

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.

1

январь—февраль

МОСКВА 2017

«С-ИНФО»

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

БРУСИНА Е.Б. (Кемерово), ЗУЕВА Л.П. (Санкт-Петербург), КОРОЛЮК А.М. (Санкт-Петербург), ПРИСАКАРЬ В.И. (Кишинев), ТИТОВ Л.П. (Минск), ШАРКОВА В. (Владивосток), ШЕНДЕРОВ Б.А. (Москва), ШКАРИН В.В. (Н. Новгород)

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, РИНЦ
Журнал входит в перечень ВАКовских изданий

<http://www.jmicrobiol.com>

Подписано в печать 18.01.17. Выход в свет 07.02.17. Формат 70x108 1/16
Печать офсетная. Тираж 1000. Заказ

Отпечатано в ООО «Буки Веди»
119049, г. Москва, Ленинский проспект, д. 4, стр. 1 А
Тел.: (495)926-63-96
www.bukivedi.com
E-mail: info@bukivedi.com

© «С-инфо», 2017

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

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

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ БИФИДОФЛОРЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ БИОТОПА ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург

Цель. Изучить спектр и уровень короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) в супернатанте бифидобактерий при различных микроэкологических состояниях биотопа толстого кишечника человека. *Материалы и методы.* Исследовали метаболиты 88 штаммов бифидобактерий, изолированных от пациентов при обследовании на дисбиоз кишечника. Определение концентраций КЦЖК проводили методом разделения подкисленного супернатанта пробы на хроматографе GC-2010 Plus, Shimadzu (Япония). *Результаты.* Одноосновные карбоновые кислоты обнаружены в метаболитах 50 — 100% исследуемых культур бифидобактерий, где спектр и уровень карбоновых кислот в супернатантах варьировали в зависимости от микроэкологического состояния источника выделения. При глубоких нарушениях микросимбиоза в метаболитах *Bifidobacterium* spp. была снижена суммарная концентрация КЦЖК, структурный индекс, уровень уксусной и пропионовой кислот. Выявлены штаммоспецифические отличия в метаболическом профиле бифидофлоры в составе индивидуальных консорциумов. Полученные данные свидетельствуют о варьировании функциональной (метаболической) активности доминантных штаммов при различных микроэкологических состояниях кишечника человека. *Заключение.* Уникальность метаболома каждого отдельного штамма бифидобактерий за счет их штаммоспецифичности определяет их функциональную активность, а метаболический профиль бифидофлоры может служить важнейшим критерием отбора эффективных пробиотических препаратов для лечения и профилактики дисбиозов кишечника.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 3—11

Ключевые слова: бифидобактерии, короткоцепочечные жирные кислоты, метаболический профиль, штаммоспецифичность, дисбиоз

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

METABOLIC PROFILE OF BIFIDOFLORA UNDER DIFFERENT MICROECOLOGICAL CONDITIONS OF THE COLON BIOTOPE IN HUMAN

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

Aim. To study the spectrum and level of short-chained fatty acids (SCFA) in supernatant of bifidobacteria under different microecological conditions of the colon biotope in human. *Materials and methods.* Metabolites of 88 bifidobacteria strains isolated from patients when examined for dysbiosis of the colon were investigated. Definition of concentration of SCFA was performed on acidified supernatant samples by a separation method on chromatograph GC-2010 Plus, Shimadzu (Japan). *Results.* Monobasic acids were found in metabolites of 50 — 100% study cultures of bifidobacteria where the spectrum and level of carboxylic acids in supernatants varied depending on microecological condition of the origin of the discharge. In severe damages of microsymbiocenosis in metabolites of *Bifidobacterium* spp., summarized concentrations of SCFA, structural index, levels of acetic and propionic acids were decreased. Strain-specific differences in a metabolic profile of bifidoflora in a composition of individual consortia were determined. Data obtained indicate the variation of functional (metabolic) activity of dominant strains in different

microecological conditions of the human colon. *Conclusion.* Uniqueness of metabolome of every other strain due to their strain specificity determines their functional activity, but a metabolic profile of bifidoflora can serve as the most important criterion for the selection of effective probiotic drugs for treatment and prevention of dysbiosis in the colon.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 3—11

Key words: bifidobacteria, short-chained fatty acids, metabolic profile, strain specificity, dysbiosis

