки, стерилизации и оптимального формирования стенок корневых каналов возможно далеко не во всех случаях. В подавляющем большинстве случаев каналы имеют неправильную форму, различный диаметр в букколингвальном и мезиодистальном направлении, многочисленные поднутрения, так называемые, «плавники». От основного канала на разных уровнях отходит множество латеральных канальцев. Известно, что основной канал в апикальной части образует дельту и открывается на верхушке корня не одним, а несколькими апикальными отверстиями [7].

При эндодонтической обработке формируется «смазанный слой», содержащий микроорганизмы. «Смазанный слой» для микроорганизмов является питательной средой, а также он нарушает адгезию пломбировочных материалов к стенкам корневых каналов. При сканирующей электронной микроскопии видно, что он представлен элементами микробной биопленки. Ассоциации микроорганизмов полости рта колонизируют экосистему корневых каналов в виде биопленки, что существенно изменяет их свойства и затрудняет их удаление из системы корневых каналов.

В связи с этим, мы проводили экспериментальную оценку чувствительности штаммов предполагаемых возбудителей пульпита и периодонтита к

Характеристика изменений оптической плотности в процессе культивирования микробных популяций в биореакторе в режиме реального времени

Шаг Группы	<i>P. gingivalis</i>		<i>F. nucleatum</i>		<i>S. sanguinis</i>		<i>S. mutans</i>	
	К	ФД+УЗ	К	ФД+УЗ	К	ФД+УЗ	К	ФД+УЗ
Начало подъема лаг-фазы	0,19±0,04	0,09±0,03*	0,19±0,04	0,09±0,03*	0,24±0,04	0,15±0,04*	0,30±0,04	0,27±0,04
Начало подъема логарифм. фазы	0,32±0,04	0,21±0,04*	0,29±0,04	0,15±0,02*	0,67±0,04	0,57±0,04	0,54±0,04	0,61±0,04
Начало подъема стац. фазы	2,13±0,05	0,93±0,04*	2,37±0,05	1,34±0,04*	2,37±0,05	1,56±0,04*	2,37±0,05	1,8±0,03*
Средний показатель стац. фазы	2,26±0,05	1,22±0,03*	2,28±0,05	1,37±0,03*	2,23±0,05	1,51±0,03*	2,42±0,05	1,79±0,04*

Примечание. * Достоверное снижение показателя при исследуемом физическом воздействии ($p < 0,05$).

физиотерапевтическим воздействиям — фотохимической дезинфекции (ФД) и ультразвуковой ирригации (УЗ). В табл. представлены результаты анализа кривых роста бактериальных популяций исследуемых штаммов с учетом узловых точек. В большинстве сравниваемых узловых точек для всех исследуемых штаммов отмечено достоверное снижение показателей, характеризующих лаг-фазу, экспоненциальную и стационарную фазы роста.

Это позволило нам дать описание эффекта комплексного физиотерапевтического воздействия на исследуемые штаммы облигатно-анаэробных и микроаэрофильных бактерий.

Оценка чувствительности к ультразвуковой обработке в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией штаммов грамотрицательных анаэробных бактерий с использованием собственного модифицированного метода разведений показала следующее (рис. 1). Лаг-фаза, охватывающая промежуток от момента посева бактерий до начала их роста, продолжалась в среднем одинаково у всех исследуемых штаммов — в пределах суток. Так, для *P. gingivalis* начало роста отмечалось на 16 час культивирования, а для *F. nucleatum* на 20 час как в контрольной, так и в исследуемой пробе. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза, характеризующаяся прогрессирующим нарастанием скорости деления клеток, имела достоверные отличия: как по достижению максимума биомассы (определяемой при данной методике по оптической плотности — OD), так и по скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности контрольной пробы составили: *P. gingivalis* — 2,37 OD (40 h); *F. nucleatum* — 2,45 OD (48 h). Задержка логарифмической фазы и переход в стационарную фазу в исследуемых пробах наблюдали еще через 20 — 28 час культивирования. Показатели пикового максимума оптической плотности исследуемой пробы составили: *P. gingivalis* — 1,47 OD (88 h); *F. nucleatum* — 1,46 OD (44 h) соответственно.

Оценка чувствительности к ультразвуковой обработке в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией штаммов грамположительных микроаэрофильных бактерий показала следующее (рис. 2).

Лаг-фаза продолжалась немного дольше, чем у грамотрицательных бактерий и отмечалась на 24 час культивирования в контрольной и исследуемой пробе. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза также имела достоверные отличия как по достижению максимума биомассы, так и по скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности контрольной пробы составили: *S. sanguinis* — 2,39 OD (40 h); *S. mutans* — 2,49 OD (48 h).

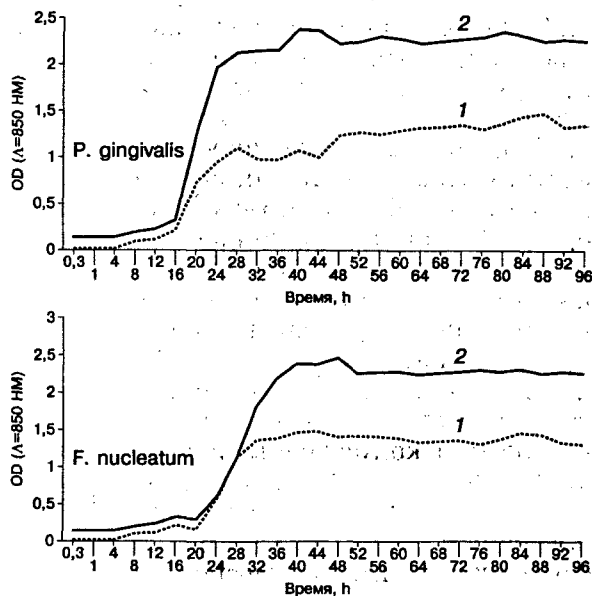


Рис. 1. Оценка чувствительности штаммов грамотрицательных бактерий к комплексному физиотерапевтическому воздействию.

Здесь и на рис. 2 — ультразвуковая + фотодинамическая обработка (1) *in vitro*; контроль (2).

Задержка логарифмической фазы и переход к стационарной фазе в исследуемых пробах наблюдали в промежутке от 32 час до 40 час культивирования. Наиболее чувствительным к УЗ и ФД обработке оказался *S. sanguinis* — максимум был отмечен на 36 час и составил 1,58 OD; более устойчивым оказался *S. mutans* — 2,01 OD (44 h).

ОБСУЖДЕНИЕ

Биопленка представляет собой сообщество микроорганизмов, окруженных внеклеточным полисахаридным матриксом и прикрепленных к влажной поверхности. Плотное прикрепление биопленки защищает присутствующие в ней микроорганизмы от воздействия неблагоприятных факторов, тем самым создавая благоприятные условия для размножения микроорганизмов [8]. Полисахаридный матрикс является специфическим барьером для проникновения внутрь биопленки антибактериальных агентов, в связи с чем повышается резистентность микробов к антисептикам и антибиотикам [4].

Полученные в нашем исследовании результаты позволяют предположить, что любой из представителей микробиоты, колонизирующей поверхность зуба, может контаминировать кариозную полость и проникнуть в пульпу зуба и далее — в систему дентинных канальцев, что является причиной воспалительного процесса. К ранним колонизаторам, которые формируют начальную биопленку, относят различные виды микроаэрофильных стрептококков, обладающих высокими адгезивными свойствами по отношению к эмали зуба. К промежуточным колонизаторам относят фузобактерии, к поздним — большинство представителей пародонтопатогенных видов (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* и др.).

По данным наших предыдущих исследований из системы дентинных канальцев могут выделяться с высокой частотой (от 50 до 90%) представители облигатно-анаэробных видов — *P. anaerobius*, *Peptococcus niger*, *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *T. forsythia*, но с меньшей (от 25 до 40%) — представители преимущественно микроаэрофильных видов — *Streptococcus sanguinis*, *Propionibacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp., а также некоторых облигатно-анаэробных — *Streptococcus intermedius*, *T. denticola*, *Eubacterium* spp. При этом частота выделения стафилококка составляла всего лишь 6,2%, энтерококка — 24,1%, а грибов рода *Candida* — 13,8% [8].

При проведении сканирующей электронной микроскопии подтверждено наличие обильной микробной колонизации «смазанного слоя» в области устьев дентинных канальцев корня зуба, имеющей признаки микробной био-

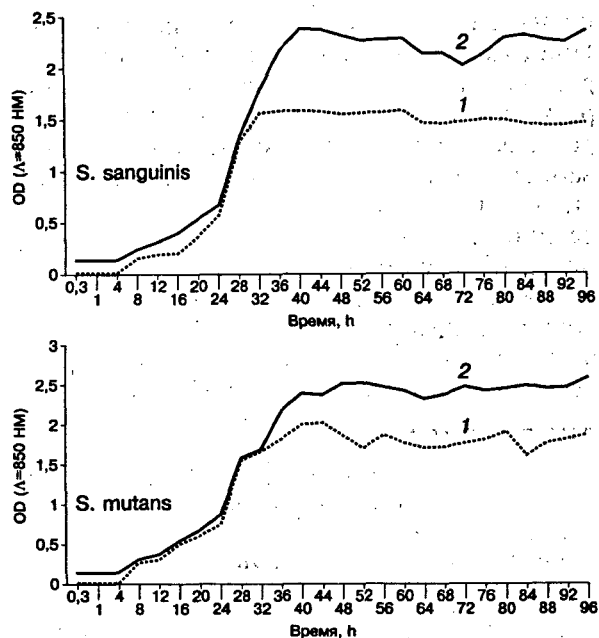


Рис. 2. Оценка чувствительности штаммов грамположительных бактерий к комплексному физиотерапевтическому воздействию.

пленки, представленной ассоциацией бактериоидных и дрожжевых клеток. При анализе динамики роста популяций бактерий у них были установлены различия в наступлении основных фаз кривой роста популяции, максимума размножения (стимуляции роста) и перехода к стационарной фазе. Кривые роста бактериальных популяций *in vitro* во всех случаях (со всеми использованными штаммами бактерий) демонстрировали статистически достоверное снижение по сравнению с контрольными образцами. Фотоактивируемая дезинфекция в комплексе с ультразвуковой активацией ирриганта *in vitro* по-разному влияют на процесс размножения микробных клеток штаммов — представителей нормальной микрофлоры полости рта и бактерий пародонтопатогенной группы, но во всех случаях имеет место бактериостатический эффект, выражающийся в торможении размножения бактерий по сравнению с контрольными образцами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бородина Н.Б., Петрова Т.Г. Пути повышения эффективности ирригации корневых каналов с использованием аппарата P5 Newtron XS фирмы Satelec. Новое в стоматологии. 2009, 1: 2.
2. Бир Р., Бауман М., Ким С. Эндодонтология. Под ред. Т.Ф.Виноградовой. М., МЕДпресс-информ, 2004.
3. Деннхардт Х. Ультразвук в эндодонтии. Медицинский алфавит. 2014, 217 (1): 10-13.
4. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандида-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 2015, 60 (12): 59-64.
5. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н. и др. Руководство по медицинской микробиологии. Под ред. А.С.Лабинской М., Бином, 2014.
6. Митронин А.В., Чунихин А.А. Важные аспекты применения диодного лазера при эндодонтическом лечении хронического пульпита. Анализ клинико-лабораторного исследования. Российская стоматология. 2011, 4 (4): 34-40.
7. Роудз Джон С. Повторное эндодонтическое лечение: консервативные и хирургические методы. М., МЕДпрессинформ, 2009.
8. Царев В.Н., Дмитриева Л.А., Ипполитов Е.В., Нисанова С.Е. Последовательное применение антибактериальных и детоксицирующих препаратов при эндодонтическом лечении хронического апикального периодонтита. Эндодонтия Today. 2013, 1: 8-14.
9. Царев В.Н., Митронин А.В., Ипполитов Е.В., Малазония Т.Т., Подпорин М.С., Манучарян Л.А. Оценка антимикробного действия фотодинамической терапии на возбудителей неклостридиальной анаэробной инфекции полости рта и грибы рода *Candida* в экспериментальных и клинических исследованиях. Эндодонтия Today. 2015, 3: 15-20.
10. Plotino G., Pameijer C.H., Grande N.M., Somma F. Ultrasonic in endodontics: a review of the literature. J. Endod. 2007, 33 (2): 81-95.

Поступила 26.05.16

Контактная информация: Царев В.Н., д.м.н., проф.,
124473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1, р.т. (495)609-67-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Л.М.Сомова¹, Ф.Н.Шубин¹, Е.И.Дробот¹, Н.Г.Плехова^{1,2}, И.Н.Ляпун¹**ПЛАЗМИД-АССОЦИИРОВАННАЯ ВИРУЛЕНТНОСТЬ YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS И ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС**¹НИИ эпидемиологии и микробиологии, ²Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток

Обобщены данные литературы, касающиеся генетически детерминированных факторов патогенности *Y. pseudotuberculosis* и ассоциированных с ними проявлений этой инфекции. вызываемой разными плазмидными типами возбудителя. Основное внимание обращено на особенности клеточно-тканевых изменений, опосредованных плазмидой вирулентности pYV, а также эффекты патогенности мало изученной плазмиды pVM82, имеющейся только в штаммах *Y. pseudotuberculosis*, вызывающих клинико-эпидемическое проявление инфекции в виде дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (ДСЛ). Полученные данные о способности дальневосточных штаммов продуцировать суперантиген YPMa, *Y. pseudotuberculosis*-производный митоген А, вероятно, свидетельствуют о том, что он играет ключевую роль в патогенезе ДСЛ. Вариабельность повреждений клеток врожденного иммунитета и органов-мишеней, вызываемых различными по вирулентности плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis*, может обуславливать полиморфизм клинико-морфологических проявлений этой инфекции. Углубленное понимание зависимости механизмов иммунопатогенеза болезни от молекулярной характеристики возбудителя раскрывает перспективы совершенствования диагностики и прогнозирования тяжести течения псевдотуберкулеза и в целом иерсиниозов у человека.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 74—85

Ключевые слова: дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка (ДСЛ), *Y. pseudotuberculosis*, плазмидные типы, плазмид-ассоциированная вирулентность, нейтрофилы, макрофаги

L.M.Somova¹, F.N.Shubin¹, E.I.Drobot¹, N.G.Plekhova^{1,2}, I.N.Lyapun¹**PLASMID-ASSOCIATED VIRULENCE OF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS AND INFECTIOUS PROCESS**¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Literature data regarding genetically determined pathogenicity factors of *Y. pseudotuberculosis* and associated manifestations of this infection caused by various plasmid types of the causative agent are generalized. Principal attention is given to features of cell-tissue alterations mediated by virulence plasmid pYV, as well as effects of pathogenicity of an understudied pVM82 plasmid present only in *Y. pseudotuberculosis* strains causing clinical-epidemic manifestation of the infections as Far East scarlet-like fever (FESLF). The data obtained on the ability of far-eastern strains to produce YPMa super-antigen, *Y. pseudotuberculosis*-derivative mitogen A, probably give evidence on its key role in FESLF pathogenesis. Variability of damage of innate immunity cells and target-organs caused by various plasmid types of *Y. pseudotuberculosis* by virulence could determine polymorphism of clinical-morphological manifestations of this infection. In-depth understanding of dependency of immune pathogenesis mechanisms of the disease on molecular characteristics of the causative agent opens up perspectives of enhancement of diagnostics and prognosis of the severity of the course of pseudotuberculosis and yersiniosis in human in general.

Key words: Far East scarlet-like fever (FESLF), *Y. pseudotuberculosis*, plasmid types, plasmid-associated virulence, neutrophils, macrophages

Актуальность изучения инфекций, вызываемых бактериями рода *Yersinia* (иерсиниозов), обусловлена их принадлежностью к эмерджентным болезням, возбудители которых вызывают генерализованные формы заболевания человека, в определенных условиях принимающие вспышечный и групповой характер. Пристальное внимание исследователей к проблеме иерсиниозов с начала XXI века связано с возросшей угрозой биотерроризма во всем мире, а также с потенциальной способностью гетерогенных популяций патогенных микроорганизмов к реверсии их вирулентных свойств, ассоциированных с изменениями на геномном уровне. Для понимания потенциала патогенности бактерий рода *Yersinia* важное значение имеет факт, что возбудитель псевдотуберкулеза, *Y. pseudotuberculosis*, является эволюционным предшественником этиологического агента чумы, *Y. pestis* [17].

Освещая новые данные о комплексе *Yersinia pseudotuberculosis*, авторы [37; 42] сообщают о мономорфном кладе (clade), вызвавшем дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку (Far East scarlet-like fever, FESLF) в СССР в 1960 году, который, по мнению авторов, часто претерпевает рекомбинацию, возможно, из-за конъюгативной плазмиды pVM82 и содержит белок вирулентности TspYI. Этот ранее неизвестный белок вирулентности, ответственный за уникальный клинический синдром FESLF, имеет значительную гомологию последовательности к членам семейства Toll/IL-1 рецептора (TIR). Бактериальный TIR домен содержит белки (Tcps), действующие на иммунную систему по TIR-TIR взаимодействиям, и подрывает защитные реакции организма с помощью многогранных механизмов. Белок TspYI увеличивает внутриклеточное выживание штаммов *in vitro* и в селезенки мышей на модели перитонита, участвует в торможении фагоцитоза даже тех штаммов *Y. pseudotuberculosis* группы FESLF, где плазида вирулентности pYV отсутствует.

В настоящее время *Y. pseudotuberculosis* как представитель патогенных иерсиний привлекает внимание исследователей всего мира в качестве модели для раскрытия молекулярных механизмов взаимодействия в системе микроорганизм-клетка хозяина. Недавно доказано, что клинико-эпидемическое проявление псевдотуберкулеза, первоначально названного дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой (ДСЛ) [8, 15], связано с конкретной клональной линией *Y. pseudotuberculosis*, характеризующейся определенным плазмидным профилем (pVM82, pYV 48), сиквенстипом (2ST) и аллелем гена *yadA* (1 аллель) [Тимченко Н.Ф. и др., 2011].

Большой интерес мировой науки и здравоохранения к проблеме псевдотуберкулеза, протекающего в виде дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки, демонстрирует недавно опубликованный обзор A. Amphlett (2015). Этот эпидемический вариант болезни, наблюдаемый прежде всего в России и Японии, протекает с серьезными системными воспалительными симптомами. В России *Y. pseudotuberculosis* инфекция признана как национальная проблема здоровья и дополнена к национальной системе нотификации (уведомления) в 1988 году [47]. В Японии эпидемии *Y. pseudotuberculosis* инфекции, именуемой как Izumi лихорадка и синдром Кавасаки, стали регистрироваться с 1977 г. [41, 48].

Патогенные для человека *Y. pseudotuberculosis* обладают широким набором факторов патогенности, детерминируемых хромосомными и плазмидными генами [6]. У различных штаммов *Y. pseudotuberculosis* обнаружено 11 типов внехромосомных генетических элементов — плазмид, имеющих молекулярную массу (м.м.) от 2 до 82 МДа. Наиболее постоянными являются плазмиды рYV м.м. 42 — 48 МДа и рVM82 м.м. МДа, что позволило отнести их к категории основных, а остальные — к дополнительным.

Заболеваемость в виде эпидемических вспышек могут обуславливать доминирующие плазмидные типы — рYV 48 и рYV 48: рVM 82, содержащиеся в геноме основного этиологического агента псевдотуберкулеза у людей в Сибири и на Дальнем Востоке — *Y. pseudotuberculosis* 1 серовара [9]. При этом для одноплазмидного варианта *Y. pseudotuberculosis*, содержащего плазмиду вирулентности рYV м.м. 45 — 48 МДа, характерны вспышки с более благоприятным течением, преобладанием легких и стертых форм заболевания. Присутствие дополнительной плазмиды рVM 82 в штаммах *Y. pseudotuberculosis* (рYV48: рVM82) обуславливает более тяжелое клиническое течение заболевания с полиорганной патологией.

Присутствие плазмиды вирулентности PUV является необходимым условием для патогенности видов *Yersinia*. По наличию или отсутствию этой плазмиды штаммы разделены на патогенные (G1-G3, G5-G6) и непатогенные подгруппы (G4) [Amphlett A., 2015]. Подгруппы G2 и G3 составляют большинство клинических изолятов, а подгруппы G1, G2 и G6 включают меньшинство штаммов. Наиболее частым клиническим генотипом в России и Японии является G3, обладающий PUV и продуцирующий суперантигенный токсин YPMa, но не имеющий острова высокой патогенности HPI [28].

Патологическое значение суперантигена YPMa обуславливается его способностью связываться непосредственно с молекулами МНС класса II, активируя Т-клетки так быстро, как обычные антигены активируют врожденные иммунные клетки [29], а также взаимодействуя с множеством Т-клеток, содержащих элементы Vβ: Vβ3, Vβ9, Vβ13.1 и Vβ13.2, и активируя от 5 до 20% от всей популяции Т-клеток [50].

Механизм, посредством которого YPMa вызывает развитие заболевания ДСЛ, вероятно, будет многофакторный [Amphlett A., 2015]. Исследования, в которых вводили очищенный YPMa подкожно мышам, показали, что токсический шок не происходит, когда были использованы моноклональные антитела против TNF-γ, IFN-γ или CD4, поскольку эти цитокины и Т-клеточный подтип вовлекаются в патогенез синдрома YPMa — индуцированного токсического шока [35]. Кроме того, было показано, что суперантигены потенцируют токсичность эндотоксинов, таких как липополисахарид, и это синергетическое действие может дополнительно способствовать развитию заболевания [20].

Большинство дальневосточных штаммов *Y. pseudotuberculosis* продуцируют YPMa, но не все случаи *Y. pseudotuberculosis* инфекции сопровождаются развитием картины ДСЛ, предполагая взаимодействие между суперантигеном и другими факторами вирулентности. Секвенирование генома штамма, вызывающего ДСЛ, показало, помимо рYV, дополнительные факторы вирулентности, которые могут быть вовлечены в патогенез заболевания [25]. Эти геномные элементы включают в себя следующее: плазмиды рVM82, *Yersinia* адгезии остров патогенности (YAPI), который кодирует пили типа IV.

Нами впервые изучен плазмидный профиль 791 штаммов *Y. pseudotuberculosis* серовара 1, изолированных в 1977 — 1985 гг. от больных людей, диких

животных, из смывов с продуктов и оборудования овощехранилищ в различных регионах страны [14]. Плазмиды выявлены у 784 (99,1%) штаммов, и они имели молекулярные массы (в MDa): 82; 45; 57; 5,5; 4,4; 3,5; 2,7; 2,4; 2,3 (по уточненным данным плазида р45 имеет массу 48 MDa). Среди этих плазмид наиболее часто выявляемыми были элементы массой 48 и 82 MDa, изучение которых показало, что плазида массой 48 MDa является плазмидой вирулентности *Y. pseudotuberculosis* (pYV), а плазида 82 MDa является специфичной для штаммов *Y. pseudotuberculosis* и была обозначена как pVM82. В соответствии с плазмидными характеристиками штаммы *Y. pseudotuberculosis* были дифференцированы на 15 плазмидных типов. Наиболее часто выявляемыми были штаммы 82:48 MDa, а также штаммы, содержащие обе указанные плазмиды в комбинации с низкомолекулярными элементами (677 штаммов, 86,4%). Вторыми по частоте встречаемости были штаммы плазмидного типа 48:4,4 MDa (9,3%).

Близкие результаты получены при изучении плазмидной характеристики 212 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных из различных источников в 2000 — 2010 гг. [47]. При этом на территориях Сибири и Дальнего Востока выявлена циркуляция шести плазмидных типов: 82:47 MDa (62,1%), 47 MDa (31,1%) и только 6,8% остальных типов: 82:47:17 MDa (5,3%), 110:82:47:17 MDa (0,5%), 82:47:17:2.7 MDa (0,5%); 82:47:2.7 MDa (0,5%). В дополнение к наличию плазмиды вирулентности pYV и плазмиды pVM82 штаммы *Y. pseudotuberculosis*, изолированные от пациентов, содержали суперантиген YPMa независимо от тяжести заболевания. В период с 2000 по 2010 гг. общее среднее число вновь зарегистрированных случаев было 6024 в год, а средняя частота составила 4,2 на 100 000 населения.

Детально охарактеризованы факторы патогенности, детерминированные хромосомными генами [13]. Они включают: 1) инвазин — белок молекулярной массой 103 kDa, обеспечивающий температура-зависимое проникновение бактерий в клетки хозяина; 2) белок Ail молекулярной массой 17 kDa, действующий как вторичный фактор адгезии и инвазии уже после адаптации бактерий к температуре тела хозяина; 3) антиген рН6, экспрессирующийся при температуре 37°C и низком значении рН; 4) белок молекулярной массой 21 kDa, экспрессирующий образование фимбрий. Хромосомные гены играют критическую, хотя еще не совсем определенную роль в патогенезе иерсиниозной инфекции [19].

Считают, что развитие инфекционного процесса, связанное с активным размножением *Yersinia* внутри тканей, возможно только при наличии у них гомологичной плазмиды вирулентности, называемой PCD1 у *Y. pestis*, и pYV (plasmid for *Yersinia* virulence) у *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* молекулярной массой 42 — 48 MDa, которая придает содержащим ее штаммам устойчивость к действию иммунной системы человека или животных [13, 21, 22, 39].

Плазида вирулентности pYV кодирует белок наружной мембраны Yad A, являющийся ведущим адгезином иерсиний, а также 7 разновидностей эффекторных белков наружной мембраны Yops, которые представляют собой комплекс факторов, предназначенных для нейтрализации иммунокомпетентных клеток и осуществляющих запуск апоптоза макрофагов [21, 23, 36, 39, 43, 46, 51], а также запускающих систему секреции III типа (type III secretion system, T3SS) [23]. T3SS является общей для всех патогенных *Yersinia* и позволяет бактериям вводить синтезируемые ими эффекторные белки в цитоплазму клетки хозяина без проникновения в нее, что играет существенную роль в развитии иерсиниозных инфекций.

Эффекторный белок YopE является GTPазным активирующим белком, а YopH — протеин тирозинфосфатазой, оба являются антифагоцитарными. YopO/YpkA является серин треонин киназой. YopM может переходить к ядру клетки-хозяина. YopJ/P ингибирует продукцию провоспалительного цитокина TNF- α и индуцирует апоптоз макрофагов. YopT является цитотоксином, который вызывает нарушение актиновых филаментов. Было показано, что все Yops дополнительно разрывают внутриклеточную передачу сигнала или приводят к изменениям цитоскелета, что препятствует фагоцитозу [24]. PLYV также кодирует белки, участвующие в контроле и транслокации эффекторных Yops к клетке-мишени: YopN, YopB, YopD, YaeA, IcrG и IcrV. Патогенные виды *Yersinia* преимущественно нацелены на клетки врожденной иммунной системы (нейтрофилы, макрофаги и дендритные клетки) для инъекции Yops, ослабляя врожденный иммунный ответ [32].

Большой интерес представляет гораздо менее изученная плаزمиды с молекулярной массой 82 МДа (pVM82), обнаруживаемая только у штаммов *Y. pseudotuberculosis* I серовара, который является наиболее частым этиологическим агентом ДСЛ у человека в России и не встречается у других представителей рода *Yersinia*. Наличие у этих бактерий двух плазмид молекулярной массой 82 и 45 — 48 МДа детерминируют особую вирулентность штаммов и вызывают более тяжелое течение заболевания [14]. Авторами установлено, что наличие только плазмиды PLYV определяет спорадическую заболеваемость псевдотуберкулеза. Кроме того, ими показано, что среди природных штаммов *Y. pseudotuberculosis* встречается плаزمиды p57 молекулярной массой 57 МДа, которая не коррелирует с эпидемичностью штаммов и является фрагментом плазмиды pVM82 вместе с фрагментом ДНК в 25 МДа. Было установлено [1], что в присутствии плазмиды pVM82 подавляется образование антител к ряду основных антигенов *Y. pseudotuberculosis*, в то же время, штаммы, содержащие плазмиды p57, такого эффекта не оказывают. Поэтому был сделан вывод, что фрагмент ДНК в 25 МДа детерминирует синтез дополнительного фактора патогенности возбудителя псевдотуберкулеза.

После проникновения в организм патогенных бактерий инициируется сложный каскад событий, в котором ключевая роль отводится клеткам врожденного иммунитета [33, 44]. Понимание закономерностей реагирования этих клеток (нейтрофилов, моноцитов/макрофагов) при взаимодействии с гетерогенными популяциями иерсиний может иметь важное значение при разработке основ вакцинальной стратегии населения в группах риска, что особенно необходимо для предотвращения эпидемий чумы. Сведения о закономерностях реагирования клеток врожденного иммунитета как первой линии защиты при инфекционных процессах при их взаимодействии с разными плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis* остаются недостаточно изученными и противоречивыми.

Нами впервые детально прослежена ферментативная активность клеток врожденного иммунитета при инфицировании разными плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis*. На моделях *in vivo* и *in vitro* установлены качественные и количественные различия реагирования клеток врожденного иммунитета (нейтрофилов и макрофагов), включая кислородзависимые, кислороднезависимые и нитроксидзависимые механизмы бактерицидности [3]. В ответ на заражение *in vitro* слабовирулентным плазмидным типом pVM82 *Y. pseudotuberculosis* более активно реализовался бактерицидный потенциал (показа-

тели фагоцитоза и бактерицидности) и нитроксидобразующая активность фагоцитов, а также защитная реакция миелопероксидазы нейтрофилов, по сравнению с вирулентным плазмидным типом pYV48: pVM82. При одинаковой бактериальной нагрузке (1:10) фагоцитарная активность нейтрофилов была ниже, чем у макрофагов, при этом активнее поглощался и обезвреживался менее вирулентный плазмидный тип pVM82 Y. pseudotuberculosis, тогда как вирулентный тип pYV48: pVM82 оказывал цитотоксическое действие на клетки. В ранние сроки (1,5 — 2 часа) после заражения плазмидным типом pYV45: pVM82 Y. pseudotuberculosis уровень активности ферментов кислородзависимой системы (НСТ-тест, СДГ) нейтрофилов превышал таковой после инфицирования плазмидным типом pVM82. Активность миелопероксидазы, принимающей участие в защитной реакции нейтрофилов, и продукция катионных белков были выше в отношении менее вирулентного плазмидного типа pVM82 Y. pseudotuberculosis.

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований Ж.А. Коноваловой [5], показавшей, что плазмидсодержащие Y. pseudotuberculosis (pYV48 и pYV48:pVM82) более устойчивы к разрушению макрофагами и нейтрофилами, чем клетки бесплазмидного штамма. Активность ферментов «окислительного взрыва» (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, НАДФ-Н-оксидазы), супероксиддисмутазы, миелопероксидазы и кислой фосфатазы в макрофагах при фагоцитозе бесплазмидных клеток была выше, чем в случае плазмидсодержащих бактерий.

Таким образом, установленные особенности метаболической активности в макрофагах и нейтрофилах, инфицированных разными плазмидными типами Y. pseudotuberculosis, свидетельствуют об угнетении бактерицидной способности фагоцитов, что имеет существенное значение в иммунопатогенезе данной инфекции.

Ключевая роль в развитии патологического процесса при инфекционных заболеваниях принадлежит повреждению клеток, которое зависит от степени вирулентности инфицирующих агентов. В органопатологии псевдотуберкулеза, вызываемого вирулентными штаммами Y. pseudotuberculosis, содержащими плазмиды pYV: pVM82, значительное место занимают деструктивно-воспалительные изменения с формированием своеобразных «абсцессоподобных или некротических очажков», а также гранулем (узелков) с так называемым центральным кариорексисом, которые являются отличительным морфологическим признаком псевдотуберкулеза [4, 16].

Получены данные о вариабельности клеточных повреждений в гистопатологии псевдотуберкулеза в зависимости от плазмид-ассоциированной вирулентности Y. pseudotuberculosis [3, 10]. Установлено, что при заражении животных как высоко вирулентным двухплазмидным штаммом pYV48: pVM82, так и штаммом Y. pseudotuberculosis со сниженной вирулентностью, имеющим единственную плазмиду pVM82, в органах-мишенях развивались клеточные повреждения как по типу некроза, так и апоптоза. В ответ на заражение плазмидным типом pVM82 наблюдалось преобладание апоптоза в органопатологии инфекции. Вирулентный штамм Y. pseudotuberculosis, содержащий две плазмиды pYV48 : pVM82, преимущественно вызывал некроз фагоцитов. На модели in vitro выявлено его апоптоз-индуцирующее действие на клетки врожденного иммунитета, причем в большей степени нейтрофилов, чем макрофагов. Максимальное количество апоптотических нейтрофилов наблю-

далось на 7 день после заражения ($45 \pm 3,3\%$). Апоптоз макрофагов обнаружен на 2 день после контакта с бактериями ($29 \pm 3\%$). Кроме некроза и апоптоза нейтрофилов при воздействии плазмидного типа pYV48 : pVM82 *Y. pseudotuberculosis* обнаружен 3 тип клеточной гибели — образование внеклеточных ловушек [3]).

Поглощение *Yersinia* дикого типа, содержащего плазмиду pYV, индуцирует форму гибели нейтрофилов, называемую фагоцитоз-индуцированной гибелью клеток (PICD), что зависит от продукции активных форм кислорода (АФК) и имеет важное значение для разрешения инфекции и воспаления [40, 46]. Контролируемый уровень апоптоза иммунных клеток требуется для вирулентности *Yersinia* [21].

Исходя из того, что нейтрофилы тесно связаны с острым воспалением, J.L. Spinner et al. [46] исследовали роль белков *Yersinia* YopJ и YopP, связанных с плазмидой pYV, в определении судьбы человеческих нейтрофилов. При использовании *in vitro* штаммов *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *Y. pestis* дикого типа и мутантных по плазмиде вирулентности штаммов было установлено, что YopJ / YopP-опосредованная индукция апоптоза не происходит в нейтрофилах в отличие от макрофагов. Надежная продукция нейтрофилами АФК в ответ на дефицитные по плазмиде вирулентности штаммы *Yersinia* была связана с повышенной клеточной гибелью, предположили, что опосредованное иерсиниями ингибирование продукции АФК нейтрофилами играет роль в уклонении от врожденного иммунитета человека, в частности, за счет ограничения апоптоза нейтрофилов. При этом редукция апоптоза нейтрофилов потенциально задерживала острую воспалительную реакцию и способствовала персистенции *Yersinia* посредством внутриклеточной и внеклеточной выживаемости в очаге инфекции [38, 45]. Эти данные демонстрируют, что увеличенная цитотоксичность/апоптоз иммунных клеток соответствует аттенуации вирулентности *Yersinia*.

Иерсинии способны индуцировать Yop-опосредованный апоптоз клеток лимфоидной ткани [53], в том числе макрофагов [34]. Это может иметь значение в процессе инфекции, когда включение механизма апоптоза у макрофагов хозяина приводит к их инактивации и тем самым к исключению воспалительного ответа, что, в свою очередь, приводит к внеклеточному размножению патогена в лимфоидной ткани. *Yersinia*, экспрессирующие YopP, оказывают сильное цитотоксическое действие на мышинные макрофаги и дендритные клетки, чем те, которые экспрессируют YopJ, тем не менее, различия аминокислотных последовательностей между YopJ и YopP обуславливают менее эффективное перемещение YopJ в клетки хозяина [21, 49]. Кроме того, *Yersinia*, конструированные для экспрессии YopP (вместо YopJ), являются менее патогенными для мышей при оральной и подкожной инфекции.

Ацетилтрансферазная активность белка YopJ, опосредованная плазмидой вирулентности pYV, способствует разным формам гибели клеток, которая может проявляться в виде апоптоза, пироптоза и некроза [27, 31]. Важно отметить, что различные реакции организма хозяина являются следствием доставки соответствующего эффекторного «коктейля»: YopJ (P) *Y. enterocolitica* транслоцируется в клетки хозяина более продуктивно и цитотоксично, чем YopJ аллели, экспрессируемые *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* [49]. Замена YopJ *Y. pseudotuberculosis* на более цитотоксический YopJ (P) *Y. enterocolitica* ослабляет течение псевдотуберкулезной инфекции [21]. Таким образом, было по-

казано, что белок YopJ не является важным для патогенеза *Yersinia* инфекции, хотя это остается спорным.

Воспалительный пироптоз, развивающийся при воздействии на макрофаги полисахарида бактерий рода *Yersinia*, может протекать как в присутствии, так и в отсутствии АТФ. Пироптоз опосредован адаптерным белком ASC, который вместе с каспазой-1 образует надмолекулярный цитоплазматический комплекс, также известный как пироптосома [26]. Это требует плазмид-кодированных T3SS, но не YopJ или любых других известных эффекторных молекул [18]. Пироптоз является результатом активации каспазы-1, которая функционально отличается от структурно родственных апоптотических каспаз. Каспаза-1 зависимое повреждение ДНК происходит по механизму пироптоза, отличающемуся от каспаза-3 зависимого расщепления ДНК в клетках при апоптозе [18, 19]. Каспаза-1 также стимулирует созревание и секрецию воспалительных цитокинов IL-1 и IL-18, что вызывает образование пор в плазматической мембране, патологических потоков ионов, которые приводят к отеку клетки и, в конечном счете, к лизису и высвобождению воспалительного внутриклеточного содержимого, что служит усилению физиологического воздействия воспалительных цитокинов.

Установлено, что макрофаги, подвергающиеся пироптозу, не только демонстрируют морфологические признаки, типичные для апоптоза, но и обладают некоторыми чертами, ассоциированными с некрозом [30]. Интересно, что *Yersinia*-инфицированные клетки проявляют особенности апоптоза, пироптоза или некроза в зависимости от состояния и типа вовлеченных клеток [18, 52]. Однако остается неясным — содействует ли клеточная гибель защите организма хозяина и можно ли рассматривать ее как стратегию для *Yersinia* элиминировать фагоциты, или наоборот, способствует ли клеточная гибель иммунитету против иерсиний [20].

Токсины как факторы патогенности бактерий играют важную роль в инициации, развитии и исходе инфекционных болезней. К началу 2000-х годов было сформировано представление о спектре токсинов *Y. pseudotuberculosis* и раскрыты некоторые механизмы реализации токсического эффекта патогена [12]. Существенное значение в патогенезе псевдотуберкулеза имеют два токсина *Y. pseudotuberculosis* — термолабильный летальный токсин (ТлТ) и термостабильный летальный токсин (ТсТ).

Термолабильный токсин *Y. pseudotuberculosis* — видовой белок с м.м. 200 кДа, обладающий иммуногенными и аллергенными свойствами, способен вызывать у лабораторных животных местную дермонекротическую реакцию и смерть при парентеральном введении. ТлТ выделен Н.Ф. Тимченко из штамма 2517 III серовара, содержащего плазмиду pYV 48 MDa (штамм получен от Н. Mollaret, Франция), а также из бесплазмидного штамма. Установлено [7] дозозависимое селективное действие этого токсина на функциональную активность клеток врожденного иммунитета. При его добавлении к нейтрофилам в концентрации 1,52 мкг/мышь (5 LD₅₀) выявлена активация ферментов кислород-зависимой системы (ЛДГ и МПО) в ранний период контакта (до 3 часов). В свою очередь, было отмечено увеличение количества апоптотических макрофагов в ранние сроки контакта с ТлТ (5 часов) и его дальнейшее увеличение в течение срока наблюдения с одновременным увеличением активности митохондриального фермента цитохромоксидазы и продукции оксида азота. Патоморфологические исследования показали [11], что этот токсин имеет

непосредственное отношение к развитию инфекционно-токсического шока при псевдотуберкулезе.

Термостабильный летальный токсин — белок м.м. 45 кДа, который продуцируют 82,6% штаммов *Y. pseudotuberculosis* I — VI сероваров, выделенных от больных людей и из внешней среды [12]. Продукция токсина наблюдается у бактерий, несущих как плазмиду вирулентности pYV, так и в сочетании с плазмидой pVM82, а также у бесплазмидных бактерий, что предполагает хромосомную детерминированность TcT у возбудителя псевдотуберкулеза. Этот токсин оказывал концентрационно-зависимое действие на активность антиоксидантных ферментов (каталазы, глутатионредуктазы), апоптоз и жизнеспособность нейтрофилов крови крыс, причем развитие апоптоза происходило на фоне повышения активности указанных ферментов [2].

Таким образом, начиная с 2000 годов, значительно повысился интерес к дальневосточной скарлатиноподобной лихорадке, регистрирующейся в основном в России и Японии. Это своеобразное клиническо-эпидемическое проявление псевдотуберкулезной инфекции человека, известное с 1959 г., является генерализованным воспалительным заболеванием с полиорганной патологией, отличающимся от спорадической *Y. pseudotuberculosis* инфекции в Европе, протекающей в форме гастроэнтерита. Лишь в течение последних 10 лет были идентифицированы ДСЛ-ассоциированные геномные элементы *Y. pseudotuberculosis*, включающие плазмиды pYV и pVM82, кодирующие спектр факторов патогенности возбудителя. Установлена способность дальневосточных штаммов, одновременно несущих обе плазмиды, продуцировать суперантиген YPMa, *Y. pseudotuberculosis*-производный митоген A, играющий, вероятно, ключевую роль в патогенезе ДСЛ. Однако эффекты этого токсина и его взаимодействие с другими факторами вирулентности и иммунологической защиты организма хозяина еще недостаточно раскрыты. Вариабельность реагирования клеток врожденного иммунитета и форм повреждения клеток органов-мишеней, вызываемых различными по вирулентности плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis*, может лежать в основе полиморфизма клинико-морфологических проявлений вызываемой ими инфекции, что требует дальнейших исследований на основе современных методических подходов. В конечном итоге, углубленное понимание зависимости механизмов иммунопатогенеза болезни от молекулярной характеристики возбудителя раскрывает перспективы усовершенствования диагностики и прогнозирования тяжести течения псевдотуберкулеза и в целом иерсиниозов у человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гинцбург А.Л., Шубин Ф.Н., Шовадаева Г.А. Новый признак патогенности, кодируемый плазмидой pVM82 *Yersinia pseudotuberculosis*. Генетика. 1988, 24 (9): 1562-1571.
2. Долматова Л.С., Заика О.А., Недашковская Е.П., Тимченко Н.Ф. Исследование механизмов апоптоз-модулирующего влияния термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* и корригирующего действия экстракта из дальневосточных видов голотурий на нейтрофилы крыс *in vitro*. Тихоокеанский медицинский журнал. 2010, 3: 76-80.
3. Дробот Е.И. Реактивность клеток врожденного иммунитета при инфекции, вызванной разными плазмидными вариантами *Y. pseudotuberculosis*: Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток, 2015.
4. Исачкова Л.М., Жаворонков А.А., Антоненко Ф.Ф. Патология псевдотуберкулеза. Владивосток, Дальнаука, 1994.
5. Коновалова Ж.А. Бактерицидные механизмы фагоцитоза *Y. pseudotuberculosis* с разным набором плазмид: Автореф. дис. канд. биол. наук. Иркутск, 2002.

6. Литвинова Л.В., Ценева Г.Я., Иващенко А.П. и др. Генетические особенности *Yersinia pseudotuberculosis* и эпидемиологические черты групповых заболеваний псевдотуберкулезом в организованных коллективах. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2009, 3: 31-34.
7. Плехова Н.Г., Дробот Е.И., Тимченко Н.Ф. и др. Влияние термолабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* на функции клеток врожденного иммунитета. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014, 157 (4): 483-487.
8. Сомов Г.П. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка. М., Медицина, 1979.
9. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М., Медицина, 2001.
10. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Дробот Е.И. Новые аспекты патологии псевдотуберкулеза. Архив патологии. 2012, 74 (3): 60-64.
11. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Дробот Е.И. и др. Патоморфологические изменения при экспериментальной токсемии, вызванной термолабильным токсином *Yersinia pseudotuberculosis*. Тихоокеанский медицинский журнал. 2010, 3: 65-67.
12. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматов Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток, Приморский полиграфкомбинат, 2004.
13. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002, 3: 248-266.
14. Шубин Ф.Н., Гинцбург А.Л., Китаев В.М. и др. Анализ плазмидного состава штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и его применение для типирования возбудителя псевдотуберкулеза. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 1989, 6: 20-25.
15. Шубин Ф.Н., Сибирцев Ю.Т., Рассказов В.А. Плазмиды *Yersinia pseudotuberculosis* и их значение в реализации эпидемического процесса при псевдотуберкулезе. Журн. микробиол. 1985, 12: 53-56.
16. Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. и др. Псевдотуберкулез. Новосибирск, Наука, 2003.
17. Achtman M., Zurth K., Morelli C. et al. *Yersinia pestis*, a cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999, 96: 14043-14048.
18. Bergsbaken T., Cookson B. T. Macrophage activation redirects *Yersinia*-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. PLoS Pathog. 2007, 3: e161.
19. Bergsbaken T., Cookson B. T. Innate immune response during *Yersinia* infection: critical modulation of cell death mechanisms through phagocyte activation. J. Leukoc. Biol. 2009, 86 (5): 1153-1158.
20. Blank C., Luz A., Bending S. et al. Superantigen and endotoxin synergize in the induction of lethal shock. Eur. J. Immunol. 1997, 27: 825-833.
21. Brodsky I.E., R. Medzhitov R. Reduced secretion of YopJ by *Yersinia* limits in vivo cell death but enhances bacterial virulence. PLoS Pathog. 2008, 4: e1000067.
22. Brodsky I.E., Palm N.W., Sadanand S. et al. *Yersinia* effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. Cell. Host. Microbe. 2010, 7 (5): 376-387.
23. Cornelis G. The type III secretion injectisome, a complex nanomachine for intracellular 'toxin' delivery. Biol. Chem. 2010, 391 (7): 745-751.
24. Dube P. Interaction of *Yersinia* with the gut: mechanisms of pathogenesis and immune evasion. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2009, 337: 61-91.
25. Eppinger M., Rosovitz M.J., Fricke W.F. et al. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. PLoS Genet. 2007, 3: e142.
26. Fernandes-Alnemri T., Wu J., Yu J.W. et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. Cell Death Differ. 2007, 14: 1590-1604.
27. Fink S.L., Cookson B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infect. Immun. 2005, 73: 1907-1916.
28. Fukushima H., Matsuda Y., Seki R. Geographical heterogeneity between Far East and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis* derived mitogen and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. J. Clin. Microbiol. 2001, 39: 3541-3547.

29. Jardetzky T.S., Brown J.H., Gorda J.C. et al. Three-dimensional structure of human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*. 1994, 368: 711-718.
30. Labbe K., McIntire C.R., Doiron K. et al. Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity*. 2011, 35 (6): 897-907.
31. Lilo S., Zheng Y., Bliska J.B. Caspase-1 activation in macrophages infected with *Yersinia pestis* KIM requires the type III secretion system effector YopJ. *Infect. Immun.* 2008, 76: 3911-3923.
32. Marketon M.M., DePaolo R.W., DeBord R.W. et al. Plaque bacteria target immune cells during infection. *Science*. 2005, 309: 1739-1741.
33. Medzhitov R., Schneider D.S., Soares M.P. Disease tolerance as a defense strategy. *Science*. 2012, 335 (6071): 936-941.
34. Meinzer U., Barreau F., Esmiol-Welterlin S. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* effector YopJ subverts the Nod2 rick Tak1 pathway and activates caspase-1 to induce intestinal barrier dysfunction. *Cell. Host. Microbe*. 2012, 11 (4): 337-351.
35. Miyoshi-Akiyama T., Fujimaki W., Yan X.J. et al. Identification of murine T cells reactive with the bacterial superantigen *Y. pseudotuberculosis* — derived mitogen (YPM) and factors involved in YPM-induced toxicity in mice. *Microbiol. Immunol.* 1997, 41: 345-352.
36. Moreau K., Lacas-Gervis S., Fujita N. et al. Autophagosomes can support *Yersinia pseudotuberculosis* replication in macrophages. *Cell. Microbiol.* 2010, 12 (8): 108-123.
37. Norenberg D., Wieser A., Magistro G. et al. Molecular analysis of a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-doman containing virulence protein of *Y. pseudotuberculosis* among Far East scarlet-like fever serotype I strains. *Intern. J. Med. Microbiol.* 2013, 303: 583-594.
38. O'Loughlin J.L., Spinner J.L., Minnich S.A., Kobayashi S.D. *Yersinia pestis* two-component gene regulatory systems promote survival in human neutrophils. *Infect. Immun.* 2010, 78 (2): 773-782.
39. Peters K.N., Dhariwala M.O., Hughes-Hanks J.M. Early apoptosis of macrophages modulated by injection of *Yersinia pestis* YopK promotes progression of primary pneumonic plague. *PLoS Pathog.* 2013, 9 (4): e1003324.
40. Sanmun D., Witasp E., Jitkaew S. et al. Involvement of a functional NADPH oxidase in neutrophils and macrophages during programmed cell clearance: implications for chronic granulomatous disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009, 3: 621-631.
41. Sato K., Ouchi K., Taki M. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children, resembling Izumi fever and Kawasaki syndrome. *Pediatr. Infect. Dis.* 1983, 2: 123-126.
42. Savina C., Martina L., Bouchierb Ch. et al. The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: Characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii*. *Intern. J. Med. Microbiol.* 2014, 304: 452-463.
43. Shao F. Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008, 11: 21-29.
44. Silva M.T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J. Leukoc. Biol.* 2010, 87 (1): 93-106.
45. Spinner J.L., Cundiff J.A., Kobayashi S.D. *Yersinia pestis* type III secretion system-dependent inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function. *Infect. Immun.* 2008, 76: 3754-3760.
46. Spinner J.L., Seo K.S., O'Loughlin J.L. et al. Neutrophils are resistant to *Yersinia* YopJ/P-induced apoptosis and are protected from ROS-mediated cell death by the type III secretion system. *PLoS One*. 2010, 18: e9279.
47. Tseneva G.Y., Chesnokova M.V., Klimov V.T. et al. Pseudotuberculosis in the Russian Federation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012, 954: 63-68.
48. Tsubokura M., Orsuki K., Sato K. et al. Special features of distribution of *Yersinia pseudotuberculosis* in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27: 790-791.
49. Zauberman A., Cohen S., Mamroud E. et al. Interaction of *Yersinia pestis* with macrophages: limitations in YopJ-dependent apoptosis. *Infect. Immun.* 2006, 74: 3239-3250.
50. Zippelius A., Pittet M.J., Batard P. et al. Thymus selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans. *J. Exp. Med.* 2002, 195: 485-494.