ВВЕДЕНИЕ

Древняя связь микробиоты и макропартнера является следствием эволюции, приведшей к формированию сложных взаимоотношений и созданию мутуалистического симбиоза с представителями нормофлоры, в частности, с бифидобактериями. Функции бифидофлоры разнообразны, но основной является поддержание гомеостаза (здоровья) хозяина, а в более узком, специфическом понимании — микроэкологического статуса занимаемого биотопа [2]. Реализация мутуалистических взаимоотношений бифидобактерий с хозяином происходит за счет ферментации доминантами сложных углеводов в желудочно-кишечном тракте с образованием биологически активных метаболитов — короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), формирующих химическую среду в просвете кишечника и являющихся ключевыми для метаболизма человека [13, 14]. Для КЦЖК характерны плеiotропные эффекты, проявляющиеся в зависимости от их концентрации: в условиях обычного уровня продукции бифидофлорой они могут служить в качестве источника углерода для облигатной микробиоты, а при высоких концентрациях в среде способны проявлять токсическое действие на окружающие микроорганизмы. В частности, конечные продукты брожения (лактат и ацетат) бифидобактерий являются доступными субстратами для представителей Firmicutes, синтезирующих бутират в толстом кишечнике взрослого человека [5]. Молочная кислота бифидобактерий используется пропионобактериями с образованием пропионовой и уксусной кислот, обладающих антимикробным действием, а *вейллонеллы* используют ее для продукции метаболитов, необходимых для жизнедеятельности анаэробов [2]. В межмикробных взаимодействиях участвует ацетат и капроновая кислота в качестве метаболической сигнальной молекулы, регулирующей экспрессию генов, ответственных за координацию процессов биопленкообразования у *бацилл* и дрожжевых грибов [7, 11]. Вместе с тем, ацетат и пропионат проявляют токсическое действие в отношении ряда патогенов (*сальмонеллы*, *энтерогеморрагическая кишечная палочка*, *листерии*, *клостридии*) за счет диффузии КЦЖК внутрь клеток, подавляя их рост вследствие появления множественных дефектов в клеточных процессах бактерий. Кроме того, показано, что ацетат способен опосредованно повышать колонизационную резистентность кишечника, усиливая метаболизм энтероцитов и секрецию антимикробных пептидов [10, 13].

Метаболиты бифидобактерий, имея малую молекулярную массу, способны диффундировать в подслизистые лимфоидные структуры и периферический кровоток, оказывая антиканцерогенный, противовоспалительный, иммуномодулирующий и гипохолестеринемический эффекты [6, 12]. Показан стимулирующий эффект КЦЖК комменсальных бактерий в отношении пролиферации и дифференцировки периферических и кишечных популяций T-reg клеток, обеспечивающих формирование толерантности в кишечном биотопе посредством активации гистонов и транскрипционного фактора Foxp3 [9].

Вместе с тем, в литературе отсутствуют данные о характеристиках спектра и уровне короткоцепочечных жирных кислот в супернатанте бифидобактерий при различных микроэкологических состояниях биотопа толстого кишечника человека, позволяющие оценить метаболическую активность доминантов в зависимости от микроокружения, что и явилось целью работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили метаболиты бифидобактерий, изолированные от 52 пациентов при обследовании на дисбиоз толстого кишечника. Выделение микроорганизмов проводили общепринятыми методами [15], идентификацию бифидобактерий осуществляли масс-спектрометрическим методом с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра «Microflex» («Bruker Daltonics», Германия). От обследуемых выделено 88 штаммов бифидобактерий: *Bifidobacterium longum* — 32 штамма, *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* — 2 культуры, *Bifidobacterium longum* spp. *suis* — 2 штамма, *Bifidobacterium bifidum* — 30 культур, *Bifidobacterium pseudolongum* — 1 штамм, *Bifidobacterium breve* — 2 изолята, *Bifidobacterium adolescentis* — 7 штаммов, *Bifidobacterium animalis* — 1 изолят, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* — 4 штамма и *Bifidobacterium catenulatum* — 7 культур.

Для определения концентраций короткоцепочечных жирных кислот в культуральной жидкости микроорганизмов применяли метод разделения подкисленного супернатанта (экзометаболитов) пробы на хроматографе [1,4] в три этапа: пробоподготовка, хроматографирование, обработка результатов. Для получения проб предварительно были подготовлены бульонные 48-часовые культуры бифидобактерий. Пробы центрифугировали (13000×g в течение 15 мин) и к 500 мкл супернатанта добавляли 50 мкл H₂SO₄ (PanReac AppliChem, Германия). Экстракция летучих жирных кислот из образцов осуществлялась 750 мкл изобутилового спирта (Sigma-Aldrich, США), процесс повторяли дважды. В работе использовали газожидкостный хроматограф GC-2010 Plus, Shimadzu (Япония), оборудованный пламенно-ионизационным детектором с капиллярной колонкой HP-FFAP (Agilent Technologies, США), диаметром 0,32 мм, длиной 50,0 метра. Параметры хроматографирования: температура испарителя 240°C, температурная программа для капиллярной колонки составляла: 0 мин — 70°C; 10 мин — 160°C; 5 мин — 180°C и 25 мин — 240°C, температура детектора — 260°C. В качестве газа-носителя использован гелий (Air Liquide), скорость газа-носителя 21 см/сек, давление в колонке 74 кПа. Для определения количества компонентов в пробе использовали метод абсолютной градуировки с предварительным построением градуировочного графика ряда концентраций чистых веществ жирных кислот (Sigma-Aldrich, США). Расчет концентраций по площадям пиков осуществляли с помощью компьютерной программы GCsolution (Shimadzu, Япония).