51. Zhang Y., Murtha J., Roberts M.A. et al. Type III secretion decreases bacterial and host survival following phagocytosis of *Yersinia pseudotuberculosis* by macrophages. *Infect. Immun.* 2008, 76 (9): 4299-4310.
52. Zheng Y., Lilo S., Mena P., Bliska J.B. YopJ-induced caspase-1 activation in *Yersinia*-infected macrophages: independent of apoptosis, linked to necrosis, dispensable for innate host defense. *PLoS One.* 2012, 7: e36019.
53. Viboud G.I., Bliska J.B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2005, 59: 69-89.

Поступила 10.05.16

Контактная информация: Сомова Лариса Михайловна, д.м.н., проф.,
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1, р.т. (8-423)244-14-48

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

В.И.Ефременко¹, А.А.Ефременко², Д.В. Ефременко¹

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА И КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ

¹Ставропольский противочумный институт, ²Ставропольский государственный медицинский университет

Рассматриваются проблемные вопросы создания и практического внедрения специфических иммунобиологических препаратов, отсутствующих до настоящего времени, для лечения и профилактики природно-очаговых арбовирусных инфекций — лихорадки Западного Нила (ЛЗН) и Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ). На территориях Южного и Северо-Кавказского федеральных округов России сформировались стойкие природные очаги ЛЗН и КГЛ с эпидемическими проявлениями. В центральных регионах России и в Сибири обнаруживаются маркеры вируса Западного Нила, а среди здорового населения также определяется наличие иммунной прослойки к этой инфекции. Проведенный анализ литературных источников формирует теоретическую основу для создания новых специфических препаратов для этиотропной терапии и профилактики ЛЗН и КГЛ. В качестве сырья возможно использование крови здоровых доноров с достаточно высокими титрами иммуноглобулинов класса G, проживающих в некоторых субъектах Российской Федерации на территории природных очагов с наиболее интенсивным эпидемическим процессом.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 85—93

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, Крымская геморрагическая лихорадка, лечение, профилактика, иммунобиологические препараты

V.I.Efremenko¹, A.A.Efremenko², D.V.Efremenko¹

THEORETICAL ASPECTS OF CREATION OF SPECIFIC PREPARATIONS FOR ETIOTROPIC THERAPY AND PROPHYLAXIS OF WEST NILE FEVER AND CRIMEAN HAEMORRHAGIC FEVER

¹Stavropol Institute for Plague Control, ²Stavropol State Medical University, Russia

Problematic issues on creation and practical introduction of specific immune biologic preparations for therapy and prophylaxis of natural-foci arbovirus infections — West Nile fever (WNF) and Crimean hemorrhagic fever (CHF), that are not available until now, are examined. Persistent natural foci of WNF and CHF with epidemic manifestations have formed in Southern and North Caucasian Federal Districts of Russia. Markers of West Nile virus are being detected in central regions of Russia and Siberia, and the presence of fraction of population immune to this infection

is also detected. Analysis of literature sources that has been carried out forms a theoretical basis for creation of novel specific preparations for etiotropic therapy and prophylaxis of WNF and CHF. Use of blood from healthy donors with sufficiently high titers of class G immunoglobulins residing in certain subjects of Russian Federation in natural foci territories with the most intensive epidemic process is possible as raw material.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 85–93

Key words: West Nile fever, Crimean hemorrhagic fever, therapy, prophylaxis, immune biological preparations

Профилактика и лечение природно-очаговых инфекций продолжает оставаться актуальной проблемой здравоохранения. В конце XX века в России активизировались такие заболевания как лихорадка Западного Нила (ЛЗН) и Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ), имеющие тенденции к расширению ареалов обитания их возбудителей и, как следствие, территорий природных очагов. До настоящего времени отсутствуют специфические препараты для этиотропного лечения и профилактики ЛЗН и КГЛ, относящихся к группе арбовирусных инфекций, зачастую протекающих в тяжелой форме и приводящих к смертельному исходу. При этом на эндемичных по данным инфекциям территориях наблюдается увеличение иммунной прослойки среди населения и, как результат, снижение количества тяжелых форм заболеваний. Это создает предпосылки для использования крови здоровых доноров с достаточно высокими титрами IgG в качестве сырья для приготовления специфических иммунобиологических препаратов для лечения и профилактики ЛЗН и КГЛ.

Эта работа не претендует на обобщение и анализ эпидемиологических особенностей ЛЗН и КГЛ на территории России, а подчеркивает их природную очаговость, имеющую тенденцию к расширению ареала обитания циркулирующих там вирусов с вовлечением в эпидемический процесс человека и появлением у населения иммунной прослойки.

Цель данной публикации: анализ проблемных вопросов и научное обоснование возможности разработки новых специфических препаратов для этиотропного лечения и профилактики природно-очаговых арбовирусных инфекций — ЛЗН и КГЛ.

Вирус Западного Нила (ВЗН), относящийся к роду *Flavivirus*, семейства *Flaviviridae*, впервые был изолирован в 1937 г. от лихорадящей женщины в провинции Западный Нил (Северная Уганда). В настоящее время известно 5 генотипов этого вируса, вызывающего заболевание людей на Африканском континенте, в Юго-Западной и Южной Азии, Центральной и Южной Европе, Северной, Центральной и Южной Америке [26, 36, 37, 39]. Доминирующие вирусные популяции на территории России относятся к 1 и 2 генотипу, также встречается 4 генотип вируса, при котором заболевание обычно протекает в относительно легкой форме [1].

В течение двух последних десятилетий крупные вспышки ЛЗН зарегистрированы в России, США, Канаде, Алжире, Греции, Израиле, Италии, Румынии, Сербии, Судане, Тунисе, ЮАР. Спорадические случаи и незначительная заболеваемость фиксировались в ряде стран Северной и Южной Америки, Ближнего Востока, Европы, а также в некоторых странах постсоветского пространства — Азербайджан, Армения, Белоруссия, Казахстан, Молдавия, Таджикистан, Туркмения, Украина [1, 26, 32, 35, 36, 39].

Основными переносчиками ВЗН являются различные виды комаров рода *Culex*, а также клещи, передающие человеку вирус от птиц водного и околоводного комплексов, в организме которых он способен сохранять жизнеспособность до 120 суток [44]. Изучение популяционных взаимодействий ВЗН выявило, что в его циркуляцию также вовлечены многие виды сельскохозяйственных животных и других млекопитающих [25, 28]. Ареал распространения ВЗН занимает огромные территории, находящиеся за пределами стран, в которых фиксируются эпидемические проявления вызываемой им болезни. Вирус обнаруживался в различных регионах Южной Африки, Юго-Восточной Азии, Индии, Австралии и Океании, странах Карибского бассейна [37].

Среди клинических форм ЛЗН встречаются инаппарантная, лихорадочная, менингеальная и эпидемическая. Преобладание инаппарантных форм болезни на некоторых территориях, по всей видимости, обусловлено наличием у местного населения высокой иммунной прослойки [26 — 28, 36].

Через несколько суток после попадания ВЗН в организм человека в крови начинают формироваться IgM, перестающие обнаруживаться примерно через 2 месяца. IgG продолжают циркулировать в кровяном русле в течение нескольких лет [24]. Постинфекционный иммунитет у переболевших ЛЗН напряженный и стойкий [19, 31].

В Российской Федерации, начиная с 1999 г., крупные вспышки ЛЗН возникали преимущественно на территории юга европейской части страны в Волгоградской, Астраханской и Ростовской областях. В период с 1997 по 2014 гг. в этих трех регионах ЛЗН заболели соответственно 1265, 555 и 203 человека [1, 20, 28, 35, 36, 39, 40]. Показатель смертности при этом составил около 10% от общего количества заболевших.

Помимо вышеперечисленных территорий случаи заболевания ЛЗН в разные годы в количестве не более 10 человек регистрировались в республиках Адыгея, Калмыкия, Карелия, Мордовия, Татарстан, Краснодарском, Пермском, Ставропольском краях, Белгородской, Калужской, Курской, Московской, Новосибирской, Омской, Оренбургской, Пензенской, Самарской, Тамбовской, Ульяновской областях, а также в Москве и Санкт-Петербурге. В Воронежской области, граничащей с территориями Волгоградской и Ростовской областей, в 2010 г. было выявлено 27 больных ЛЗН (интенсивный показатель — ИП 1,2), в 2011 г. — 50 (ИП 2,1), а в 2012 г. — 38 (ИП 1,6). В соседней Липецкой области в 2012 г. заболевание диагностировано сразу у 35 человек (ИП 3,0). В Саратовской области, граничащей с Волгоградской областью, в 2014 г. зарегистрирован 31 случай ЛЗН (ИП 1,2). Всего за период 1999 — 2013 гг. маркеры ВЗН были обнаружены в 61 субъекте Российской Федерации [1, 35, 36, 39 — 41].

В последние годы начал осуществляться систематический контроль иммунной прослойки к ВЗН среди здорового населения. Результаты проведенных исследований сильно варьировали для различных территорий, в т.ч. в составе одного субъекта, а также в некоторых случаях отличались во времени в зависимости от фазы жизненного цикла популяции возбудителя, определяющего развитие эпидемического процесса. Например, при исследовании сывороток крови доноров, проведенном в 2002 г. в Лиманском районе Астраханской области, IgG к ВЗН были обнаружены у 71,4% лиц, тогда как в целом по региону этот показатель был более чем в 3 раза ниже — 20,8% [18]. Эти данные согласуются с результатами комплексных исследований по экологии вируса,

определивших нахождение эпицентра эндемичной для ЛЗН территории в среднем поясе дельты р. Волги [25].

Исследования крови здорового населения, проведенные в 2013 и 2014 гг., продемонстрировали, что IgG к ВЗН обнаруживались у людей, проживающих в различных регионах Российской Федерации: Астраханская область — 26,5% обследованных лиц в 2013 г. и 78,0% в 2014 г.; Волгоградская область — 14,0% в 2013 г. и 13,0% в 2014 г.; Ростовская область — 15,0% в 2014 г.; Самарская область — 12,5% в 2013 г.; Удмуртская Республика — 16,0% в 2013 г. и 17,0% в 2014 г.; Челябинская область — 32,0% в 2013 г.; Тюменская область — 34,0% в 2014 г.; Красноярский край — 18,0% в 2013 г. и 31,0% в 2014 г.; Кемеровская область — 10,5% в 2013 г. и 12,0% в 2014 г.; Республика Хакасия — 51,0% в 2014 г.; Республика Алтай — 64,0% в 2014 г. Существенные отличия в показателях за 2013 и 2014 гг. в некоторых субъектах могли быть связаны с выборкой доноров для обследования, проживающих на разных территориях внутри одного региона, о чем у авторов данной публикации отсутствуют сведения. Еще в ряде субъектов иммунная прослойка населения к ВЗН не превышала 10%: республики Адыгея, Бурятия, Дагестан, Калмыкия, Коми, Марий Эл, Татарстан, Забайкальский, Краснодарский, Ставропольский края, Архангельская, Брянская, Вологодская, Воронежская, Ивановская, Калининградская, Калужская, Курганская, Курская, Липецкая, Мурманская, Нижегородская, Новгородская, Новосибирская, Омская, Оренбургская, Орловская, Рязанская, Саратовская, Сахалинская, Смоленская, Ульяновская, Ярославская области, Еврейская автономная область, Санкт-Петербург [1, 2, 12, 35 — 39, 49]. При этом необходимо отметить, что встречаются сообщения об имеющих место перекрестных реакциях между различными флавивирусными инфекциями при выявлении к ним антител, что могло оказать определенное влияние (особенно в некоторых регионах, эндемичных, например, по клещевому энцефалиту) на специфичность результатов экспериментов.

Тем не менее, приведенные данные свидетельствуют об активности природных очагов ЛЗН и циркуляции ВЗН не только на территориях Южного и Приволжского федеральных округов, но и в Сибирском и Уральском федеральных округах. Наличие высокой иммунной прослойки у населения в некоторых регионах объясняет низкие показатели заболеваемости ЛЗН, а также преобладание инapparантной формы течения болезни.

Впервые КГЛ описана как отдельная нозологическая единица в 1945 — 1947 гг. по материалам эпидемической вспышки 1944 г., когда в степных районах Крыма было зарегистрировано свыше 200 случаев тяжелого острого лихорадочного заболевания с резко выраженными геморрагическими проявлениями. Инфекционный агент передавался через укусы иксодовых клещей. Позже было установлено, что сходные патологии отмечались и в других регионах СССР: в республиках Азербайджан, Армения, Казахстан, Киргизия, Таджикистан, Туркмения, а также в южной части РСФСР — в Краснодарском и Ставропольском краях, в Астраханской и Ростовской областях [33].

Возбудитель КГЛ — вирус из семейства Bunyaviridae, рода *Nairovirus*. Природные очаги инфекции расположены в Европе, Азии и Африки, в местностях полупустынной, степной, лесостепной и пойменной зон [33, 42]. Кратковременное появление IgM у больных КГЛ в кровяном русле позволяет диагностировать заболевание на начальных его этапах, спустя 1 — 3 недели в

крови накапливаются IgG, сохраняющиеся длительное время, а в единичных случаях до 10 — 20 лет [42].

На юге европейской части России находится единый природный очаг КГЛ, охватывающий территории 10 субъектов Южного и Северо-Кавказского федеральных округов [22, 30]. В 2014 г. вновь отмечено наличие природного очага в Крымском федеральном округе [13]. Установлено, что в распространении на большие расстояния клещей — переносчиков инфекции, их личинок участвуют птицы из семейства врановых, в первую очередь грачи [15, 29, 33, 46].

Эпидемические проявления КГЛ на юге России регистрировались с 1999 г. Общее количество заболевших в регионе за период 1999 — 2014 гг. составило 1745 чел. (в т.ч. Ставропольский край — 631 чел., Ростовская область — 486, Республика Калмыкия — 303, Астраханская область — 148, Волгоградская область — 121, Республика Дагестан — 48, Республика Ингушетия — 6, Карачаево-Черкесская Республика — 2), из них 75 летальных случаев [6, 7, 9, 10, 11, 17, 21, 22, 33].

Анализируя заболеваемость населения КГЛ на территориях Южного и Северо-Кавказского федеральных округов, следует отметить, что эпицентр эпидемического процесса находится на территории Республики Калмыкия, численность жителей в которой примерно в 10 и 15 раз меньше, чем в Ставропольском крае и Ростовской области соответственно. Эта тенденция отмечена и в 2015 г., когда ИП в Республике Калмыки составил 3,18 на 100 тыс. населения, а в Ставропольском крае — 1,54.

Иммунная прослойка к вирусу Конго-Крымской геморрагической лихорадки (ККГЛ) среди здорового населения, проживающего на территории природного очага, не столь выражена, как в очагах ЛЗН. При исследовании в 2003 г. крови доноров, жителей юга России, специфические IgG были обнаружены в 1,5% проб. Данные по отдельным субъектам и территориям колебались в пределах 1,5 — 5,0% (Республика Ингушетия — 5,0% по результатам срининговых анализов 2005 — 2009 гг.; Ставропольский край — 4,7% в 2011 г.; Ростовская область — 1,9% в 2011 г. в целом по региону, а в Волгодонском районе области — 3,84%). В результате проведенных в 2011 г. исследований крови доноров, проживающих в Саратовской области, IgG к вирусу ККГЛ обнаружены в 5,9% проб, при этом была установлена зависимость показателя иммунной прослойки населения от ландшафтно-географической зоны проживания [3, 5, 8, 14, 16, 43, 49].

Наличие иммунной прослойки к ВЗН и вирусу ККГЛ у здорового населения в различных субъектах свидетельствует о распространенности природных очагов этих опасных инфекций на территории России, однако сведения о количестве IgG в крови встречаются лишь в единичных работах по оценке напряженности иммунитета. В 2010 — 2012 гг. проведен ряд экспериментов по определению специфических антител у доноров, проживающих в регионе Кавказских Минеральных Вод Ставропольского края. В итоге IgG к ВЗН был выявлен у 4,1% лиц в титрах от 1:1600 до 1:51200, IgG к вирусу ККГЛ — у 4,8% в титрах от 1:200 до 1:51200 [5, 14]. Исследования сывороток крови доноров, проведенные в Республике Ингушетия в 2002 — 2009 гг., показали наличие в пробах IgG к вирусу ККГЛ в титрах от 1:100 до 1:6400 [16]. Сравнение результатов количественной оценки антител к ВЗН у здорового населения Ставропольского края выявило, что в районах с высокими показателями за-

болеваемости титры IgG в сыворотке крови составили от 1:3200 до 1:12800, тогда как в районах с низкой заболеваемостью они были на уровне от 1:100 до 1:3200 [2].

Таким образом, существующая иммунная прослойка к ВЗН и вирусу ККГЛ среди здорового населения, проживающего на территории ареалов обитания патогенов, способствует снижению показателей заболеваемости ЛЗН и КГЛ. Эти сведения, на наш взгляд, могут использоваться в качестве базовой основы для получения из имеющих достаточно высокий титр антител сывороток крови доноров новых специфических иммунобиологических препаратов для этиотропного лечения и профилактики данных заболеваний.

В настоящее время препараты, созданные на основе специфических анти-вирусных иммуноглобулинов, широко применяются в практической медицине, особенно в отношении инфекций, к которым отсутствуют вакцины для формирования искусственного активного иммунитета. При этом многочисленные клинические наблюдения показали преимущества человеческих иммуноглобулинов по сравнению с аналогами, полученными из сыворотки крови животных, в связи с тем, что при использовании последних увеличивается риск развития у людей различных патологических состояний [31, 48].

Еще в середине XX века М.П. Чумаков для лечения КГЛ использовал сыворотки реконвалесцентов, которые оказывали лечебный эффект только на 1 — 3 сутки после появления первых симптомов заболевания. Однако определение специфических антител и их титров в данных сыворотках не проводилось. Имеется ряд работ по разработке экспериментальных препаратов для пассивной и активной иммунизации против вируса ККГЛ [4, 34]. Проведенные исследования свидетельствуют, что благоприятное влияние на течение инфекционного процесса при КГЛ оказывает введение больным неиммунного человеческого иммуноглобулина, стимулирующего биосинтез тромбоцитов, число которых резко снижается при данном заболевании [47].

Таким образом, в настоящее время существует теоретическая основа для разработки специфических препаратов для лечения и профилактики ЛЗН и КГЛ с последующим их внедрением в практику. В качестве сырья могут быть использованы сыворотки крови здоровых доноров, проживающих на территории природных очагов с наиболее интенсивным эпидемическим процессом: для ЛЗН — это Астраханская и Волгоградская области; для КГЛ — Республика Калмыкия, Ставропольский край и Ростовская область. Величина титров IgG в отобранных сыворотках, на наш взгляд, должна быть не ниже аналогичных коммерческих препаратов, например, «Имуноглобулин человека против клещевого энцефалита» («НПО «Микроген»), который получают при иммунизации людей соответствующей вакциной [45]. Титры антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) к вирусу клещевого энцефалита в данном препарате не менее 1:80, а титры в иммуноферментном анализе превышают соответствующие показатели в РТГА в 10 — 40 раз [23]. Следовательно, для получения из сывороток крови доноров иммуноглобулиновых препаратов против ЛЗН и КГЛ титры специфических IgG в ИФА должны быть от 1:800 и выше. При этом выделенные иммуноглобулины будут представлять концентрированный препарат в титрах, значительно превышающих исходные показатели.

Использование в качестве сырья крови здоровых доноров позволит также

существенно упростить этап доклинических испытаний созданных препаратов, что будет способствовать их скорейшей коммерциализации. Актуальность специфических иммуноглобулинов для лечения и профилактики ЛЗН и КГЛ несомненна как на территории нашей страны, так и за рубежом, где подобные препараты также отсутствуют.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.А., Смелянский В.Ю., Путинцева Е.В. и др. Эпидемиологическая ситуация по лихорадке Западного Нила в 2011 году на территории Российской Федерации и прогноз ее развития. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 1: 17-21.
2. Афанасьева Е.Е. Лихорадка Западного Нила на юге России: современные эпидемиологические проявления и совершенствование методов выявления возбудителя. Дисс. канд. мед. наук. Ставрополь, 2010.
3. Варфоломеева Н.Г., Ермаков А.В., Василенко Н.Ф. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым вирусным инфекциям на территории Ставропольского края. Проблемы особо опасных инфекций. 2011, 2: 16-18.
4. Василенко Н.Ф., Ефременко В. И., Тюменцева И.С. и др. Способ выявления вируса Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ) в биологическом и полевом материале. Патент РФ № 2276362, 2006.
5. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Ермаков А.В. и др. Серологический мониторинг арбовирусных инфекций на территории Ставропольского края. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2013, 8 (1): 70-72.
6. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Тохов Ю.М. и др. Эпидемиологическая обстановка по Крымской геморрагической лихорадке на юге России в 2010 г. и прогноз на 2011 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2011, 1: 13-15.
7. Василенко Н.Ф., Смоленский В.Ю., Волынкина А.С. и др. Особенности эпидемиологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2011 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 1: 22-23.
8. Водяницкая С.Ю. Крымская геморрагическая лихорадка в современный период (на примере Ростовской области). Автореф. дисс. канд. мед. наук. Саратов, 2005.
9. Волынкина А.С., Котенев Е.С., Лисицкая Я.В. и др. Крымская геморрагическая лихорадка в Российской Федерации в 2014 г., прогноз эпидемиологической обстановки на 2015 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 1: 42-45.
10. Волынкина А.С., Котенев Е.С., Малецкая О.В. и др. Эпидемиологическая ситуация по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2012 г. и прогноз на 2013 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 1: 30-33.
11. Волынкина А.С., Пакскина Н.Д., Яценко Е.В. и др. Анализ эпидемической ситуации по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2013 г. и прогноз на 2014 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2014, 2: 40-43.
12. Галкина И.В. Распространение арбовирусов в Поволжье. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 1991.
13. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в республике Крым и городе Федерального значения Севастополе в 2014 году». Симферополь, 2015. <http://82.gospotrebnadzor.ru/s/82/files/documents/Gosdoklad/132866.pdf> (дата обращения 20.01.16).
14. Ермаков А.В. Совершенствование эпидемиологического надзора за трансмиссивными природно-очаговыми инфекциями в регионе Кавказских Минеральных Вод. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Ставрополь, 2013.
15. Ефременко В.И., Брюханова Г.Д., Бейер А.П. и др. Актуальные проблемы профилактики Крымской геморрагической лихорадки. Журн. микробиол. 2005, 4 (приложение): 34-38.
16. Картоев А.А. Эпидемиологические и эпизоотологические аспекты Крымской геморрагической лихорадки в республике Ингушетия. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Ставрополь, 2011.
17. Картоев А.А., Василенко Н.Ф., Малецкая О.В. и др. Изучение природной очаговости Крымской геморрагической лихорадки в республике Ингушетия. Проблемы особо опасных инфекций. 2009, 2: 14-16.

18. Ковтунов А.И., Колобухина Л.В., Москвина Т.М. и др. Заболеваемость и зараженность населения Астраханской области лихорадкой Западного Нила в 2002 г. Вопросы вирусологии. 2003, 5: 9-11.
19. Колобухина Л.В., Львов Д.К. Лихорадка Западного Нила. Руководство по медицинской вирусологии. Д.К. Львов (ред.). М., МИА, 2008.
20. Красовская Т.Ю., Щербакова С.А., Шарова И.Н. и др. Изучение циркуляции вируса Западного Нила на территории Саратовской области в 2010 году. Проблемы особо опасных инфекций. 2011, 3: 13-17.
21. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Антоненко А.Д. и др. Актуальные вопросы эпиднадзора за Крымской геморрагической лихорадкой. Проблемы особо опасных инфекций. 2008, 1: 5-9.
22. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф. и др. Крымская геморрагическая лихорадка в Евразии в XXI веке: эпидемиологические аспекты. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2012, 3: 42-53.
23. Ладыженская И.П., Воробьева М.С., Саркисян К.А. и др. Выявление специфических иммуноглобулинов класса G в препарате иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита методом ИФА. Биопрепараты, профилактика, диагностика, лечение. 2013, 3 (47): 26-35.
24. Ларичев В.Ф., Бутенко А.М., Русакова Н.В. и др. Показатели специфических антител у реконвалесцентов, перенесших лихорадку Западного Нила. Вопросы вирусологии. 2002, 6: 11-13.
25. Львов Д.К., Ковтунов А.И., Яшкулов К.Б. и др. Особенности циркуляции вируса Западного Нила (Flaviviridae, Flavivirus) и некоторых других арбовирусов в экосистемах дельты Волги, Волго-Ахтубинской поймы и сопредельных аридных ландшафтах (2000 — 2002 гг.). Вопросы вирусологии. 2004, 3: 45-51.
26. Львов Д.К., Савченко С.Т., Алексеев В.В. и др. Эпидемиологическая ситуация и прогноз заболеваемости лихорадкой Западного Нила на территории Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2008, 1: 10-12.
27. Львов Д.Н. Популяционные взаимодействия возбудителей лихорадки Западного Нила и других арбовирусных инфекций с членистоногими переносчиками, позвоночными животными и людьми в среднем и нижнем поясах дельты Волги. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 2008.
28. Львов Д.Н., Щелканов М.Ю., Джаркенов А.Ф. и др. Популяционные взаимодействия вируса Западного Нила (Flaviviridae, Flavivirus) с членистоногими переносчиками, позвоночными животными, людьми в среднем и нижнем поясах дельты Волги. Вопросы вирусологии. 2009, 2: 36-43.
29. Малеев В.В., Галимзянов Х.М., Бутенко А.М., Черенов И.В. Крымская геморрагическая лихорадка. М., 2003.
30. Малецкая О.В., Щербакова С.А., Бейер А.П. и др. Принципы стандартизации диагностики и современные особенности Крымской геморрагической лихорадки на территории Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 2 (112): 55-58.
31. Медицинская вирусология. Руководство. Д.К. Львов (ред.). М., МИА, 2008.
32. Москвитина Э.А., Забашта М.В., Пичурина Н.Л. и др. Лихорадка Западного Нила в Ростовской области: эколого-эпидемиологические особенности вспышки 2010 года. Проблемы особо опасных инфекций. 2011, 4: 31-35.
33. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П. Крымская геморрагическая лихорадка. М., ГОУ ВУНМЦ, 2005.
34. Платонов А.Е., Малеев В.В., Санникова И.В. и др. Крымская геморрагическая лихорадка в Евразии в XXI веке: вопросы патогенеза и лечения. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2012, 6: 46-58.
35. Путинцева Е.В., Антонов В.А., Викторов Д.В. и др. Особенности эпидемической ситуации по лихорадке Западного Нила в 2012 г. на территории Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 1: 25-29.
36. Путинцева Е.В., Антонов В.А., Смелянский В.П. и др. Особенности эпидемической ситуации по лихорадке Западного Нила в 2013 г. в мире и на территории Российской Федерации.

- Федерации и прогноз ее развития в 2014 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2014, 2: 33-39.
37. Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Алексеев В.В. и др. Распространение лихорадки Западного Нила в мире и Российской Федерации в 2010 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2011, 1: 38-41.
 38. Путинцева Е.В., Смелянский В.П., Антонов В.А. и др. Прогноз эпидемиологической ситуации по лихорадке Западного Нила на территории Российской Федерации на 2010 год. Проблемы особо опасных инфекций. 2010, 2: 14-17.
 39. Путинцева Е.В., Смелянский В.П., Пак В.П. и др. Эпидемическая ситуация по лихорадке Западного Нила в 2014 г. в мире и на территории Российской Федерации и прогноз ее развития в 2015 году. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 1: 36-41.
 40. Распространение лихорадки Западного Нила на территории Российской Федерации за период 1997-2010 гг. (по данным Управлений Роспотребнадзора по субъектам РФ, статистические материалы). http://entomologs.ru/lzn_podrobno.php (дата обращения 12.01.16).
 41. Сборник материалов по вспышке лихорадки Западного Нила в Российской Федерации в 2010 году. Г.Г. Онищенко (ред.). Волгоград, Волга-Паблицер, 2011.
 42. Смирнова С.Е. К 60-летию изучения Крымской-Конго геморрагической лихорадки. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2005, 6: 45-51.
 43. Смирнова С.Е. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка, этиология, эпидемиология и лабораторная диагностика. Дисс. докт. мед. наук в виде научного доклада. М., 2003.
 44. Терновой В.А., Щелканов М.Ю., Шестопапов А.М. и др. Выявление вируса Западного Нила у птиц на территории Барабинской и Кулундинской низменностей (Западно-Сибирский пролетный путь) в летне-осенний период 2002 г. Вопросы вирусологии. 2004, 3: 52-56.
 45. Фармакопейная статья предприятия ЛС-001279-010811. Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, раствор для внутримышечного введения. 2013.
 46. Харченко Т.В. Современные эпидемиологические особенности Крымской геморрагической лихорадки в Российской Федерации. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Ставрополь, 2011.
 47. Черенков И.В. Особенности клиники, диагностики и лечения Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ) на современном этапе. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 2006.
 48. Черкасский Б.Л. Глобальная эпидемиология. М., Практическая медицина, 2007.
 49. Щербакова С.А., Найденова Е.В., Билько Е.А. и др. Выявление специфических антител к карбовирусам в сыворотках крови людей, проживающих на территории Саратовской области. Проблемы особо опасных инфекций. 2011, 2: 72-74.

Поступила 23.06.16

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

ЧУМА: СЛУЧАИ ИНФИЦИРОВАНИЯ ЛЮДЕЙ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ США И СЛОЖНОСТЬ ИХ ВЫЯВЛЕНИЯ

Ростовский-на-Дону противочумный институт

В работе проанализированы эпидемические ситуации по чуме в Соединенных Штатах Америки, связанные с внутригосударственной миграцией — заражение в природном очаге и перемещение больного в пределах этого очага в другой округ, штат или в неэндемичную зону, а также межгосударственные перемещения заразившегося человека в инкубационном периоде.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 94—100

Ключевые слова: чума, эпидемиология

Yu.I.Arutyunov

PLAGUE: CASES OF HUMAN INFECTION IN THE USA NATURAL FOCI AND THE DIFFICULTY OF THEIR DETECTION

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control

In this work we analyze the epidemic situations with plague in the United States of America, which are linked to internal migration — infection in a natural focus and movement of a diseased person within the boundaries of this focus to another district, state or non-endemic territory, as well as with international migration of infected person during incubation period.

Zh.Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 94—100

Key words: plague, epidemiology

Чума — природно-очаговая зоонозная инфекция. Человек заражается при вторжении в зону природного очага в результате хозяйственной деятельности (строительство дорог, градостроительство, прокладка трубопроводов, аграрное производство, животноводство и др.), отдыха (охота, кемпинг, туризм, посещение заповедника и пр.) или при проникновении зараженных животных (диких, домашних) и блох в жилище человека. В случае заражения, как правило, во всех перечисленных ситуациях человек заболевает бубонной или септической формой чумы. Эти формы болезни не опасны для окружающих, но при позднем обращении за медицинской помощью или в результате самолечения заболевание может осложниться вторичной чумной пневмонией. Эта форма может возникнуть непредсказуемо быстро. Следовательно, любая форма чумы представляет большую опасность как для самого больного, так и для окружающих. Первично-легочная чума явление довольно редкое, но крайне опасное. Она возникает при разбрызгивании и вдыхания аэрозоля, содержащего возбудитель. Такое явление может быть связано с лабораторным заражением, при разделывании тушек больных животных, когда капли жидкости в виде аэрозоля могут попасть в организм препарирующего (охотник, кулинар, ветеринар) или в результате контакта с больным легочной формой человеком или животным. Диагноз может быть легко установлен, если заболевание

проявилось при выявленной эпизоотии чумы в природе или на эндемичной территории при отсутствии выраженной эпизоотии. Определенную сложность представляют ситуации, установленные вне зоны природного очага. В этом случае быстрота постановки диагноза зависит от настороженности медицинской службы в целом, опыта и квалификации врача.

Выявление больного легочной формой чумы рассматривается как чрезвычайная ситуация в отношении санитарно-эпидемиологического благополучия населения [3]. В настоящее время, когда межгосударственные отношения насыщены массовыми международными мероприятиями, официальным и неофициальным туризмом, учитывая существующие скорости транспортных средств, занос инфекции, в частности чумы, не является чем-то невероятным. Наличие активных природных очагов в южном полушарии свидетельствует о возможности заноса инфекции на территорию нашей страны и в зимний период.

Следует отметить, что возбудитель чумы в страны Южной и Северной Америки, в том числе в США, был завезен в конце XIX — начале XX веков. Первоначально она проявлялась в виде портовых эпидемий, связанных с зараженными синантропными грызунами. Такая ситуация складывалась до 1926 года. К этому времени возбудитель чумы проник в дикую природу, где стали формироваться природные очаги. Запад США в климатическом, ландшафтом, биоценотическом отношении оказался комфортным для укоренения возбудителя.

Основными носителями чумы в природных очагах США являются земляные белки — суслики рода *Citellus*, луговые собачки, хомяки, калифорнийские полевки и др. Зараженными чумой в дикой природе считаются более 50 видов млекопитающих [1].

Постепенно от западной оконечности страны чума стала перемещаться на восток, «отвоевывая» с каждым десятилетием все новые территории. В настоящее время граница проникновения ограничена 100–97° западного меридиана, охватывая западные округа штатов Северной и Южной Дакоты, Небраски, Канзаса, Оклахомы, Техаса. Причину ограничения распространения чумы далее усматривают в отсутствии крупных популяций сусликов и луговых собачек восточнее указанной долготы [Kartmann L., 1968], [11]. В еще недавно свободных от возбудителя чумы штатах Оклахома, Южная и Северная Дакота в настоящее время обнаруживают его присутствие. Отмечено, что в течение каждого десятилетия, в период с 1944 по 1993 гг., увеличивалось число штатов, в которых выявляли возбудителя [5, 7, 10]. Такая же тенденция отмечена в Отчете Генерального директора ВОЗ [4] — возбудитель чумы в США распространяется на восток в те местности, где в предыдущие 50 лет его не обнаруживали. Надзор за чумой в природе показал, что она распространялась в 1990-х годах на восток до районов, свободных от нее с периода наблюдения за дикими млекопитающими с 1930-х годов, что послужило основанием И.В. Домарадскому [2] предположить, что природные очаги чумы в этой стране продолжают свое формирование.

Такова общая тенденция становления природных очагов чумы в США и распространения возбудителя чумы с запада на восток. В Соединенных Штатах с 1965 по 2015 гг. ежегодно регистрируют от единичных до 40 случаев заражения людей чумой (в среднем 10 больных в год), что свидетельствует о высокой активности природных очагов.

Наиболее многочисленны и просты для диагностики случаи заболевания, связанные с выявлением больного по месту проживания на эндемичной территории, которые мы в данной работе не анализируем.

Целью работы было на примере Соединенных Штатов Америки рассмотреть случаи заражения чумой на энзоотичной территории и выявление больного в пределах этого же природного очага, но в другом округе или штате; случаи заражения людей в эндемичном очаге, но выявленные за пределами природного очага; случаи межгосударственной миграции больных чумой и сложность диагностики, связанные с этими ситуациями.

Так, в природном очаге чумы в штате Колорадо в округе Larimer во время отдыха 13 — 15 августа 2004 г. заразилась и заболела бубонной формой чумы 54-летняя женщина. Заболевание началось 16 августа по возвращению домой в округ Weld того же штата. Болезнь осложнилась пневмонией и, несмотря на предпринимаемые меры, больная скончалась [www.promedmail.org Archive N20040826.2380; N20041110.3035].

Аналогичная ситуация сложилась в 2006 г. в штате Калифорния. В округе Los Angeles заболела женщина 28 лет с образованием правостороннего подмышечного бубона. Установлено, что она разделявала кролика для домашнего потребления, доставленного из соседнего округа Kern, где при обследовании обнаружили этих животных павшими от чумы [www.promedmail.org Archive N20060826.2431].

В обоих случаях округа — места заражения — известны как эндемичные по чуме, и на их территориях неоднократно регистрировали заразившихся людей. В этой ситуации поставить диагноз «чума» для врачей было не сложно. Хотя в отсутствии эпизоотии на территории округов проживания больных такой диагноз мог вызвать затруднение.

Заслуживают внимания случаи, когда больных выявляли по месту проживания вне природного очага чумы. Так, в 2006 г. чумой заболел 39-летний мужчина, проживающий в округе Travis (штат Техас), который охотился на кроликов в округе Lea (штат Нью-Мексико), эндемичном по чуме. Заражение произошло во время разделки дичи [www.promedmail.org Archive N20060826.2431]. Необычность ситуации заключалась в том, что округ Travis расположен в центре штата Техас, где ранее не регистрировали ни эпизоотии, ни заболевания людей. Только в результате эпидемиологического расследования был поставлен правильный диагноз.

Следует отметить, что из 8 зарегистрированных больных в штате Техас за весь период наблюдения за чумой, вплоть до 2015 г., четверо заразились за его пределами. Кроме отмеченного выше эпизода 2006 г., три других установлены в 1957, 1966 и 1973 гг. В 1957 г. заразился чумой и умер житель округа Wichita. Заражение произошло в штате Колорадо в округе Boulder (округ расположен на севере штата) во время отдыха на природе, хотя эпизоотия в Колорадо не была установлена [9]. Округ Wichita расположен на крайнем востоке штата Техас, на границе со штатом Оклахома и не граничит со штатом Колорадо. Ни до, ни позже на территории округа Wichita чуму не регистрировали. Повидимому, все эти обстоятельства затруднили постановку диагноза, что привело к фатальному исходу.

Заболевание чумой, выявленное в штате Техас в 1966 г., рассматривается ниже, т.к. связано с межгосударственной миграцией.

В 1973 г. 64-летний житель штата Техас (округ El Paso) поступил в больницу с температурой 39,4°С, тошнотой, слабо выраженной миалгией. Из крови больного был выделен возбудитель чумы. Специфическая терапия антибиотиками позволила выписать больного через две недели. Предыдущий месяц больной провел на ранчо в округе Lincoln (штат Нью-Мексико), где брал руками мертвых грызунов. Это обстоятельство, а также, учитывая эндемичность по чуме территории штата Нью-Мексико, позволяет считать, что заражение произошло именно здесь [17]. Хотя округ El Paso штата Техас находится у самой границы штата Нью-Мексико, эпизоотии на его территории ни разу не были зафиксированы.

Что касается четырех других случаев заболевания людей в штате Техас, о них не имеется никаких сведений эпидемиологического характера, кроме констатации факта заражения. Все случаи зарегистрированы в разных округах, в которых ни разу не фиксировали эпизоотий чумы. И если заражение людей в округах Ector (1982 г.) и Winkler (1984 г.), можно объяснить приграничным расположением с территорией штата Нью-Мексико, то заболевания в округах Pecos (1988 г.) и Kent (1993 г.), расположенных вдали от энзоотичной территории, не нашли объяснения в официальных источниках. Вместе с тем, необходимо отметить, что в 5 округах Техаса, находящихся за рекой Пекос, в 1988 — 1991 гг. исследовано 55 диких ошейниковых свиной пекари. У трех (6%) обнаружены антитела к *Yersinia pestis* [6]. Можно предположить, что в приведенных эпизодах либо не были проведены тщательные эпидемиологические расследования с установлением места заражения, либо энзоотичная территория в штате Техас простирается шире, чем предполагается.

В штате Нью-Мексико зарегистрирована почти половина всех больных с подтвержденным диагнозом. Он же является «поставщиком» больных в другие штаты при заражении в природном очаге или в результате эпизоотии, распространившейся с его территории в округа соседних штатов. Кроме описанных выше примеров, проиллюстрируем это положение другими, не менее показательными эпизодами. В 1961 г. в штате Нью-Мексико заболел геолог 38 лет. Работая в окрестностях г. Санта Фе, поранил кожу, а вскоре поднялась температура и начались общие проявления болезни. Госпитализирован по месту жительства в Кембридже (Бостон, штат Массачусетс), где пациент умер. У больного обнаружена язва на руке и региональный лимфаденит. Гемокультура содержала гемолитический стрептококк и возбудителя чумы [12]. Необычность ситуации состояла в том, что в штате Массачусетс, расположенном на Атлантическом побережье, природные очаги чумы отсутствуют, и врачи не проявили настороженности в связи с местом пребывания и характером работы больного.

Еще один трагический случай произошел в 1983 г. У девочки 13 лет диагностировали чуму в штате Южная Каролина, когда она направлялась из округа Santa Fe (штат Нью-Мексико) домой в штат Мэриленд. Район, где она пребывала, расположен в энзоотичной по чуме зоне. Рентгенография грудной полости выявила разлитые легочные инфильтраты. Из пахового лимфоузла и крови выделены штаммы *Y. pestis*. Девочка скончалась [18].

Другой, не менее впечатляющий случай, связан с выявлением больных чумой в Нью-Йорке в 2002 г. После приезда супружеской пары (мужчина 53, женщина 47 лет) из Санта Фе (штат Нью-Мексико) в Нью-Йорк 1 ноября у

обоих появилась лихорадка и односторонняя аденопатия. Была диагностирована бубонная форма чумы. У мужчины она осложнилась септической формой с острой почечной недостаточностью и острым респираторным дистресс-синдромом. Потребовались гемодиализ и искусственная вентиляция легких. В связи с ишемией произведена ампутация стоп обеих конечностей. В отделении интенсивной терапии он провел шесть недель, затем был переведен в отделение долгосрочной реабилитации. Жена выздоровела без осложнений. Обследование по месту жительства позволило предположить, что заражение произошло на эндемичной по чуме территории [8].

В штате Монтана в 1992 г. чумой заболел охотник из штата Вайоминг. Заражение произошло при освеживании добытой им рыжей рыси. Больной скончался [www.promedmail.org Archive N20030911.2286]. В связи с этим случаем, следует отметить следующее. Эти штаты расположены в северной части страны и являются смежными. Но если в штате Вайоминг чума известна с 1978 г., то в штате Монтана за весь период, с 1927 по 2015 г., установлен один случай заражения в 1987 г. По нашему мнению, отсутствие данных о чуме в штате Монтана не позволило заподозрить инфицирование возбудителем чумы.

Еще один случай заноса чумы из штата Вайоминг отмечен в 2008 г., когда 18-летний бойскаут из штата Коннектикут заболел бубонной формой, работая в молодежном лагере. Точное место заражения не установлено, т.к. юноша посещал многие районы штата, в том числе Йеллоустоунский национальный парк. В этот год эпизоотия чумы в штате Вайоминг установлена в 22 из 23 округов [www.promedmail.org Archive N20080827.2672]. Штат Коннектикут, куда вернулся бойскаут, расположен на крайнем востоке страны, в котором чума отсутствует.

Похожая ситуация сложилась при перемещении больной из штата Колорадо, эндемичного по чуме, в штат Мичиган, в котором чума отсутствует. Женщина прибыла в штат Колорадо к родственникам на музыкальный фестиваль, проходивший 22 — 23 августа 2015 г. После фестиваля женщина самолетом вернулась домой 25 августа, а на следующее утро у нее поднялась температура. Лишь через два дня она обратилась к врачам. Чуму подтвердили по результатам исследования биоптата одного из лимфатических узлов. Больная сообщила, что заражение могло произойти во время прогулок по терренкуру в штате Колорадо. Этот случай аналогичен эпизоду из штата Джорджия (заражение произошло в штате Калифорния в 2015 г.) [www.promedmail.org Archive N20150911.3639675].

Случай заболевания, выявленный в Техасе в 1966 г., занимает особое место, т.к. связан с инфицированием человека во Вьетнаме. Военнослужащий 21 года прибыл в США 9 августа после годичной службы во Вьетнаме, а 15 августа в левой паховой области он обнаружил припухлость, и 29 августа был госпитализирован в больницу г. Даллас с диагнозом «ущемленная грыжа». В связи с подозрением на лимфому была сделана биопсия. При исследовании биоптата обнаружены биполярные палочки, и заподозрили чуму. Проба с флуоресцентными антителами и гистопатология подтвердили предполагаемый диагноз. Назначение стрептомицина с тетрациклином способствовали скорейшему снижению температуры. Военнослужащий был иммунизирован против чумы в сентябре 1965 г. и январе 1966 г. На военной службе он был в

составе бригады, разрушающей старые дома, обильно заселенными крысами. Он вспомнил, что держал павшее животное за хвост [13].

В 1990 г. чумой заболела 47-летняя женщина в штате Мэриленд после поездки в Боливию [19]. К сожалению, никаких подробностей по этому факту не приводится.

В заключение приведем еще один случай межгосударственного завоза чумы, хотя он не связан с Соединенными Штатами Америки. Санитарная медицинская служба Марселя 16 июня 1970 г. выявила больного с подозрением на бубонную форму чумы. Днем раньше группа из 26 индийских моряков прибыла самолетом из Бомбея, чтобы заступить на нефтетанкер, который был на ремонте в марсельском порту. Больной был родом из Мадраса, но в течение трех месяцев проживал в отеле в Бомбее. Самолетом через Тель-Авив, Афины и Рим группа прибыла в Марсель. Симптомы заболевания появились через двое суток. При поступлении диагноз был поставлен на основании клинических проявлений с последующим выделением штамма из пунктата лимфоузла [14 — 16]. В то же время, по данным ВОЗ больных в Индии не регистрировали с 1968 г. Сведений о состоянии эпизоотического процесса на территории Индии не приведены.

В представленной работе проанализированы некоторые эпидемические ситуации, связанные с внутригосударственной и межгосударственной миграцией больных чумой в США. Миграция таких больных носила разнообразный характер: перемещения больных из одного штата в другой в пределах эндемичной территории; переезд с эндемичной территории, на которой произошло заражение, в места (штаты), где чуму в природе никогда не регистрировали; межгосударственные перемещения заразившегося, в инкубационном периоде.

Даже для США, страны с высоким уровнем медицинского обслуживания, наличием подготовленных специалистов, налаженной лабораторной диагностикой не всегда удавалось быстро и правильно установить заражение чумой человека, что приводило к трагическим исходам. Не во всех случаях сами больные, проживающие в зоне природных очагов чумы США, несмотря на информацию о возникшей эпизоотии чумы на той или иной территории, адекватно оценивали создавшуюся ситуацию даже после инфицирования, что приводило к позднему обращению за медицинской помощью и летальному исходу. Современные средства перемещения позволяют заразившимся чумой людям в течение инкубационного периода оказаться вдали от места заражения. Недооценка этого фактора может привести к локальным вспышкам заболевания в случае осложнения болезни чумной пневмонией. От такого развития ситуации не застрахована ни одна страна мира, независимо от наличия или отсутствия на ее территории природных очагов чумы. Следует иметь в виду и потенциальную возможность использования *Y.pestis* при биотерроризме. Это свидетельствует о необходимости настороженности медицинских работников поликлиник и стационаров (независимо от профиля работы), постоянного совершенствования навыков диагностики заболевания путем проведения тренировочных занятий и теоретической подготовки.

Мы намеренно рассмотрели некоторые эпидемические ситуации в США, так как на протяжении длительного времени (с 1965 г. по настоящее время) в этой стране ежегодно регистрируют больных чумой людей. Проведение мас-

совых международных мероприятий в различных странах, в том числе в Российской Федерации, может явиться тем событием, когда инфекционный больной (в т.ч. чумой) ненамеренно явится источником болезни для окружающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнов Ю.И., Мишанькин Б.Н., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Тлатов А.Г. Чума в США Эпидемиол. инф. болезни. 2006, (1): 45-48.
2. Домарадский И.В. Чума. М., 1998.
3. Международные медико-санитарные правила (ММСП, 2005). ВОЗ, Женева, 2006.
4. Отчет о состоянии здравоохранения в мире, 1996 г. Отчет генерального директора. ВОЗ, Женева, 1996.
5. Barnes A.M. WHO Informal Consultation on Plague Surveillance and Control. BVI/1979. Working paper N1 — Geneva, 1979.
6. Gruver K.S., Guthrie J.W. Parasites and selected diseases of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the trans-Pecos region of Texas *J. Wildl. Dis.* 1996, 32 (3): 560-562.
7. Koster F.T. *Drag. Ther. Clin. Ther. Hosp.* 1984, 9 (9): 64-71.
8. Perlman D.C., Primas R., Raucher B. et al. Imported Plague — New York City, 2002. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2003, 52 (31): 725-728.
9. Plague in the Americas. WHO, Washington, 1965.
10. Tikhomirov E. Epidemiology and Distribution of Plague. *Plague Manual: Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control. WHO/CDS/CSR/EDS/99.2.* — Geneva, 1999.
11. Velemirovič B. *CRC Handbook Series in Zoonoses.* Vienna, 1979, 1: 560-596.
12. *Wkly Epidemiol. Rec. (WER).* 1961, (33): 365.
13. *Wkly Epidemiol. Rec. (WER).* 1966, (47): 608.
14. *Wkly Epidemiol. Rec. (WER).* 1970, (25): 273-274.
15. *Wkly Epidemiol. Rec. (WER).* 1970, (31): 326-327.
16. *Wkly Epidemiol. Rec. (WER).* 1970, (36): 382.
17. *Wkly Epidemiol. Rec. (WER).* 1973, (36): 357.
18. *Wkly Epidemiol. Rec. (WER).* 1983, (39): 301.
19. *Wkly Epidemiol. Rec. (WER).* 1991, (44) 321-324.

Поступила 25.04.16

Контактная информация: Арутюнов Юрий Иванович, к.м.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863)240-27-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Т.П.Шмелькова, Е.В.Сазанова, А.Л.Кравцов, Т.А.Малюкова,
Ю.А.Попов, А.В.Бойко, З.Л.Девдариани, Т.Н.Шуковская*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ СВОЙСТВ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ IN VITRO: СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Проанализированы различные методы оценки вирулентных свойств возбудителей инфекционных болезней in vitro: молекулярно-генетические, культурально-биохимические, иммунологические, физиологические. Отмечены преимущественное использование молекулярно-генетических методов, целесообразность комплексного подхода, актуальность поиска новых информативных показателей вирулентности. Исследование биологических свойств патогенов in vitro является первым скрининговым этапом оценки их вирулентности.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 100—108

Ключевые слова: вирулентность *in vitro*, патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности, методы оценки вирулентности

T.P.Shmelkova, E.V.Sazanova, A.L.Kravtsov, T.A.Malyukova,
Yu.A.Popov, A.V.Boiko, Z.L.Devdariani, T.N.Schukovskaya

DETERMINATION OF VIRULENCE PROPERTIES OF PATHOGENIC MICROORGANISMS *IN VITRO*: STATE-OF-ART

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

Various methods for evaluation of virulence properties of causative agents of infectious diseases *in vitro* were analyzed: molecular-genetic, cultural-biochemical, immunologic, physiologic. Predominant use of molecular-genetic methods, expediency of a complex approach, relevance of search of novel informative parameters of virulence are noted. Study of biological properties of pathogens *in vitro* is the first screening stage of evaluation of their virulence.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 100—108

Key words: *in vitro* virulence, pathogenic microorganism, virulence factors, methods of evaluation of virulence

Оценку вирулентности микроорганизмов и их эпидемической значимости проводят при лабораторной диагностике возбудителей инфекционных заболеваний в лабораториях регионального и федерального уровня (МУК 4.2.2870-11; 4.2.2939-11; 4.2.2940-11; 4.2.3010-12) при подготовке и проведении международных массовых мероприятий, эпидемиологическом расследовании чрезвычайных ситуаций биологического генеза [18]. При анализе клинического материала определение патогенного потенциала возбудителей оппортунистических и нозокомиальных инфекций необходимо для прогнозирования вероятности развития заболевания, риска возникновения осложнений при манифестной форме инфекции, а также при разработке новых технологий лабораторной диагностики, профилактики и терапии инфекционных болезней [4, 7].

«Золотым стандартом» методов оценки вирулентности является определение LD_{50} — средней смертельной (летальной) дозы микробных клеток, вызывающей гибель половины инфицированных животных. В качестве лабораторных животных чаще всего используют мышей, морских свинок, кроликов. Подбор лабораторных животных для определения вирулентности возбудителей антропонозных инфекций вызывает особую трудность [31]. При оценке вирулентности возбудителей зоонозных инфекций, таких как чума, для повышения информативности необходимо использовать два вида лабораторных животных — мышей и морских свинок (МУ 3.1.3.2355-08). Кроме того, в литературе представлены альтернативные биологические модели для определения вирулентных характеристик патогенов — растения, насекомые, простейшие [9, 27, 32, 41, 42, 49]. Однако вследствие различной физиологии не всегда данные о вирулентности возбудителя, полученные на биомоделях, отражают патогенность штамма для человека. Так, по составу и субстратной специфичности лейкоцитарных протеиназ, от которых зависит, в частности, чувствительность макроорганизма к бактериальным эндотоксинам, люди в значительной степени отличаются от мышей и морских свинок [11].

Единичные исследования по оценке вирулентных свойств патогенов *in vitro* появились еще в середине прошлого века [33], в настоящее время эта практика получила дальнейшее развитие, что объясняется не только гуманностью и этикой проводимых научных исследований, но и очевидной экономической целесообразностью.

Все методы, используемые при этом подходе можно разделить на молекулярно-генетические, культурально-биохимические, иммунологические, физиологические.

Молекулярно-генетические методы основаны на обнаружении генетических детерминант факторов патогенности. В 80-е годы прошлого века для этих целей применяли генетическое зондирование, в настоящее время, в основном, полимеразную цепную реакцию. Так, дифференциацию авирулентных и вирулентных штаммов *Yersinia pestis* проводят по выявлению генов *igp2* (остров патогенности хромосомной области пигментации), *hmsH* (*hms*-локус хромосомной области пигментации), *IcrV* (плазмида *pCad*) с использованием коммерческого набора реагентов [12, 15]. Токсигенность и эпидемическую значимость возбудителя холеры определяют по детекции генов холерного токсина *ctxAB* и токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA* [12]. Вирулентные штаммы *Bacillus anthracis* всегда несут плазмиды *pXO1* (ген *pagA* определяет синтез протективного антигена) и *pXO2* (ген *capA* — один из генов, необходимых для синтеза полиглутаминовой капсулы), вакцинные штаммы содержат одну плазмиду *pXO1*, авирулентные штаммы либо лишены этих плазмид, либо содержат только одну плазмиду *pXO2* [37]. Вирулентные штаммы возбудителя туляремии содержат ген *iglC*, который отвечает за синтез белка размером 23 кДа, играющего важную роль в персистенции патогена в макрофагах [30]. Инактивация гена *pdpD* приводит к снижению вирулентности *Francisella tularensis*, а гена *rdpA* — к аттенуированию штамма [38]. Для обнаружения патогенных буркгольдерий рекомендованы кластер генов *LPS*, кодирующий капсульный липополисахарид, гены системы III-типа секреции (*TTS1*), флагеллярный ген, *house-keeping* гены *pagK* и *gltB* [12]. А.Л. Гинцбург и др. [6] определяли генетические маркеры вирулентности условно патогенных энтеробактерий, ассоциированных с генами ингибиторов лизоцима и генотоксичности. Патогенные и сапрофитные лептоспиры различают по ПЦР-детекции гена — маркера вирулентности, кодирующего липопротеин внешней мембраны *LipL32* [17]. Вирулентности *Staphylococcus aureus* оценивают по наличию гена *agr*, регулирующего экспрессию ряда факторов патогенности [39], генов колонизации *clfA* и *clfB*, детерминирующих процесс прикрепления стафилококков к эпителиоцитам слизистой оболочки носовых ходов [20, 48]. Патогенность изолятов *Gardnerella vaginalis* характеризовалась экспрессией гена *vly*, определяющего синтез вагинолизина [24]. Потеря детерминант системы секреции VII типа (*ESX-1* системы) у *Mycobacterium tuberculosis* ведет к аттенуации штамма [25]. Генетические маркеры патогенности выявлены у возбудителей псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза (МУ 3.1.1.2438-09) и других патогенов. Во всех перечисленных выше примерах, как и во многих других случаях, детекцию генов вирулентности осуществляли посредством полимеразной цепной реакции со специфическими олигонуклеотидными праймерами. Кроме того, в последнее десятилетие детерминанты вирулентности выявляют с помощью секвенирования. Так, анализ полных нуклеотид-

ных последовательностей ДНК патогенных и непатогенных для человека видов бруцелл выявил отсутствие у непатогенных видов девяти областей генома, кодирующих вероятные факторы вирулентности [43].

Культурально-биохимические методы базируются на выявлении продуктов экспрессии генов вирулентности. Дифференциацию штаммов *Y. pestis* на вирулентные и авирулентные проводят по признаку пигментсорбции. На синтетической среде Джексона-Берроуза с геминимом или цветной дифференциально-диагностической полусинтетической среде HmsD вирулентные бактерии вырастают в виде небольших черно-бурых колоний (Pgm^+), а бактерии, утратившие вирулентность, образуют более крупные бесцветные колонии (Pgm^-) [12]. Е.И. Еременко др. [8] разделяют культуры *B. anthracis* на 5 групп: высоковирулентные, умеренно вирулентные, слабо вирулентные, авирулентные и апатогенные по продукции экзотоксина и капсулы. Регистрацию продукции капсулы проводят по морфологии колоний в атмосфере CO_2 и в обычных условиях. Капсулообразование сопровождается характерным ростом возбудителя в виде гладких слизистых колоний, в мазках из которых при микроскопии обнаруживаются капсульные бациллы. Продукция экзотоксина визуализируется по концентрическим ореолам иммунопреципитации в виде белых тонких колец при росте возбудителя на специальной среде «Сопэк» (среда для сочетанного определения продукции экзотоксина и капсулы). По образованию ободка (опалесцирующего просветления) вокруг колоний *Candida albicans* определяют наличие фосфолипидной активности патогена, необходимой для реализации его вирулентных свойств [7]. Дифференциацию патогенных и сапрофитных лептоспир проводят по результатам выращивания культур при температуре $13^\circ C$ или в присутствии 8-азагуанина. В этих условиях хорошо размножаются только сапрофитные лептоспиры [12]. Идентификацию вирулентных иерсиний — возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза — осуществляют по их способности к аутоагглютинации (образование рыхлого хлопьевидного осадка при культивировании в жидкой среде) и по отсутствию роста на средах с дефицитом кальция — кальцийзависимость роста (МУ 3.1.1.2438-09). Эпидемическую значимость холерных вибрионов с делением штаммов на токсигенные и атоксигенные оценивают по их липазной активности с помощью антилипидного диагностикума на полимерных сферах, триацилглицеролипидной активности возбудителя на плотных питательных средах [12]. Клинические изоляты *Enterococcus faecalis* способны к инактивации лактоферрина и антигемоглобиновой активности, что используют при дифференциации патогенных и апатогенных штаммов [19]. Вирулентный потенциал культур *S. aureus* определяют по ассоциированной с патогенностью антикарнозиновой активности [5]. Рибонуклеазная активность возбудителей сапронозных инфекций (*Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*), изолированных из клинического материала, была выше, чем у штаммов этих же видов, выделенных из объектов окружающей среды [1].

Иммунологические методы используют для оценки результатов взаимодействия изучаемых микроорганизмов с материалом макроорганизма-хозяина. Эпидемически значимые токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп в отличие от атоксигенных не лизируют эритроциты барана в пробе Грейга (МУК 4.2.2218-07), способны к адгезии эритроцитов крови человека в мазке [2]. В процессе инкубации штаммов *F.tularensis* в нормальной (неим-

мунной) сыворотке человека только клетки авирулентных штаммов взаимодействуют с комплементом сыворотки. Детекция реакции идет по высвобождению внутриклеточного фермента — кислой фосфатазы [12]. Кроме того, вирулентные и авирулентные штаммы *F. tularensis* обладают различной устойчивостью к бактерицидному действию нормальной сыворотки человека. Клетки вирулентных штаммов возбудителя туляремии в отличие от авирулентных после инкубации в сыворотке хорошо растут на плотной питательной среде [12]. Реакция агглютинации является экспресс-методом, позволяющим дифференцировать вирулентные штаммы *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* от авирулентных (МУ 3.1.1.2438-09). Для исследования патогенных и непатогенных штаммов *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* применяют ракетный иммуноэлектрофорез с целью обнаружения антигенного комплекса 8 — основного фактора патогенности возбудителей сапа и мелиоидоза [13]. Вирулентные штаммы *Y. pestis* характеризуются устойчивостью к перевариванию макрофагами [16]. Согласно нашим данным, клетки авирулентных штаммов *Y. pestis* не повреждают лейкоциты крови человека *in vitro*, тогда как клетки вирулентных штаммов вызывают гибель до 95% лейкоцитов по результатам проточно-цитометрического мониторинга ДНК-флуоресценции клеток крови после их взаимодействия с возбудителем чумы. Вирулентные штаммы *B. anthracis* отличают от авирулентных по длительности пребывания в цитоплазме макрофага. Выход вегетативных клеток вакцинного штамма СТИ-1 из макрофагов наблюдали через 24 часа инкубации, вегетативные клетки вирулентного штамма выходили из макрофагов к 6 часам [14]. Вирулентность *Porphyromonas gingivalis* оценивают при моделировании раневой инфекции *in vitro*. Возбудитель гингивитов, в отличие от других оральных бактерий, ингибирует миграцию эпителиальных клеток, следовательно, препятствует заживлению раны [34]. Патогенные штаммы *G. vaginalis* обладают большей цитотоксичностью по отношению к клеточной линии HeLa, чем непатогенные, и способностью замещать *Lactobacillus crispatus* в монослое клеток HeLa [24]. Высоковирулентные штаммы *Cryptococcus neoformans*, по сравнению со слабовирулентными, индуцируют более интенсивную выработку ИЛ-13, ИЛ-10 и ИЛ-17 перитонеальными макрофагами мышей [21]. Факторы вирулентности бактерий могут оказывать нейтрализующее влияние на активность нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) — одного из наиболее эффективных механизмов захвата и киллинга патогенных микроорганизмов [23]. A. Seper et al. [45] установили, что при колонизации кишечника возбудитель холеры продуцирует во внеклеточное пространство две нуклеазы — Dns и Xds для разрушения НВЛ. Все штаммы, дефектные по продукции данных нуклеаз, быстро погибают в нейтрофильных ловушках. Аналогичные нуклеазы выявлены и у *Streptococcus pneumoniae* [47]. Согласно Riyara D. et al. [44] повышенный уровень образования НВЛ регистрируют при контакте нейтрофилов с клетками *B. pseudomallei*, дефектными по синтезу полисахаридной капсулы и/или по продукции факторов вирулентности, относящихся к секреторной системе III типа. *Aspergillus fumigatus* продуцирует такие медиаторы вирулентности как экзополисахарид галактозаминогалактан и N-ацетил-галактозамин, повышающие устойчивость возбудителя к нейтрофильным ловушкам [35].

Физиологические методы основаны на изменении метаболизма вирулентных

штаммов патогенов. Согласно нашим данным, культуры вирулентных и авирулентных штаммов *Y. pestis* имеют различную динамику роста. Отмечен более скоростной выход (до 48 ч) клеток вирулентных штаммов возбудителя чумы из состояния репликации ДНК в отличие от клеток авирулентных штаммов, «задерживающихся» в экспоненциальной фазе роста, что, очевидно, соответствует понятию «быстрого» роста вирулентных штаммов в организме хозяина и увеличивает шансы развития инфекционного процесса. Выявлены различия в содержании суммарного белка и ДНК в клетках вирулентных и авирулентных штаммах *Legionella pneumophila*, отношение интенсивности красной флуоресценции (белок) к зеленой (ДНК) у авирулентных штаммов выше, чем у вирулентных [46]. Способность патогенных микроорганизмов к образованию биопленки также расценивают как один их факторов патогенности [28, 40, 50]. Но данное положение не однозначно, у пневмококков «биопленочные» клетки менее вирулентны, чем «планктонные» [10, 22]. Клинические изоляты *G. vaginalis*, выделенные от женщин с бактериальным вагинозом и без него, не имеют статистически установленной достоверности различий в индексах образования биопленки [24].

Таким образом, к настоящему времени апробирован и успешно используется широкий спектр подходов к оценке вирулентных свойств патогенных бактерий *in vitro*. В результате геномного, протеомного и серологического анализов возбудителей определяют ранее неизвестные факторы вирулентности [26, 29]. Проведенный анализ существующих технологий показывает полное доминирование молекулярно-генетических методов в числе прочих, но, кроме того, что проведение подобных анализов достаточно затратно, наличие генетических детерминант факторов патогенности не всегда сопровождается их фенотипическим проявлением. Следовательно, данные молекулярно-генетического тестирования необходимо подкреплять биохимическим типированием возбудителей. Однако только в условиях чувствительного организма возможно полное проявление возбудителем своего вирулентного потенциала, многообразия тактики, направленной на выживание патогена в агрессивной среде. В связи с этим, при оценке вирулентности *in vitro* используют комплексный анализ, сопоставляя его с результатами экспериментов на биомоделях. Например, при определении вирулентности клинических изолятов *Salmonella enteritidis* наряду с вычислением LD_{50} для мышей проводили анализ нескольких показателей вирулентности *in vitro*: выживаемость возбудителя в кислой среде, в активированных перитонеальных макрофагах мыши, в присутствии активированного кислорода и азота, в условиях дефицита питательных веществ (продолжительная стационарная фаза роста); способность к инвазии в клетки эпителия на модели клеточной линии HeLa [36]. При сравнительном анализе факторов персистенции (патогенности) вибрионов и аэромонад различной экотопической принадлежности определяли комплекс показателей: гемолитическую активность, липазную активность, лецитиназную активность, ДНКазную и РНКазную активность, антилизоцимную активность, активность против интерферона, антикомплементарную активность [3].

Исследование биологических (биохимических, генетических, физиологических) свойств патогенов в системе *in vitro* является первым скрининговым этапом оценки их вирулентности. Поиск информативных показателей виру-

лентности микроорганизмов актуален и имеет большой практический выход. В то же время, классический метод с использованием традиционных, адекватных для каждого конкретного возбудителя биомоделей, остается необходимым звеном лабораторной диагностики инфекционных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойко А.В., Бойко О.В. Рибонуклеазная активность бактерий как фактор персистенции некоторых возбудителей сапронозных инфекций. Журн. микробиол. 1997, 4: 71-73.
2. Брилис В.И., Брилине Т.А., Ленцер А.А., Ленцер Х.П. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. Лаб. дело. 1986, 4: 210-212.
3. Бухарин О.В., Бойко А.В., Журавлева Л.А. Факторы персистенции и (или) патогенности вибрионов и аэромонад различной экологической принадлежности. Журн. микробиол. 1998, 5: 30-33.
4. Бухарин О.В., Вальшева И.В., Карташова О.Л., Сычева М.В. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков. Журн. микробиол. 2013, 3: 12-18.
5. Бухарин О.В., Чернова О.Л., Матюшина С.Б. Способность стафилококков к инактивации карнозина. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999, 5: 545-546.
6. Гинцбург А.Л., Костюкова Н.Н. Аналитический обзор НИР, выполненных к 31 декабря 2013 г. в рамках комплексной проблемы, координируемой научным советом по микробиологии 46.0. Журн. микробиол. 2014, 4: 120-125.
7. Горовиц Э.С., Карпунина Т.И. Морфометрический анализ в оценке вирулентности *Candida albicans*. Клиническая лабораторная диагностика. 2005, 9: 29-30.
8. Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Фунтикова Т.Н. Способ дифференциации штаммов сибиреязвенного микроба по вирулентности *in vitro*. Патент РФ на изобретение 2101351, 1998.
9. Король Е.В., Меринова Л.К., Нехезина М.О., Шубникова Е.В. Цитотоксическое действие *Burkholderia serasia* на клетки *Tetrahymena pyriformis* при совместном культивировании. Вестник Волгоградского гос. мед. университета. 2014, 1 (49): 125-127.
10. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Пневмококковые био пленки как форма персистенции: образование, структура, роль в патогенезе, иммунный ответ. Журн. микробиол. 2015, 4: 55-62.
11. Кравцов А.Л. Проточно-цитофлуориметрическое исследование бактерицидных гранул в фагоцитах крови животных с различной видовой чувствительностью к экспериментальному заражению чумой. Журн. микробиол. 2015, 1: 23-31.
12. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев (ред.). М., 201.
13. Напалкина Г.М., Корсакова И.И., Храпова Н.П., Пивень Н.Н., Ломова Л.В., Булатова Т.В. Дифференциация патогенных и непатогенных буркхольдерий с помощью ракетного иммуноэлектрофореза. Проблемы особо опасных инфекций. 2010, 4 (106): 37-38.
14. Носков А.Н. Молекулярные аспекты патогенеза сибирской язвы. Журн. микробиол. 2014, 4: 92-101.
15. Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Кутырев В.В., Куклев В.Е. Набор и способ ускоренной идентификации чумного микроба с одновременной дифференциацией вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia pestis*, определением их плазмидного профиля. Патент РФ 2473701, 2013.
16. Пустовалов В.Л., Васильева Г.И., Киселева А.К. Устойчивость к фагоцитозу вирулентных штаммов чумного микроба в зависимости от температуры культивирования. Вопросы профилактики природноочаговых инфекций. Саратов, 1983, с. 16-21.
17. Самсонова А.П., Петров Е.М., Аляпкина Ю.С., Алексеева Н.В., Земская М.С., Терехов А.А., Гинцбург А.Л., Ананьина Ю.В. Ген, кодирующий липопротеин внешней мембраны LipL32, как генетическая мишень для разработки схем дифференциации и генотипирования лептоспир. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2008, 1: 3-8.

18. Специализированные противоэпидемические бригады (СПЭБ): эволюция научной концепции и практического применения. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев (ред.). ООО Буква, 2014.
19. Сычева М.В., Карташова О.Л. Биологические свойства энтерококков различного происхождения. Журн. микробиол. 2015, 2: 11-14.
20. Уткина Т.М., Попова Л.П., Карташова О.Л., Хазеева Г.Д., Халиуллина А.А. Фенотипическая характеристика и генетические детерминанты патогенности *Staphylococcus aureus*, выделенные у бактерионосителей, проживающих на территориях с разным уровнем антропогенного загрязнения воздушной среды. Журн. микробиол. 2015, 4: 35-40.
21. Филиппова Л.В., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е., Васильева Н.В., Киселева Е.П. Продукция цитокинов макрофагами при взаимодействии со штаммами *Sryctosoccus neoformans* разной вирулентности *in vitro*. Проблемы медицинской микологии. 2011, 3: 45-49.
22. Blachette-Cain K., Hinojosa C.A., Akula Suresh Babu R. et al. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation is strain dependent, multifactorial, and associated with reduced invasiveness and immunoreactivity during colonization. mBio. 2013, 4 (5): e00713-00745.
23. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004, 303: 1532-1535.
24. Castro J., Alves P., Sousa C. et al. Using an *in-vitro* biofilm model to assess the virulence potential of bacterial vaginosis or non-bacterial vaginosis *Gardnerella vaginalis* isolates. Scientific Reports. 2015, 5: doi: 10.1038/srep11640.
25. Champion P.A.D. Disconnecting *in vitro* ESX-1 secretion from mycobacterial virulence. J. Bacteriol. 2013, 195 (24): 5418-5420.
26. Clark T.R., Noriega N.F., Bublitz D.C. et al. Comparative genome sequencing of *Rickettsia rickettsii* strains that differ in virulence. Infect. Immun. 2015, 83: 1568-1576. doi: 10.1128/IAI.03140-14.
27. D'Argenio D.A., Gallagher L.A., Berg C.A. et al. *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. J. Bacteriol. 2001, 183: 1466-1471.
28. 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.
29. Gat O., Grosfeld H., Ariel N. et al. Search for *Bacillus anthracis* potential vaccine candidates by a functional genomic-serologic screen. Infect. Immun. 2006, 74 (7): 3987-4001. doi: 10.1128/IAI.00174-06.
30. Golovliov I., Ericsson M., Sandström G. et al. Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. Infect. Immun. 1997, 65 (6): 2183-2189.
31. Humphrey T.J., Williams A., McAlpine K. et al. Isolates of *Salmonella enteritidis* PT4 with enhanced heat and acid tolerance are more virulent in mice and more invasive in chickens. Epidemiol. Infect. 1996, 117: 79-88.
32. Inglis T.J.J., Rigby P., Robertson T.A. et al. Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape. Infect. Immun. 2000, 68 (3): 1681-1686.
33. King E.O., Frobisher M., Parsons E.I. *In vitro* test for virulence of *Corynebacterium diphtheriae*. Amer. J. Public Health and Nation's Health. 1949, 39 (10): 1314-20. doi: 10.2105/AJPH.39.10.1314.
34. Laheij A., Loveren C., Deng D. et al. The impact of virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* on wound healing *in vitro*. J. Oral Microbiol. 2015, 7: 27543. <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v7.27543>.
35. Lee M.J., Liu H., Barker B.M. The fungal exopolysaccharide galactosaminogalactan mediates virulence by enhancing resistance to neutrophil extracellular traps. PLoS Pathog. 2015, 22. doi: 10.1371/journal.ppat.1005187.
36. Lu S., Manges A.R., Xu Y. et al. Analysis of virulence of clinical isolates of *Salmonella enteritidis* *in vivo* and *in vitro*. Infect. Immun. 1999, 67 (11): 5651-5657.
37. Mock M., Fouet A. Anthrax. Annu. Rev. Microbiol. 2001, 55: 647-671.

38. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C. et al. A Francisella tularensis pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J. Bacteriol.* 2004, 186 (19): 6430-6436. doi: 10.1128/JB.186.19.6430-6436.2004.
39. Novick R.P., Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* 2008, 42: 541-546.
40. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000, 54: 49-79.
41. Panayidou S., Ioannidou E., Apidianakis Y. Human pathogenic bacteria, fungi, and viruses in *Drosophila*: Disease modeling, lessons, and shortcomings. *Virulence.* 2014, 5 (2): 253-269.
42. Rahme L.G., Ausubel F. M., Cao H. et al. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, 97: 8815-8821.
43. Rajashekara G., Glasner J.D., Glover D.A. et al. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 2004, 186 (15): 5040-5051.
44. Riyara D., Buddhisa S., Korbsrisate S. et al. Neutrophil extracellular traps exhibit antibacterial activity against *Burkholderia pseudomallei* and influenced by bacterial and host factors. *Infect. Immun.* 2012, 80 (11): 3921-3929.
45. 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.
46. Tyndall R.L., Hand R.E., Mann R.C. et al. Application of flow cytometry to detection and characterization of *Legionella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 49 (4): 852-857.
47. Wartha F., Beiter K., Albiger B. et al. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell. Micro.* 2007, 9: 1162-1171.
48. Wertheim H.F., Waish E., Choudhury R. et al. Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. *PLoS Med.* 2008, 5 (1): 17.
49. Williamson D.A., Mills G., Johnson J.R. et al. In vivo correlates of molecularly inferred virulence among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in the wax moth *Galleria mellonella* model system. *Virulence.* 2014, 5 (3): 388-393.
50. Yoong P., Cywes-Bentley C., Pier G.B. et al. 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 16.06.06

Контактная информация: Шмелькова Татьяна Петровна, к.б.н.,
410005, Саратов, Университетская, 46, р.т. (8452) 51-52-30

© Л.В.ПУЗЫРЕВА, А.Д.САФОНОВ, 2016

Л.В.Пузырева, А.Д.Сафонов

ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА-БАРРА, У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Омский государственный медицинский университет

Обзор посвящен особенностям клинических проявлений инфекции, вызываемой вирусом Эпштейна-Барра (ВЭБ) у ВИЧ-инфицированных пациентов, вопросам диагностики и проведению противовирусной терапии в случае сочетания данных инфекций. У лиц на стадии СПИД развиваются опухолевые образования, ассоциированные с ВЭБ: неходжкинские лимфомы, в том числе лимфома Беркитта, первичная В-клеточная лимфома ЦНС, назофарингеальная карцинома. Известно, что возникновение лимфоидных интерстициальных пневмонитов и лейкоплакии ассоциировано с ВЭБ. В настоящее время известен большой перечень препаратов, являющихся ингибиторами репликации ВЭБ, однако нет четкой патогенетически обоснованной схемы лечения больных с данной инфекцией на фоне ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барра, инфекционный мононуклеоз, ВИЧ-инфекция, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта, первичная В-клеточная лимфома ЦНС, назофарингеальная карцинома, лечение вируса ВЭБ

L.V.Puzyreva, A.D.Safonov

INFECTIONS CAUSED BY EPSTEIN-BARR VIRUS IN HIV-INFECTED PATIENTS

Omsk State Medical University, Russia

The review is dedicated to features of clinical manifestations of infections caused by Epstein-Barr virus (EBV) in HIV-infected patients, problems of diagnostics and execution of anti-viral therapy in the case of combination of these infections. Individuals at AIDS stage develop tumors, associated with EBV: non-Hodgkin's lymphomas, including Berkitt's lymphoma, primary B-cell lymphoma of CNS, nasopharyngeal carcinoma. Formation of lymphoid interstitial pneumonitis and leukoplakia is known to be associated with EBV. A large list of preparations that are inhibitors of EBV replication are currently known, however, there is no clear pathogenetically justified therapy scheme for patients with this infection against the background of HIV-infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 108—116

Key words: Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, HIV-infection, non-Hodgkin's lymphoma, Berkitt's lymphoma, primary B-cell lymphoma of CNS, nasopharyngeal carcinoma, EBV therapy

В современном мире герпесвирусные инфекции широко распространены среди населения. Герпес-вирусы способны поражать практически все органы и системы человека, вызывая латентную, острую и хроническую формы инфекции, во всех этих случаях оказывая существенное влияние на состояние иммунной системы организма. Есть мнение, что индуцированные вирусными инфекциями иммунодефициты необходимо выделять как самостоятельные состояния — «предболезни» [3, 10].

В последние годы произошел подъем заболеваемости ВИЧ-инфекцией [9, 11, 13, 18], что также определяет значимость изучения инфекций герпес-вирусами, поскольку ВИЧ-инфекция сопровождается развитием оппортунистических заболеваний, среди которых герпесвирусные инфекции занимают одно из главных мест [1]. У ВИЧ-позитивных лиц происходит активация ВЭБ, существующих в организме в латентной форме, приводя к генерализация процесса с множественными поражениями, в том числе к злокачественным новообразованиям [2, 21].

Течение инфекции, вызываемой ВЭБ на фоне ВИЧ-инфекции, представляет собой большой интерес и требует изучения, разработки новых методов диагностики и адекватных подходов к проведению профилактической и лечебной противовирусной терапии в случае сочетания этих инфекций.

ВЭБ представляет собой В-лимфотропный вирус человека, относящийся к семейству Herpesviridae, подсемейству Gammaherpesviridae и роду Lymphocryptovirus согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов (2005). Вирус содержит ДНК, имеющую форму двойной спирали. Вирион состоит из капсида в форме икосаэдра, окруженного оболочкой, со-

держатель липиды. В процессе репликации вируса можно обнаружить антигены вируса: ранний антигенный комплекс (ЕА), антигены вирусного капсида (VCA), ядерный антиген (ЕВНА) и антигены мембраны (LMP). В настоящее время установлены две клеточные линии вируса — ВЭБ-1 и ВЭБ-2 (известные также как тип А и тип В). Эти штаммы вируса распространены повсеместно и имеют различия в экспрессии генов в течении латентной инфекции, но не имеют различий в клинической симптоматике и течении заболевания [39].

Источник инфекции — больной клинически манифестными формами инфекционного мононуклеоза человек, в том числе и больные со стертыми формами болезни, представляющие наибольшую эпидемиологическую опасность.

Большинство авторов придерживаются мнения, что основной механизм передачи инфекции — аэрогенный, реализующийся воздушно-капельным путем. Ворота инфекции является ротоглотка. Фактор передачи — контаминированная вирусом слюна. Возможно заражение через содержащие вирус пищевые продукты, а также бытовым путем через руки и предметы обихода. В литературе имеются сведения об исследованиях, подтверждающих возможность гемотрансфузионного пути передачи ВЭБ [30]. Есть данные о возможности полового пути передачи и выделении ВЭБ из секрета цервикального канала и спермы [31]. Описаны редкие случаи трансплацентарной передачи ВЭБ, при которых происходило поражение сердца, глаз, печени плода. Некоторые авторы говорят о возможности интранатальной передачи ВЭБ при прохождении ребенка по родовым путям. Вертикальный путь передачи изучен недостаточно, однако доказано, что грудное молоко кормящих матерей может содержать ВЭБ [18].

Первичной инфекции подвержены преимущественно дети раннего возраста. В раннем возрасте инфекция обычно протекает в легкой форме, не имеет специфических проявлений и клинически незаметна. Вторая волна сероконверсии к вирусу начинается с подъемом социальной активности в подростковом периоде и молодом возрасте. К окончанию подросткового возраста большинство людей являются уже сероположительными. Вирус выделяется во внешнюю среду из ротоглотки в течение 18 месяцев после первичной инфекции. Затем выделение вируса периодически наблюдается у всех серопозитивных лиц при отсутствии клинических симптомов. У 15 — 25% здоровых серопозитивных лиц вирус выделяют из смывов ротоглотки, а у иммунодефицитных, в т. ч. ВИЧ-инфицированных — в 25 — 50% случаев [2].

Доказано повышение восприимчивости к ВИЧ-инфекции при острой инфекции ВЭБ. Это связано с увеличением количества ССR-5 хеморецепторов, отвечающих за проникновение ВИЧ в CD4+ клетки [2, 19]. Реактивация латентной инфекции ВЭБ у больных с ВИЧ-инфекцией на фоне развития иммунодефицита может происходить в любом возрасте [10].

По данным литературы первичная репликация вируса происходит в эпителии слизистой оболочки ротоглотки, носоглотки, протоках слюнных желез и в лимфоидных образованиях. Далее вирус начинает диссеминировать гематогенным и лимфогенным путем, поражая В-лимфоциты.

Была доказана связь между В-лимфоцитами и развитием заболевания, вызванного ВЭБ [29, 35], у детей с врожденным генетическим заболеванием

— болезнью Брутона, характеризующейся отсутствием В-лимфоцитов. При этом в ряде других научных статей описывается поражение ВЭБ плоского, железистого эпителия, гладкомышечных клеток, НК-клеток, моноцитов, макрофагов. Но тем не менее, основными резервуарами ВЭБ являются В-лимфоциты.

Пораженные В-лимфоциты начинают под влиянием мутагенов вируса интенсивно пролиферировать и трансформироваться. В инфицированных вирусом клетках возможно два вида размножения: литический, приводящий к лизису клетки-хозяина, и латентный, когда число вирусных копий небольшое и клетка не разрушается, а вирус в них находится пожизненно. В результате взаимодействия вируса и макроорганизма происходит активация механизмов апоптоза, адгезии, активация Т-лимфоцитарных реакций и распознавание чужеродных антигенов [20]. На основе этих нарушений, по мнению многих авторов, формируется вторичный иммунодефицит, способствующий формированию аутоиммунных и опухолевых процессов [12]. В связи с незавершенным иммунным ответом вирус может персистировать в организме, приводя к развитию хронических форм заболевания [8].

Наиболее типичной формой заболевания, вызываемой ВЭБ, является инфекционный мононуклеоз. Ежегодно в мире инфекционным мононуклеозом заболевают от 16 до 800 лиц на 100 тыс. населения. В России есть данные о регистрации 40 — 80 случаев инфекционного мононуклеоза на 100 тыс. [8]. Инкубационный период — 5 — 15 дней. Заболевание начинается остро с ознобом, лихорадкой. Отмечаются боли в горле при глотании, одновременно нарастает интоксикация, слабость, недомогание, миалгии. У части больных наблюдается эритематозно-розеолезная сыпь (25%). Характерным признаком, описанным в литературе, является увеличение лимфоузлов, что наблюдается у 90% больных и сохраняется в среднем около 3 недель. У 40% больных наблюдается гепато- и спленомегалия. Болезнь может протекать в легкой, среднетяжелой и тяжелой формах. Инфекционный мононуклеоз у большинства больных заканчивается выздоровлением через 2 — 4 недели. Однако у ВИЧ-инфицированных возможно развитие фатального инфекционного мононуклеоза с тяжелыми осложнениями, которые могут привести к смерти. Нарастают тяжелые иммунологические или гематологические нарушения, приводящие к ряду осложнений: аутоиммунная гемолитическая анемия, тромбоцитопения, гранулоцитопения, перикардит, миокардит, менингит, менингоэнцефалит, миелит, нейропатия, разрыв селезенки [33].

По данным литературы у ВИЧ-инфицированных пациентов часто наблюдаются случаи реактивации ВЭБ-инфекции [22]. У лиц на стадии СПИД развиваются опухолевые образования [15], ассоциированные с ВЭБ [24], например неходжкинские лимфомы [23], в том числе лимфома Беркитта, первичная В-клеточная лимфома ЦНС, назофарингеальная карцинома [14]. Также на фоне ВИЧ-инфекции у пациентов могут возникнуть такие ассоциированные с ВЭБ патологии, как лимфоидные интерстициальные пневмониты и лейкоплакии.

Лимфомы поражают любые органы, в частности органы желудочно-кишечного тракта, ЦНС, печень и костный мозг, слюнные железы, кости, сердце и перикард, легкие, кожу, молочные железы. При исследовании было установлено, что в 50% случаев у ВИЧ-инфицированных пациентов в опухо-

левых клетках В-клеточных лимфом обнаруживается ДНК ВЭБ [6]. По мнению некоторых исследователей, антигены ВЭБ выявляются с помощью иммуногистохимического метода в биоптатах диффузных В-крупноклеточных лимфом в 80% случаев [22]. При лимфоме Беркитта, возникающей на фоне ВИЧ, ДНК ВЭБ выявляют у 50% больных [27, 28]. Описано обнаружение ДНК ВЭБ в биоптатах опухолей у подавляющего большинства ВИЧ-инфицированных, страдающих первичной лимфомой ЦНС, при этом обнаружение ВЭБ методом ПЦР в ликворе считается диагностическим маркером [32].

Носоглоточная карцинома — злокачественная опухоль, локализуемая на латеральной стороне полости носа или в области среднего носового хода, прорастающая в носоглотку и дающая метастазы в подчелюстные лимфатические узлы. Нарушается носовое дыхание, затем появляются слизистогнойные выделения из носа, часто с примесью крови. Результаты исследований, устанавливавших связь между инфекцией ВЭБ и развитием носоглоточной карциномы, неоднозначны и противоречивы [26]. Наличие ВЭБ было доказано в опухолевых клетках носоглоточных карцином *in situ* [34]. Однако ВЭБ не был обнаружен ни в нормальных эпителиальных клетках носоглотки, ни в клетках, прилежащих к ВЭБ-позитивным опухолям [36, 38]. Некоторые авторы предполагают, что инфицирование эпителиальных клеток носоглотки ВЭБ происходит до начала инвазивного роста, то есть клетки могут становиться чувствительными к инфицированию ВЭБ в результате воздействия на них факторов окружающей среды.

У лиц с нарушениями иммунной системы на фоне ВИЧ-инфекции ВЭБ способен вызывать развитие лейкоплакии слизистых оболочек языка, полости рта, красной каймы губ, характеризующейся незлокачественным гиперпластическим поражением эпителиальных клеток, в которых активно размножается ВЭБ. Проведенные исследования позволили выявить ДНК ВЭБ в пораженных участках у лиц с ВИЧ-инфекцией с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*, что является доказательством значения ВЭБ в развитии данного заболевания [37].

Лимфоидные интерстициальные пневмониты встречаются преимущественно у детей, но также и у взрослых, инфицированных ВИЧ. Поражается ткань легких в виде инфильтрации альвеолярных септ лимфоцитами, плазматическими клетками и иммунобластами. При иммуногистохимических методах исследования биоптатов легких выявляется ДНК ВЭБ [25].

Диагноз ставится на основании характерных клинических, гистологических изменений. В неясных для диагностики случаях инфекционных заболеваний применяют иммунологические методы диагностики — определение в сыворотке крови иммуноглобулинов [4]. Используют реакцию иммунофлуоресценции с биопсийными клетками и сывороткой больных, иммуноферментный анализ на наличие антител к капсидному, ядерному и раннему антигенам ВЭБ [17]. Специфические методы лабораторной диагностики позволяют обнаружить ВЭБ-инфекцию: VCA ВЭБ является главным иммуногеном при первичном заражении, VCA IgM появляется на ранней стадии заболевания и через несколько месяцев исчезает. VCA IgG появляется несколько позже и сохраняется пожизненно. Наиболее специфичными и чувствительными маркерами острой инфекции являются IgG к EA, IgM к VCA и IgG к EBNA.

Наличие антител к EA было подтверждено у ВИЧ-инфицированных па-

циентов в 55% случаев, а в группе лиц, отрицательных на антитела к ВИЧ — в 16,6%. При этом 100% обследованных лиц как положительных на антитела к ВИЧ, так и отрицательных на антитела к ВИЧ являются носителями ВЭБ [2].

Еще один метод диагностики — определение ДНК ВЭБ в крови или слюне методом ПЦР. По данным исследования [6] течения ВЭБ-инфекции у пациентов, инфицированных ВИЧ, ДНК ВЭБ методом ПЦР была выявлена у 19 пациентов (90%); иммуноглобулины М методом ИФА были выявлены у 2 больных (10%). Такие данные свидетельствуют о ранней инфекции или реактивации ВЭБ-инфекции, а также доказывают наличие взаимосвязи между иммунодефицитом на фоне ВИЧ-инфекции и инфекцией ВЭБ.

Лечение инфекций, вызванных ВЭБ, сложно по следующим причинам: склонность к хронически рецидивирующему течению; возникновение иммуносупрессии у пациентов, особенно при длительном персистировании вируса; отсутствие высоко эффективных противогерпетических препаратов [5]. В литературе нет описания четкой патогенетически обоснованной схемы лечения больных с ВЭБ на фоне ВИЧ-инфекции. В настоящее время известен большой перечень препаратов, являющихся ингибиторами репликации ВЭБ в культуре клеток. По данным E.Gershburg, J.S.Pagano (2005) все современные препараты для лечения инфекции ВЭБ могут быть разделены на две группы:

I. Подавляющие активность ДНК-полимеразы ВЭБ: 1. ациклические аналоги нуклеозидов (ацикловир, ганцикловир, пенцикловир, валацикловир, валганцикловир, фамцикловир); 2. ациклические аналоги нуклеотидов (тенофовир, адефовир дипивоксил); 3. аналоги пирофосфатов (фоскарнет натрий); 4. 4-оксо-дигидрохинолины. II. Различные соединения, не ингибирующие вирусной ДНК-полимеразы (механизм изучается): марибавир, бета-L-5 урацил йододиоксолан, индолокарбазол [25].

Показаниями для лечения инфекционного мононуклеоза, вызванного ВЭБ, противовирусными препаратами являются: тяжелое осложненное течение болезни на фоне ВИЧ-инфекции, необходимость профилактики ВЭБ-ассоциированной В-клеточной лимфопрлиферации у пациентов с ВИЧ-инфекцией, ВЭБ-ассоциированная лейкоплакия.

При проведении исследования у пациентов с частотой рецидивирования простого герпеса более 8 раз в год и с превышением нормального уровня антител к ВЭБ курсовая монотерапия противогерпетическим препаратом фамцикловиром приводила к снижению уровня антителообразования ВЭБ, снижению частоты и длительности рецидивов простого герпеса, что доказывает его эффективность [16].

Некоторые авторы рекомендуют применять ацикловир (зовиракс), при поражениях нервной системы предпочтителен внутривенный способ введения препарата [25]. В комплексной терапии рекомендуется внутривенное введение иммуноглобулинов (гаммар-П, полигам, сандоглобулин, альфаглобин и др.).

Также применяют рекомбинантные альфа-интерфероны (интерферон альфа-2b, интерферон альфа-2a) [25]. В качестве индуктора интерферона при тяжелом течении рекомендуется использовать циклоферон (меглумина акридонат).

При опухолях одновременно используют цитостатики — циклофосфамид,

хлорметин, винкристин. От кортикостероидной терапии при таком сочетании инфекций рекомендуется воздержаться.

Залогом успешного лечения больного с инфекцией ВЭБ на фоне ВИЧ-инфекции являются комплексная терапия и строго индивидуальная тактика ведения как в стационаре, так и во время диспансерного наблюдения [25].

По мере прогрессирования ВИЧ-инфекции тяжесть течения инфекции ВЭБ усугубляется. Между вирусной инфекцией и недостаточностью иммунной системы существует патогенетическая взаимосвязь. Вирусная инфекция может сама по себе вызывать вторичный иммунодефицит, но с другой стороны, у ВИЧ-инфицированных пациентов вирусная суперинфекция становится причиной тяжелых, угрожающих жизни состояний в связи с усугублением иммунодефицита. Можно сделать вывод об однонаправленном действии двух этих инфекций на иммунную систему.

В заключение необходимо отметить важность изучения инфекции ВЭБ у ВИЧ-инфицированных, особенно на поздних стадиях заболевания. В настоящее время существуют некоторые сложности диагностики, вызываемой ВЭБ у больных с иммунодефицитом, в литературе не описаны схемы патогенетически обоснованной противовирусной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азовцева О.В. Особенности течения герпетической инфекции на фоне ВИЧ-инфекции. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2010, 2 (3): 37-41.
2. Аистова Л.Г., Проваторов В.Я., Калуцкий П.В. Встречаемость вирусов герпетической группы у ВИЧ-инфицированных лиц. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2015, 29 (4): 57-60.
3. Боровская Н.А., Маркелова Е.В., Скляр Л.Ф. Клиника и диагностика острой инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр. Тихоокеанский медицинский журнал. 2010, 3: 65-67.
4. Пилева Р.А., Хохлова З.А., Четет Ю.С., Арсененко А.С., Поволоцкая Л.М. Клинико-лабораторная характеристика инфекционного мононуклеоза, обусловленного вирусом Эпштейна-Барр. Казанский медицинский журнал. 2014, 95 (5): 722-725.
5. Горайнова Л.К. Герпесвирусные инфекции. Поликлиника. 2013, (5): 25-28.
6. Давидович Г.М., Карпов И.А. Клиническое течение вирусной инфекции Эпштейна-Барр у пациентов с ВИЧ. Рецепт. 2007, 4: 115-117.
7. Калинина Н.М., Дрыгина Л.Б., Горейко Т.В. Современные представления об иммунопатогенезе инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барра. Инфекция и иммунитет. 2011, 1 (2): 121-130.
8. Краснов М.В. Инфекционный мононуклеоз у детей. Современные проблемы науки и образования. 2015, 2: 63-65.
9. Макашева Е.В., Конончук О.Н., Аксенова В.Я., Иванова Н.И., Черных Е.Р., Копылова И.Ф., Сафонов А.Д. Клинико-иммунологические проявления туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией в Кемеровской области. Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2007, 6: 59-62.
10. Медведев А.Ю., Валишин Д.А. Этиологические особенности ангин у больных, инфицированных вирусом Эпштейна-Барра. Медицинский вестник Башкортостана. 2011, 6 (3): 88-90.
11. Мордык А.В., Ситникова С.В., Пузырева Л.В., Радул В.В. Эпидемическая ситуация по туберкулезу и ВИЧ-инфекции в Омской области с 1996 по 2013 гг. Медицинский альманах. Эпидемиология. 2014, 32 (2): 62-64.
12. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Новикова В.И. Иммунодефицитные инфекционные болезни. Медицинские новости. 2011, 5: 6-13.
13. Пасечник О.А., Стасенко В.Л., Матушенко Е.В., Пиценко Н.Д. Клинико-эпидемиологическая характеристика ВИЧ-инфекции в Омской области. Современные проблемы науки и образования. 2015, (3): 88-92.

14. Пивник А.В., Пархоменко Ю.Г., Кривополов Ю.А. Соматические проблемы ВИЧ-медицины: СПИД-ассоциированные лимфомы. Онкогематология. 2007, 3: 27-37.
15. Пивник А.В., Шаркунов Н.Н. Лимфома Ходжкина. Медицинский совет. 2013, 5-6: 92-97.
16. Пичугина Л.В., Черноусова А.Д., Пинегин Б.В. Особенности системы IFN- γ у пациента с высоким рецидивированием простого герпеса. Цитокины и воспаление. 2005, 4 (3): 28-30.
17. Ратникова Л.И., Рухтина О.Л., Кинзерская Н.Г. Современные диагностические и клинические аспекты инфекции, обусловленной вирусом Эпштейна-Барра. Известия высших учебных заведений. Уральский регион. 2012, 4: 197-201.
18. Сафонов А.Д., Копылова И.Ф., Конончук О.Н., Краснов А.В., Матушенко А.А., Шулькина Е.К. Анализ эпидемиологических особенностей сочетанной формы туберкулеза и ВИЧ-инфекции на территориях, существенно отличающихся уровнем пораженности населения вирусом иммунодефицита человека. Омский научный вестник. 2006, 3 (37), III: 228-234.
19. Сафонов А.Д., Краснов А.В., Матушенко А.А., Арсененко Л.Д., Запарий Н.С. Герпетическая инфекция: клиника, диагностика, некоторые аспекты терапии у ВИЧ-инфицированных. СПб, Лисс, 2005.
20. Свинцова Т.А., Собчак Т.А., Корочкина О.В., Кравченко Г.А., Новиков В.В. Значение показателей иммунного ответа у больных ВЭБ-инфекционным мононуклеозом в прогнозировании течения и эффективности противовирусной и иммунокорректирующей терапии. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013, 1: 7-14.
21. Степанова Е.В. Герпесвирусные заболевания и ВИЧ-инфекция. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2009, 1 (2): 16-30.
22. Степанова Е.В. Герпесвирусные заболевания и ВИЧ-инфекция. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2010, 2 (1): 23-36.
23. Хайретдинов Р.К., Давыдкин И.Л., Кривова С.П., Данилова О.Е., Степанова Т.Ю., Рогова О.Е., Анисимова Е.В. Неходжкинские лимфомы у ВИЧ-инфицированных больных на фоне ВААРТ. Гематология и трансфузиология. 2014, 59 (1): 126-128.
24. Шестакова И.В., Ющук Н.Д. Роль вируса Эпштейна-Барра в онкогенезе. Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2014, 3: 75-86.
25. Шестакова И.В., Ющук Н.Д. Современные подходы к лечению Эпштейна-Барра вирусной инфекции у взрослых. Лечащий врач. 2011, 2: 98.
26. Яковлева Л.С., Сеньюта Н.Б., Степина В.Н. Вирус Эпштейна-Барра у больных раком носоглотки: варианты гена *lmp1*, гуморальный ответ и клинические проявления болезни. Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2012, 23 (1): 54-61.
27. Cohen J.I. Bening and malignant Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative diseases. Semin Hematol. 2003, 40 (2): 116-123.
28. David A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. New Engl. J. Med. 2004, 350 (13): 1328-1337.
29. Gully M.L., Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. J. Mol. Diagn. 2008, 10 (4): 279-292.
30. Hudnall S.D., Chen, T., Allison P. et al. Herpesvirus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction. Transfusion. 2008, 48 (6): 1180-1187.
31. Leigh R., Nyirjesy P. Genitourinary manifestations of Epstein-Barr virus infections. Curr. Infect. Dis. Rep. 2009, 11 (6): 449-456.
32. Moore A.L., Youle M., Lipman M. et al. Raised viral load in patients with viral suppression on HAART: transient increase or treatment failure? AIDS. 2002, 16: 615-618.
33. Okano M. Epstein-Barr virus in patients with immunodeficiency disorders. Biomed. Pharmacother. 2001, 55 (7): 353-361.
34. Pathmanathan R., Prasad U., Sadler R. et al. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. New Engl. J. Med. 1995, 333: 693-698.
35. Ryan J.L., Fan H., Glaser S.L. et al. Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. J. Mol. Diagn. 2013, 6 (4): 378-385.
36. Sam C.K., Brooks L.A., Niedobitek G. et al. Analysis of Epstein-Barr virus infection in na-

- sopharyngeal biopsies from a group at high risk of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer.* 1993, 53: 957-962.
37. Sitki-Green D., Edwards R.H., Webster-Cyriaque J. et al. Identification of Epstein-Barr virus strain variants in hairy leukoplakia and peripheral blood of a heteroduplex tracking Fssay. *J. Virol.* 2002, 76 (19): 9645-9656.
38. Tao Q., Srivastava G., Chan A.C. et al. Evidence for lytic infection by Epstein-Barr virus in mucosal lymphocytes instead of nasopharyngeal epithelial cells in normal individuals. *J. Med. Virol.* 1995, 45: 71-77.
39. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer.* 2004, 4: 757-768.

Поступила 10.03.16

Контактная информация: Пузырева Лариса Владимировна, к.м.н.,
644050, Омск, ул. Химиков, 8А, р.т. (3812)40-45-20

© В.А.МАРКИН, В.Б.ПАНТЮХОВ, 2016

В.А.Маркин, В.Б.Пантюхов

ЛИХОРАДКА ЭБОЛА

48 Центральный НИИ МО РФ, Сергиев Посад, Московская обл.

Рассмотрены вопросы этиологии, таксономии и номенклатуры филовирусов, эпидемиологии, заболеваемости мало известного отечественным медикам особо опасного экзотического инфекционного заболевания — лихорадки Эбола. Выявлены отличительные особенности эпидемии 2013 — 2015 гг. в Западной Африке — наряду с беспрецедентно долгой ее продолжительностью не происходило снижения, как в предыдущих вспышках, ни вирулентности возбудителя, ни контагиозности инфекции при многочисленных генерациях от человека к человеку. Анализ данных литературы позволил предположить, что в процессе формирования эпидочага вирус Эбола изменяет свои свойства и циклически проходит последовательно несколько взаимосвязанных фаз: исходную фазу резервации в неизвестных экосистемах — животных, либо растительных, почвенных или водных; промежуточную фазу эпидемического распространения с первоначальным приобретением высокой вирулентности для людей, а затем ее снижения; завершающую фазу скрытной циркуляции апатогенного для людей возбудителя. Эта гипотетическая цепь естественных фазовых переходов вируса Эбола позволяет объяснить и увязать воедино феноменологию этого возбудителя — быстрое падение вирулентности и контагиозности для человека в очагах в динамике эпидемических вспышек, весьма высокую иммунную прослойку населения в нозоареале возбудителя в Африке, противоречащую сложившемуся представлению о его высокой летальности для человека.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 116—125

Ключевые слова: лихорадка Эбола, этиология, таксономия и номенклатура филовирусов, эпидемиология, формирование эпидочага, заболеваемость

V.A.Markin, V.B.Pantukhov

EBOLA FEVER

48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of Russian Federation, Sergiev Posad, Moscow region, Russia

Problems of etiology, taxonomy and nomenclature of filoviruses, epidemiology, morbidity with a little-known by Russian medics especially dangerous exotic infectious disease — Ebola fever are examined. Significant distinguishing features of 2013 — 2015 epidemic in West Africa were detected — along with its unprecedented length, a decline did not take place as in previous outbreaks,

neither causative agent virulence, nor infectivity of the infection during multiple generations from human to human. Literature data analysis allowed to assume that in the process of epidemic focus formation Ebola virus changes its properties and cyclically passes through several successive interconnected phases: an initial reservation phase in unknown ecosystems — animals, either plant, soil or water; intermediate phase of epidemic spread with primary acquisition of high virulence for humans, and then its decline; final stage of hidden circulation of causative agent that is apathogenic for humans. This hypothetical chain of natural phases' transitions of Ebola virus allows to explain and link together phenomenology of this causative agent — rapid fall of virulence and infectivity for humans in foci in dynamics of epidemic outbreaks, quite a high population immunity in nosoarea of the causative agent in Africa, that contradicts the established understanding of its high lethality for humans.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 116—125

Key words: Ebola fever, etiology, taxonomy and nomenclature of filoviruses, epidemiology, epidemic focus formation, morbidity

Впервые лихорадка Эбола была выявлена на африканском континенте в 1976 году. В последующие годы после небольшого перерыва она регулярно вызывала эпидемии в экваториальной Африке, сопровождавшиеся неизменно высокой летальностью, что по масштабности, контагиозности, клиническим проявлениям выдвинуло вирус Эбола в ряд наиболее значимых для мирового здравоохранения возбудителей. Совокупность особенностей — контагиозность, способность к изменчивости вируса, отсутствие приемлемых средств лечения и профилактики, сохранение опасности для мирового сообщества — все это позволяет отнести данную инфекцию к агрессивнейшим, а ее возбудитель — к одним из наиболее вирулентных для человека.

Вспышки лихорадки Эбола наносят существенный экономический урон — так, ООН признала, что для борьбы с продолжающейся в 2015 году эпидемией в Западной Африке требуется не менее 1 млрд долларов США, из которых только на обеспечение средствами защиты и лабораторные реактивы требуется 25 млн [9]. Стоимость лечения каждого пациента в клинике США обошлась более чем в 500 000 долларов [9]. По подсчетам Всемирного Банка экономикам Гвинеи, Либерии и Сьерра-Леоне в 2014 году был нанесен урон более чем в 2 млрд долларов [9]. В 2014 году сенат США выделил на борьбу с лихорадкой Эбола более 5,5 млрд долларов, из них — около 3 млрд — на усиление мер защиты в США и около 2,5 млрд — на помощь странам Западной Африки.

Сложившаяся ситуация вызвала повышенный интерес к эпидемиологии лихорадки Эбола и ревизию взглядов на таксономию филовирусов и их номенклатуру.

Этиология. Геном вируса Эбола — одноцепочечная неинфекционная не-сегментированная молекула РНК отрицательной полярности, молекулярной массы $4,2 \times 10^6$ г.моль⁻¹. Гены расположены линейно: NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L; все гены, за исключением гена GP, кодируют по одной полипептидной цепи; между генами VP35 и VP40, GP и VP30, VP24 и L имеются участки перекрывания. Анализ нуклеотидных последовательностей геномов филовирусов Эбола и Марбург выявил ряд гомологичных районов [33].

Вирионы плеоморфны, в основном, нитевидной формы (диаметр нитей — около 80 нм), средней длиной в пределах 974 — 1086 нм (встречаются и до

12 000 нм); состоят из центральной структуры — нуклеокапсида и липидной оболочки, в их состав входят семь структурных белков. Наиболее инфекционными считают нитевидные частицы вируса Эбола длиной 805 нм [33].

Рибонуклеопротеидный комплекс имеет диаметр 45 — 50 нм и состоит из РНК и четырех белков: нуклеопротеина NP, кофактора полимеразы VP35, минорного компонента нуклеокапсида VP30 и РНК-зависимой РНК-полимеразы — белка L. Оболочку образуют матриксные белки — минорный VP24 и VP40. На поверхности вириона имеются глобулярные структуры в виде шипов, образованные трансмембранным гликопротеином GP. Инфицированные клетки под воздействием генома возбудителя синтезируют и секретируют также и неструктурные вирусспецифические функционально активные гликопротеины sGP, ssGP, дельта-пептид, GP1 и GP_{1,2} дельта [32 — 35].

Поверхностный гликопротеин GP осуществляет связывание вирусной частицы с наружными рецепторами клетки-мишени и опосредует проникновение вируса внутрь клетки. Внутривидовая гомология белка GP вируса Эбола — около 60%, внутривидовая с вирусом Марбург — около 30%. Синтез GP осуществляется ступенчато с последовательным образованием ряда промежуточных продуктов — первичный продукт трансляции preGP в итоге расщепляется на большую N-концевую GP₁ и малую C-концевую субъединицу GP₂. Белок GP₁ в мономерной форме из клетки частично секретируется как sGP. Субъединица GP₁ осуществляет связывание с поверхностными рецепторами клетки и активирует трансмембранную субъединицу GP₂, которая опосредует слияние вирусной и клеточной мембран [3, 29, 30, 32 — 35].

Таксономия и номенклатура. В соответствии с решением таксономического комитета по вирусам [32] род *Filovirus* семейства *Filoviridae*, входящего в порядок *Mononegavirales*, состоит из двух видов возбудителей — вируса Эбола и вируса Марбург. Филовирусы Марбург и Эбола имеют сходную структуру, а вызываемые ими заболевания близки по патогенезу, клиническим проявлениям, тяжести и исходу. У вируса Эбола выделяют две сложившиеся группы (клады) штаммов, вызывавшие наибольшее количество вспышек — заирскую (обозначены по вспышкам — Zaire, Kikwit, Mayinga и др.) и суданскую (*Boniface, Maleo, Gulu* и др.), а также другие штаммы, вызывавшие единичные вспышки. По очередному решению таксономического комитета по вирусам [33] видовое название филовирусов (вирус Эбола, вирус Марбург) трансформировано в родовое — род Эбола, род Марбург. Популяции, представляемые ранее как штаммы, по-новому номинированы как виды вирусов, а штаммы — как изоляты (например, род *Ebola*, вид *Zaire ebolavirus*: изолят *Ebola virus* — *Mayinga, Zaire, 1976*). Основанием для подобного решения явились данные по анализу гена гликопротеина GP, выявившие различия в составе нуклеотидов вирусов Эбола и Марбург от 37 до 41 %. Сиквенс геномов изолятов на внутривидовом уровне показал вариацию в пределах 2 % [33]. Соответственно этому, к роду *Ebola* отнесено 4 вида вирусов: *Zaire ebolavirus, Sudan ebolavirus, Reston ebolavirus, Cote d'Ivoire ebolavirus* (вирусы Эбола Заир, Судан, Рестон и вирус Эбола Кот-д'Ивуаре). В 2012 г. в Уганде был выделен вирус *Bundibugyo ebolavirus* (Бундибугио), а в 2013 г. в Испании от летучих мышей был выделен еще один новый вид вируса Эбола — *Lloviu*

ebolavirus (Лловиу), которые было предложено считать самостоятельными видами [24].

Вирус Эбола, вызвавший эпидемию 2013 — 2015 гг. в Западной Африке (штамм Guinea), отнесен исследователями к заирской группе [6]. По предварительным данным выделенные от больных изоляты имеют гомологию с заирскими штаммами по гену GP на уровне 94% [19], их биологические свойства в доступной литературе до настоящего времени не описаны.

На текущий момент таксономический комитет по вирусам предлагает включить в род Ebolavirus 5 видов возбудителей — Zaire ebolavirus, Sudan ebolavirus, Reston ebolavirus, Bundibugyo ebolavirus, Tai forest ebolavirus, различающихся, в основном, по географическому распространению, а все семейство разделить на три рода — genus Ebolaviridae, genus Marburgviridae, genus Cuevavirus, представленный единственным вирусом Lloviu [8].

По патогенности для человека штаммы вируса Эбола существенно различаются. Так, для заирской группы штаммов уровень летальности в очагах составляет 68 — 95%, для суданской — 50 — 65%, Bundibugyo — 25 — 40%. Штамм Tai forest вызывает лишь лихорадочное заболевание, а Reston не вызывает у людей клинических признаков заболевания [13], патогенность штамма Lloviu не выявлена [24].

Несмотря на рекомендации таксономического комитета, в подавляющем большинстве статей по филовirusам, опубликованных в 2012 — 2015 гг., авторы придерживаются традиционной номенклатуры. В материалах таксономического комитета [32, 33] и в статьях, посвященных коллекционированию патогенов [2], однозначно указывается, что при ведении коллекций микроорганизмов культуры запрещено переименовывать, а при ссылках на использованные музейные материалы необходимо указывать их первоначально зарегистрированные наименования.

Эпидемиология. Первые вспышки лихорадки Эбола были зарегистрированы в 1976 г. в двух соседних регионах — Южном Судане и на севере Заира (ныне — Демократическая Республика Конго). В Заире эпидемия, вызванная штаммом Mayinga, длилась 9 недель, и было зарегистрировано 318 случаев заболевания, которые привели к 280 случаям смерти (88%). Заражения происходили по контактному и ятрогенному путям — в миссионерском госпитале передаче инфекционного агента способствовало многократное использование игл и шприцев без стерилизации. Передача вируса загрязненными шприцами и иглами была подтверждена на примере 85 семей. В Судане (вспышка вызвана штаммом Maleo) заболели 284 человека, умерли 151 (53%). Вспышка в Уганде в 2007 г. отличалась от предыдущих сниженной летальностью — из 149 заболевших умерли 37 человек (25%) [10, 13, 17, 36].

Всего в Экваториальной Африке до эпидемии 2013 — 2015 гг. было зарегистрировано более 35 вспышек и отдельных случаев инфицирования человека вирусом Эбола, в основном вызванными штаммами заирской и суданской групп: в Заире/Демократической Республике Конго (1976, 1977, 1995, 2007, 2008 — 2009, 2011, 2012, 2014, 2015 гг.), Судане (1976, 1979, 2004 гг.), Габоне (1994, 1996 — 1997, 2001 — 2002 гг.), Республике Конго (2001 — 2002, 2002 — 2003 гг.), Кот-д'Ивуаре (1994 г.) и Уганде (2000 — 2001, 2007 — 2008, 2011, 2012 гг.). В некоторых из вспышек заболели до полутысячи человек. После

2000 года время между вспышками начало сокращаться, а уровень заболеваемости возрос. Общее количество больных за этот период составило 2433 человека, из которых 1581 погиб (общая летальность для возбудителя в целом — 65%) [25].

Эпидемия лихорадки Эбола в Западной Африке 2013 — 2015 гг. началась на юго-востоке Гвинеи, а затем инфекция распространилась в близлежащие Сьерра-Леоне и Либерию. В данную эпидемию впервые было вовлечено городское население. На первых этапах в эпидемию вовлекались до 50 человек в неделю, а в стадии разгара (август—сентябрь 2014 г.) — до 500 — 600 человек; в дальнейшем в указанных странах заболеваемость постепенно пошла на спад, однако в середине 2015 г. регистрировали до десятка новых случаев заболеваний [25]. По состоянию на 2 декабря 2015 г. в западно-африканских странах зарегистрирован 28 601 случай заболевания с 11 300 летальными исходами (включая подтвержденные, вероятные и подозрительные), из которых 881 случай связан с медицинскими работниками (513 погибли) [9]. 9 мая 2015 г. ВОЗ объявила о завершении эпидемии в Либерии, однако 7 недель спустя там было выявлено еще несколько случаев заболевания и через 1,5 месяца — новые заболевшие. Либерию еще дважды объявляли свободной от инфекции, и последний период может быть завершён 05.02.2016 г. [9]. По требованиям ВОЗ о завершении эпидемий инфекционных заболеваний объявляют, как правило, по истечении двух инкубационных периодов, однако в случае лихорадки Эбола принято решение о введении дополнительного 90-дневного периода усиленного наблюдения.

Показатели заболеваемости на 100 тыс. населения в Гвинее, Сьерра-Леоне и Либерии соответственно составляют: для общего количества случаев — 28,0; 169,2; 251,5 и для подтвержденных случаев — 24,5; 127,0; 90,4 [12].

Одновременно с эпидемией в Западной Африке независимо от нее в Демократической Республике Конго с августа по ноябрь 2014 г. было зарегистрировано в общей сложности 66 случаев заболевания лихорадкой Эбола, вызванных штаммом заирской группы (38 подтверждено лабораторно), и 49 смертей. 21 ноября 2014 г. ВОЗ объявила об окончании этой вспышки [9]. Однако в июне 2015 г. сообщено о гибели четырех охотников из шести, заразившихся лихорадкой Эбола от убитой антилопы [9].

К середине 2015 г. выявлены случаи заноса возбудителя из основных эпидочагов Западной Африки в Нигерию (1 уехавший больной заразил 20 человек, из которых 8 погибли); Мали (от прибывшего больного ребенка заразились 8 человек, 6 из которых погибли); Италию (медсестра, прибывшая с эмигрантами); Германию (один больной из Африки); Индию (выявлен 1 переболевший эмигрант-носитель); зарегистрирован случай переезда больного из Гвинеи в Сенегал. Санитарными рейсами доставлены в госпитали США 27 человек, от которых заразились четыре медработника, один из которых погиб. В Испанию в госпиталь доставлены 3 больных, от одного из которых заразилась медсестра (погибла), одна больная медсестра была доставлена в Великобританию [25].

Вспышки лихорадки Эбола до эпидемии 2013 — 2015 гг. имели общие особенности — как в Заире, так и в Судане практически все первично инфицированные погибли, а далее в Судане до 4 генерации наблюдали летальность в

среднем 89%, при последующих трех — 38%, а при седьмой генерации — 0% (в среднем по вспышкам — 53%). Схожая картина была и в Заире, средний процент летальности среди больных составил 62% [1]. В этих вспышках было отмечено до 5 циклов передачи вируса в Заире и до 13 в Судане [17]. Естественное затухание эпидпроцесса связывают не с появлением достаточной иммунной прослойки населения (как при подавляющем большинстве заразных заболеваний), а вследствие снижения вирулентности циркулирующей популяции возбудителя. При этом отмечено и снижение контагиозности: в первых вспышках в Заире и Судане (исследовано 146 семей с больными, с которыми контактировали члены 1103 семей) частота передачи инфекции от первично зараженных составила 7,6%; на второй генерации — 4,4%, на третьей — 2,6%, на четвертой — 3,4% (в среднем 5,6%) [31]. В динамике же эпидемии в Западной Африке не происходило снижения ни вирулентности возбудителя, ни контагиозности инфекции при многочисленных генерациях от человека к человеку [25, 37].

За пределами Африки было выявлено еще три ареала филовирусов — в Центральной Америке, Центральной и Юго-Восточной Азии (Бангладеш, Филиппины, Индонезия, Китай) и в Европе (Испания). Первая из этих находок была сделана при обследовании сывороток индейцев из Панамы. Четыре из 200 образцов оказались позитивны к вирусу Эбола. Антитела к этому возбудителю были выявлены в сыворотках крови обезьян Нового Света [18], на Филиппинах и в Китае — летучих мышей и свиней [38]. В Испании вирус Эбола (штамм Lloviu) был выделен от летучих мышей [24].

В 1989 — 1992 гг. во время вспышек геморрагической инфекции в питомниках Италии и США среди обезьян из Филиппин был выделен апатогенный для человека штамм Reston, выделенный в 1989 г. на Филиппинах; в 2008 г. в Китае он вызвал эпизоотию среди свиней. Последующее серологическое обследование выявило в регионе антитела к возбудителю у 66,7 — 74% животных данного вида и у 6 человек из 141 обследованных. Считают, что заражение животных, вероятно, произошло в результате контакта с летучими мышами-крыланами, у которых также были обнаружены антитела к вирусу Эбола. На Филиппинах и в Индонезии выявлена иммунная прослойка к вирусу Эбола (6% из обследованных) в семьях, где содержали домашних обезьян [23, 38].

Полевые серологические исследования, проведенные около 30 лет назад, выявили в ареале филовирусов уровень серопозитивных лиц, достигающий 60% от числа обследованных, в том числе в регионах, где заболеваемости не отмечали. Так, в Либерии антитела к вирусу Марбург найдены у 18,1%, а к вирусу Эбола — у 10,6% обследованных; в Нигерии — у 39%, в отдельных местностях ЦАР — 61% лиц имели антитела к вирусу Эбола, а на острове Мадагаскар — 4,5% (во всех этих местах заболеваемости не отмечали) [14, 15]. Высокий уровень серопозитивной прослойки выявлен и в регионах с постоянной заболеваемостью — в Заире (Эбола — до 30%, Марбург — до 17%), Судане (Эбола — до 18%, Марбург — до 11%), Габоне (Эбола — до 10%), Камеруне (Эбола — до 33%), Кении (Эбола — до 10%, Марбург — до 4,6%). В лесных регионах уровень серопозитивных был до 19,1%, а в приозерных — 2,7%. Относительно серопозитивных к вирусу Эбола лиц можно отметить, что в одних и тех же местах выявлены иммунные как к заирскому, так и к суданскому штаммам

возбудителя. Так, у пигмеев ЦАР, среди которых 17,8% серопозитивны к вирусу Эбола, 61% имеют антитела к обоим подвидам возбудителя [16]. В отдельных регионах существенная доля серопозитивных (до 10%) имеет антитела одновременно как к вирусу Эбола, так и Марбург [15]. В некоторых очагах от 46 до 71% серопозитивных перенесли инаппарантную инфекцию [7].

Природный резервуар вируса Эбола не был выявлен в течение долгого времени — при обследовании в ареалах возбудителя растений, многочисленных видов птиц, членистоногих, млекопитающих и рептилий были получены отрицательные результаты [21, 28]. Позже фрагменты РНК вируса Эбола были обнаружены в трупах горилл, шимпанзе, антилоп, в некоторых видах отловленных фрукто- и насекомоядных летучих мышей, мелких грызунах и землеройках. Антитела против данного возбудителя были зарегистрированы у собак и летучих мышей. Выделить жизнеспособный вирус не удалось ни от одного из обследованных видов животных [24]. У крыланов *Rousettus aegyptiacus* одновременно присутствовали антитела к вирусам Эбола и Марбург [26].

В лабораторных условиях при введении вируса Эбола растениям, позвоночным и беспозвоночным животным только у некоторых видов летучих мышей удалось выявить размножение, длительную вирусемию и выделение возбудителя со слюной, мочой, фекалиями на фоне инаппарантного течения инфекции, вертикальной передачи возбудителя не установлено. По данным литературы около двух десятков видов летучих мышей могут быть потенциальными резервуарами вируса Эбола заирской группы, а также штаммов Reston и Lloviu [24].

В настоящее время потенциально опасными источниками вируса Эбола считают шимпанзе, горилл, летучих мышей, лесных антилоп и дикобразов, а также больных людей [20, 22, 24]. Грызунов рассматривают как вероятных (случайных) источников вируса. Членистоногие (комары, клещи) природным резервуаром, скорее всего, быть не могут, поскольку филовирусы в них в условиях эксперимента не размножались, но роль насекомых как возможных механических переносчиков этих возбудителей не исключают [23]. От вспышек лихорадки Эбола в очагах погибает до 95% горилл, 77% шимпанзе, а их популяция в Африке по этой причине сократилась на 60% [20].

Представляется, что периодические всплески заболеваемости филовирусными инфекциями в эндемичных районах Африки связаны со случайной передачей вируса от неустановленных до настоящего времени природных резервуаров инфекции чувствительному промежуточному хозяину (летучей мыши, обезьяне, антилопе, дикобразу и т.д.) или непосредственно человеку (в том числе алиментарно), которые могут распространять возбудитель и вызывать эпидемию [21, 24]. Вспышки лихорадки Эбола совпадали по времени с похолоданием и повышением влажности (сезон дождей), когда начиналась миграция летучих мышей и повышенная активность обезьян.

Стремительной динамике развития эпидемий при лихорадке Эбола способствует длительность заразного периода больных — с первых до 27 суток заболевания и более. Это связано с вирусемией и выделением возбудителя в окружающую среду с кровью (массивные кровотечения, гематурия, загрязне-

ния кровью при оперативных вмешательствах и т.д.) и экскретами [10, 18, 36]. У больных и реконвалесцентов вирус выделяли: из крови (от 9 до 22 суток от начала болезни), слюны (до 11 суток), кожи (до 8 суток), мочи (до 23 суток), конъюнктивальной жидкости (до 23 суток), спермы (от 16 до 101 суток), вагинального секрета (от 20 до 57 суток), прямой кишки и кала (до 30 суток), молока (от 13 до 18 суток) [5]. Передача возбудителя от мужчин половым путем возможна до 6 месяцев [10, 18, 25]. В ОТ-ПЦР положительные результаты на наличие РНК вируса Эбола в сперме реконвалесцентов были получены с 45 по 255 сутки после выздоровления в 100 — 40% случаев соответственно [11]. Теоретически возможно заражение от реконвалесцентов при проведении офтальмологических операций — описаны случаи выделения возбудителя из передней камеры глаза через 14 недель от начала болезни [9]. Аэрозольная передача от больных окружающим при кашле и чихании многими авторами рассматривается скептически [10, 14, 25, 36].

Проведены модельные опыты по оценке сохранения вируса Эбола на поверхности и в трупах людей, погибших от инфекции. Трупы погибших от вируса Эбола макак держали в пластиковых коробках длительное время при температуре и влажности, соответствующих Экваториальной Африке (27°C, 80% влажность). Жизнеспособный возбудитель выделяли с поверхности трупов в течение 7 суток, РНК — 10, а из тканей (кровь, печень, легкое) — в течение 4 суток [27].

Общий индекс контагиозности для незащищенного медицинского персонала составлял 81%, в семейных очагах — 23%. Заболеваемость при тесных внутрисемейных контактах составляла от 7,6 до 81%, что определялось характером контактов и уровнем антисанитарии [10, 18, 36].

Нам представляется, что с учетом выявленной закономерности в развитии эпидпроцесса — снижении вирулентности возбудителя для человека до апатогенности и снижении контагиозности, возможно объяснить высокий уровень серопозитивной прослойки населения в эндемичных районах. Эпидемиологические проявления лихорадки Эбола завершаются, на наш взгляд, не одномоментно с прекращением заболеваемости, а более пролонгированно — вслед за манифестной фазой развивается скрытая фаза эпидпроцесса, продолжающая формирование очага. Апатогенный вариант («потомок») вирулентного штамма продолжает циркулировать в первичном очаге, вызывая инаппарантную инфекцию, и может выходить далеко за его пределы (как, например, апатогенный штамм вируса Эбола сформировал иммунную прослойку на Мадагаскаре, где заболеваемость по данной нозологии не отмечена).

Анализ изложенных выше материалов позволяет предположить, что в процессе формирования эпидочага вирус Эбола изменяет свои свойства и циклически проходит последовательно несколько взаимосвязанных фаз: исходную фазу резервации в неизвестных экосистемах — животных либо растительных, почвенных или водных (патогенность для людей неизвестна); промежуточную фазу эпидемического распространения с первоначальным приобретением высокой вирулентности для людей, а затем ее снижения; завершающую фазу внешне скрытой циркуляции апатогенного для людей возбудителя с вероятной последующей элиминацией из экосистем.

Эта гипотетическая цепь естественных фазовых переходов вируса Эбола, не противореча современным представлениям о природно-очаговых болезнях [4], позволяет объяснить и увязать воедино феноменологию этого возбудителя — быстрое падение вирулентности и контагиозности для человека в очагах в динамике эпидемических вспышек, весьма высокую иммунную прослойку населения в нозоареале возбудителя в Африке, противоречащую сложившемуся представлению о его высокой летальности для человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бэрн Р.К., Маккормик Д.В., Зубейр О.А. Внутрибольничная и внутрисемейная передача лихорадки Эбола в южном районе Судана. Бюлл. ВОЗ. 1983, 61 (6): 83-89.
2. Маркин В.А. Методология коллекционирования патогенов. *Вопр. вирусол.* 2010, 5: 4-9.
3. Маркин В.А. Патогенетический подход для выбора перспективных путей противовирусной терапии. *Журн. микробиол.* 2014, 3: 114-124.
4. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. *Инфекционные болезни и эпидемиология.* ГЭОТАР-Медиа, 2008.
5. Baize S., Leroy E.M., Georges A.J. et al. Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* 2002, 128 (1): 163-168.
6. Basler C.F. Portrait of a Killer: Genome of the 2014 EBOV outbreak strain. *Cell. Host. Microbe.* 2014, 16 (4): 419-421.
7. Becquart P., Wauquier N., Mahlakoiv T. et al. High prevalence of both humoral and cellular immunity to Zaire ebolavirus among rural populations in Gabon. *PLoS One.* 2010, 5 (2): e9126.
8. Discussions and decisions of the 2012 — 2014 International Committee on taxonomy of viruses. *Filoviridae study group.* Jan 2013. *Arch. Virol.* DOI 10.1007/s00705-013-1846-9.
9. Ebola update. A ProMed-mail post. URL //www.promedmail.org (дата обращения — 20.12.2015).
10. Ebola virus haemorrhagic fever. Pattin S.R. (ed.). Antwerpen. 1978.
11. Eggo R.M., Watson C.H., Camacho A. et al. Duration of Ebola virus RNA persistence in semen of SUR level estimates and projections. *Eurosurveillance.* 2015, 20 (48): art. 21326.
12. Fauci A.S. Ebola — underscoring the global disparities in health care resources Anthony. *N. Engl. J. Med.* 2014, 371: 1084-1086.
13. Feldman H., Geisbert T.W. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet.* 2011, 377: 849-862.
14. *Filoviridae: Virus Ebola — virus Marburg / Rapport sur le fonctionnement technique 1984-85.* Inst. Pasteur, Bangui, 1985, p. 17-59.
15. Hughes M., Slenczka W., Neppert J. Serologic evidence for the occurrence of human infections with Marburg and Ebola virus in the Republic of Liberia. *Zbl. Microbiol. Ugd.* 1987, 1: 128 — 130.
16. Johnson E.D., Gonzales J.P., Georges A. Filovirus activity among selected ethnic groups inhabiting the tropical forest of equatorial Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1993, 87 (5): 536-538.
17. Johnson K.M. African haemorrhagic fever due to Marburg and Ebola viruses. *Viral infection of humans.* Epidemiology and Control. Evans A.S. (ed.). N.Y., 1989, p. 85-94.
18. Johnson K.M. African haemorrhagic fever caused by Marburg and Ebola viruses. *Viral infection of humans.* Epidemiology and Control. Evans A.S. (ed.). N.Y., 1989, p. 95-104.
19. Kilgore P.E., Grabenstein J.D., Salim A.M. et al. Treatment of Ebola virus disease. *Pharmacotherapy.* 2015, 35 (1): 43-53.
20. Lahm S.A., Kombila M., Swanepoel R. et al. Morbidity and mortality of wild animals in relation to outbreaks of Ebola haemorrhagic fever in Gabon, 1994-2003. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2007, 101: 64-78.
21. Leroy E.M., Rouquet P., Formenty P. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of Central African wildlife. *Science.* 2004, 303: 387-390.
22. Leroy E.M., Epelboin A., Mondonge V. et al. Human Ebola outbreak resulting from direct

- exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vect. Born. Zoon. Dis.* 2009, 9 (6): 723-728.
23. Michak J.H., Bressler D.S., Rossi C.A. Short report: Lack of virus replication in arthropods after intrathoracic inoculation of Ebola Reston virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996, 55 (1): 89-90.
 24. Olival K.J., Hayman D.T. Filoviruses in bats: Current knowledge and future directions. *Viruses.* 2014, 6: 1759-1788.
 25. Outbreaks Chronology: Ebola Virus Disease. URL <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/history/chronology.html> (дата обращения —20.12.2015).
 26. Pourrut X., Souris M., Towner J.S. et al. Large serological survey showing co circulation of Ebola and Marburg viruses in gabonese bat populations and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus*. *BMC Infect. Dis.* 2009, 9: 159-165.
 27. Prescott J., Bushmaker N., Fischer R. et al. Postmortem stability of Ebola virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2015, 21 (5): 58-65.
 28. Reiter P., Turell M., Coleman R. et al. Field investigations of an outbreak of Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo: Arthropod studies. *J. Infect. Dis.* 1999, 179: 148-154.
 29. Schumann M., Gantke T., Muhlberger E. Ebola virus VP35 antagonizes PKR activity through its C-terminal interferon inhibitory domain. *J. Virol.* 2009, 83: 8993-8997.
 30. Simmons G., Wool-Lewis R. J., Baribaud F. et al. Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence. *J. Virol.* 2002, 76: 2518-2528.
 31. Surean P. Infections a virus Marburg et Ebola / Inst. Pasteur — Cours de Microbiologie Systematique (virologie) 1982-83. Bangui, 1983, p. 85-94.
 32. Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. The seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. van Regenmortel M.H.V. et al. (ed.). Academic Press, San Diego, 2000.
 33. Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. King A.M.Q. et al. (ed.). Elsevier, Amsterdam, 2012.
 34. Wahl-Jensen V., Kurz S. K., Hazelton P. R. et al. Role of Ebola virus secreted glycoproteins and virus-like particles in activation of human macrophages. *J. Virol.* 2005, 79: 2413-2419.
 35. Weik M., Modrof J., Klenk H. D. et al. Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation. *J. Virol.* 2002, 76: 8532-8539.
 36. Westwood J.C.N. The hazard from dangerous exotic diseases. McMillan Press, 1980.
 37. WHO Ebola Response Team. Ebola Virus Disease in West Africa — The First 9 Months of the Epidemic and Forward Projections. *N. Engl. J. Med.* 2014, 371: 1481-1495.
 38. Yuan J., Zhang Y., Li J. et al. Serological evidence of ebolavirus infection in bats, China. *J. Virol.* 2012, 9: 236-245.

Поступила 20.01.16

Контактная информация: Маркин Владимир Александрович, д.м.н.,
141306, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 2

НЕКРОЛОГИ

ПАМЯТИ ДОНАЛЬДА ЭЙНСЛИ ХЕНДЕРСОНА

19 августа 2016 г. в возрасте 87 лет ушел из жизни Д.Э.Хендерсон (Donald Ainslie Henderson) — выдающийся деятель в области глобального общественного здравоохранения (США), руководитель Программы ликвидации натуральной оспы (1966—1977 гг.), карьера которого охватила несколько десятилетий работы в ВОЗ, Центре по профилактике и контролю заболеваний.

Светлая память о профессоре Д.Э.Хендерсоне навсегда сохранится в наших сердцах.

ПАМЯТИ ЛЮДМИЛЫ ИВАНОВНЫ КРАСНОПРОШИНОЙ

26 сентября 2016 г. на 84 году ушла из жизни Л.И.Краснопрошина, главный научный сотрудник лаборатории иммунологических методов исследования НИИВС им.И.И.Мечникова, д.м.н., профессор, старейший сотрудник института.

Людмила Ивановна возглавила лабораторию в 1976 году и оставалась ее бессменным руководителем на протяжении 38 лет. Она внесла большой вклад в развитие отечественной иммунологии. Ее научная деятельность была посвящена изучению гуморальных механизмов противоменингококкового и противопневмококкового иммунитета, изучению взаимосвязи гуморального и мукозального иммунитета, влиянию иммуномодуляторов на факторы врожденного, адаптивного и мукозального иммунитета при различной хронической патологии и др.

Людмила Ивановна была ученым с широким научным кругозором, человеком высоких нравственных принципов, активной жизненной позиции, пользовалась заслуженным авторитетом, уважением и любовью коллег по работе.

Светлая память о Л.И.Краснопрошиной навсегда сохранится в наших сердцах.

ПАМЯТИ СЕРГЕЯ ГРИГОРЬЕВИЧА ДРОЗДОВА

3 ноября 2016 г. в возрасте 87 лет ушел из жизни Сергей Григорьевич Дроздов — д.м.н., профессор, акад. РАН, лауреат Госпремии РФ, член редколлегии ЖМЭИ, известный вирусолог.

С 1955 г. С.Г. Дроздов был связан с Институтом полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, в котором он прошел путь от младшего научного сотрудника до директора учреждения (1972—2006). В институте Сергей Григорьевич был одним из активнейших участников научного проекта по всестороннему изучению этиологии, эпидемиологии, молекулярной биологии полиомиелита, созданию эффективных вакцин против этого заболевания и организации их широкомасштабного производства. На основании лабораторных и полевых исследований была доказана ареактогенность, иммунологическая безопасность и высокая эффективность живой (оральной) полиовирусной вакцины из аттенуированных штаммов Сэбина. Эти исследования стали основой для разработки стратегии применения живой вакцины в СССР и странах мира, что привело к резкому снижению заболеваемости полиомиелитом. Впоследствии выдающиеся научные разработки по полиомиелиту были учтены при формировании стратегии Глобальной программы ликвидации полиомиелита ВОЗ в отношении вакцинации и эпидемиологического надзора за полиомиелитом. Сергей Григорьевич внес выдающийся вклад в реализацию этой программы, он был членом Глобальной и Европейской региональной комиссии ВОЗ по сертификации ликвидации полиомиелита. По итогам выполнения программы С.Г. Дроздов отмечен благодарностью ВОЗ и нагрудным знаком. Круг научных интересов С.Г. Дроздова был чрезвычайно широк: под его руководством были начаты, получили развитие и оформились в самостоятельную научную программу исследования, посвященные многоплановому изучению ГЛПС и ККГЛ. Под руководством С.Г. Дроздова была разработана технология изготовления инактивированной вакцины против ГЛПС, налажено производство диагностических препаратов, получила дальнейшее развитие традиционная для Института тематика исследований по клещевому энцефалиту. Присущая С.Г. Дроздову научная прозорливость позволила Институту стать пионером в разработке таких направлений, как вирусные гепатиты, ротавирусы.

Сергей Григорьевич — автор 12 монографий и 350 работ. Труд С.Г. Дроздова отмечен двумя орденами Трудового Красного Знамени, орденом «За заслуги перед Отечеством» III степени.

Светлая память о С.Г. Дроздове навсегда сохранится в наших сердцах.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ORIGINAL ARTICLES

- Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Вишневецкая О.Н., Капустина В.В., Потокин И.Л., Лаврикова В.В.* Особенности формирования бактериальных биопленок в условиях космического полета 3
- Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Голотин В.А., Рассказов В.А.* Биологическая активность токсинов *Yersinia pseudotuberculosis* 10
- Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Титова С.В., Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И.* ГИС: возможности анализа данных фено- и генотипирования холерных вибрионов O1 серогруппы Эль Тор, изолированных из водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации... 19
- Корсакова И.И., Антонов В.А., Храпова Н.П., Замарина Т.В., Пименова Е.В., Ким Е.Э., Меринова Л.К., Сенина Т.В., Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Агеева Н.П., Молчанова Е.В., Лопастейская Я.А., Прохватулова Е.В.* Идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза на основе принципов полифазного таксономического подхода 25
- Никитин А.Я., Носков А.К., Баландина Т.П.* Заболеваемость населения инфекциями, передающимися *Ixodes persulcatus*, на севере и юге Иркутской области 34
- Бухарин О.В., Челпаченко О.Е., Данилова Е.И., Чайникова И.Н., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Никифоров И.А., Федотова Л.П., Бондаренко Т.А., Салгина А.В.* Микросимбиозноз кишечника у детей с реактивным артритом 41
- Зайцев Е.М., Поддубиков А.В., Брицан М.В., Озеретковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г.* Профили цитокинов у мышей при иммунизации АКДС-вакциной с бесклеточным коклюшным компонентом 49
- Курбатова Е.А., Ахматова Э.А., Ахматова Н.К., Егорова Н.Б., Ястребова Н.Е., Сухова Е.В., Цветков Ю.Е., Яшунский Д.В., Нифантьев Н.Э.* Синтетические конъюгированные аналоги капсульных полисахаридов пневмококка — инструмент для выявления поствакцинальных антител 54
- Хромова Е.А., Семочкин И.А., Ахматова Э.А., Столпников В.Н., Сходова С.А., Сорочкина Е.В., Ахматова Н.К., Костинов М.П.* Сравнительная активность вакцин против гриппа: влияние на субпопуляционную структуру лимфоцитов 61
- Царев В.Н., Подпорин М.С., Ипполитов Е.В., Автандилов Г.А., Царева Т.В.* Экспериментальное обоснование эндодонтического лечения хронических форм пульпита и периодонтита с использованием фотоактивируемой дезинфекции и ультразвуковой обработки 66
- Rybalchenko, O.V., Orlova, O.G., Vishnevskaya, O.N., Kapustina, V.V., Potokin, I.L., Lavrikova, V.V.* Features of formation of bacterial biofilms in conditions of space flight
- Terentieva, N.A., Timchenko, N.F., Golotin, V.A., Rasskazov, V.A.* Biological activity of *Yersinia pseudotuberculosis* toxins
- Levchenko, D.A., Kruglikov, V.D., Vodopianov, A.S., Titova, S.V., Arkhangel'skaya, I.V., Nepomnyaschaya, N.B., Ezhova, M.I.* GIS: capabilities of data analysis of pheno- and genotyping of El Tor O1 serogroup cholera vibrios isolated from aquatic objects of the environment in Russia Federation
- Korsakova, I.I., Antonov, V.A., Khrapova, N.P., Zamarina, T.V., Pimenova, E.V., Kim, E.E., Merinova, L.K., Senina, T.V., Tkachenko, G.A., Savchenko, S.S., Ageeva, N.P., Molchanova, E.V., Lopasteiskaya, Ya.A., Prokhvatilova, E.V.* Identification of causative agents of glanders and melioidosis based on principles of polyphase taxonomic approach
- Nikitin, A.Ya., Noskov, A.K., Balandina, T.P.* Population morbidity by infections transmitted via *Ixodes persulcatus* in the north and south of Irkutsk region
- Bukharin, O.V., Chelpachenko, O.E., Danilova, E.I., Chainikova, I.N., Perunova, N.B., Ivanova, E.V., Nikiforov, I.A., Fedotova, L.P., Bondarenko, T.A., Salgina, A.V.* Gut microsymbiogenesis in children with reactive arthritis
- Zaitsev, E.M., Poddubikov, A.V., Britsina, M.V., Ozeretkovskaya, M.N., Mertsalova, N.U., Bazhanova, I.G.* Profiles of cytokines in mice during immunization with aDTP-vaccine with acellular pertussis component
- Kurbatova, E.A., Akhmatova, E.A., Akhmatova, N.K., Egorova, N.B., Yastrebova, N.E., Sukhova, E.V., Tsvetkov, Yu.E., Yashunsky, D.V., Nifantiev, N.E.* Synthetic conjugated analogues of capsule polysaccharides of pneumococcus — an instrument for detection of post-vaccination antibodies
- Chromova, E.A., Semochkin, I.A., Akhmatova, E.A., Stolpnikov, V.N., Skhodova, S.A., Sorokina, E.V., Akhmatova, N.K., Kostinov, M.P.* Comparative activity of influenza vaccines: effect on lymphocyte subpopulation structure
- Tsarev, V.N., Podporin, M.S., Ippolitov, E.V., Avtandilov, G.A., Tsareva, T.V.* Experimental rationale of endodontic therapy of chronic forms of pulpitis and periodontitis using photo-activated disinfection and ultrasound treatment

ОБЗОРЫ

Сомова Л.М., Шубин Ф.Н., Дробот Е.И., Плехова Н.Г., Ляпун И.Н. Плазмид-ассоциированная вирулентность *Yersinia pseudotuberculosis* и инфекционный процесс 74

Ефременко В.И., Ефременко А.А., Ефременко Д.В. Теоретические аспекты создания специфических препаратов для этиотропной терапии и профилактики лихорадки Западного Нила и Крымской геморрагической лихорадки 85

Арутюнов Ю.И. Чума: случаи инфицирования людей в природных очагах США и сложность их выявления 94

Шмелькова Т.П., Сазанова Е.В., Кравцов А.Л., Малюкова Т.А., Попов Ю.А., Бойко А.В., Девдариани З.Л., Шуковская Т.Н. Определение вирулентных свойств патогенных микроорганизмов *in vitro*: состояние вопроса 100

Пузырева Л.В., Сафонов А.Д. Инфекции, вызванные вирусом Эпштейна-Барра, у ВИЧ-инфицированных пациентов 108

Маркин В.А., Пантюхов В.Б. Лихорадка Эбола... 116

REVIEWS

Somova, L.M., Shubin, F.N., Drobot, E.I., Plekhova, N.G., Lyapun, I.N. Plasmid-associated virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* and infectious process

Efremenko, V.I., Efremenko, A.A., Efremenko, D.V. Theoretical aspects of creation of specific preparations for etiotropic therapy and prophylaxis of West Nile fever and Crimean haemorrhagic fever

Arutyunov, Yu.I. Plague: cases of human infection in the USA natural foci and the difficulty of their detection

Shmelkova, T.P., Sazanova, E.V., Kravtsov, A.L., Malyukova, T.A., Popov, Yu.A., Boiko, A.V., Devdariani, Z.L., Schukovskaya, T.N. Determination of virulence properties of pathogenic microorganisms *in vitro*: state-of-art

Puzyreva, L.V., Safonov, A.D. Infections caused by Epstein-Barr virus in HIV-infected patients

Markin, V.A., Pantyukhov, V.B. Ebola fever

НЕКРОЛОГИ

OBITUARIES

Поздравляем читателей и авторов журнала с наступающим Новым годом. Желаем всем здоровья и творческих успехов на благо российской науки.

Благодарим всех, кто поддержал ЖМЭИ в подписке на I полугодие 2017 г.

Надеемся, что и далее вы все поддержите журнал, которому 92 года и который входит в перечень ВАК и в базу данных PubMed, Scopus, Web of Science, Chemical Abstract, РИНЦ.

Индексы подписки см. на стр. 2.

Редколлегия, Редакция