Исходя из весовых концентраций, рассчитывали общий уровень низкомолекулярных монокарбоновых кислот, уровни и доли в общем пуле (спектры уксусной (C₂), пропионовой (C₃), масляной (C₄), изо-масляной (iC₄), валириановой (C₅), капроновой (C₆), изо-капроновой (iC₆) кислот, а также значение суммы протеолитических (изоформ) кислот и структурного индекса (СИ), соотношение уровня уксусной кислоты к общему уровню кислот [3]. Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, USA) с оценкой различий между средними величинами по t-критерию Стьюдента. Проверка нормального распределения переменных проводилась методом Шапиро-Уилка. Статистические результаты

выражали в виде медианы (Me), нижних (Q25) и верхних (Q75) квартилей. Уровни статистической значимости различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Важной характеристикой микробиоценоза является метаболическая активность микроорганизмов и, в первую очередь, бифидофлоры — доминантного звена микросимбиоза в поддержании здоровья хозяина. Из всего спектра химических соединений, образующихся в результате сбраживания субстрата, мы выбрали для характеристики низкомолекулярные монокарбоновые кислоты. Проведенные исследования позволили установить, что спектр и уровень ряда карбоновых кислот в супернатантах бифидофлоры варьировали в зависимости от микрoэкологического состояния биотопа толстого кишечника человека. Способность производить одноосновные карбоновые кислоты определялась в метаболитах 50 — 100% исследуемых культур бифидобактерий. Сравнительный анализ спектра карбоновых кислот в супернатанте бифидобактерий при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека показал снижение частоты встречаемости всех исследуемых карбоновых кислот при 2 — 3 степени дисбиоза, за исключением уксусной кислоты — основного конечного продукта ферментации углеводов бифидобактериями и масляной кислоты — энергетического субстрата для энтероцитов хозяина.

Комплексная оценка содержания изученных КЦЖК, соотношения и суммарной концентрации кислот позволила составить метаболический паспорт бифидобактерий, отражающий динамику функциональной (метаболической) активности доминантов при различных микрoэкологических состояниях кишечника человека (табл.). Выявлено отсутствие существенных различий в значениях метаболических показателей культур бифидобактерий, изолированных при эубиозе и дисбиозе 1 — 2 степени, что свидетельствует о сохранении ферментирующей активности доминантов в условиях умеренных микрoэкологических нарушений в микросимбиозе толстого кишечника. Достоверное снижение суммарной концентрации КЦЖК, уровня уксусной, пропионовой кислоты в метаболитах бифидобактерий наблюдалось только у штаммов, изолированных от лиц при 3 степени дисбиоза. Уровни масляной и изомаляной кислот в метаболитах дисбиотических культур по сравнению с эубиотическими не изменялись, а их доли в общем спектре метаболитов увеличивались при глубоких нарушениях в кишечном микросимбиозе. Вероятно, это можно рассматривать как одну из составляющих локальных протективных механизмов сохранения кишечного гомеостаза организма при тяжелых нарушениях в микросимбиозе кишечника, учитывая существенную роль масляной кислоты в обеспечении колонизационной резистентности и ее антиканцерогенный эффект [6, 10, 12].

Концентрация разветвленных (протеолитических) кислот, таких как изомаляная и изокапроновая кислоты, в супернатантах бифидобактерий значительно уступала содержанию их неразветвленных гомологов, что свидетельствует о предпочтительном использовании бифидобактериями углеводов, присутствующих в питательной среде, в качестве основного энергетического субстрата.

Важным параметром метаболической активности микроорганизмов является структурный индекс или доля уксусной кислоты, производимой молочнокислыми бактериями, так как снижение доли уксусной кислоты приво-

дит к замедлению метаболизма субстрата и к усилению способности бактерий к синтезу органических кислот с более длинной цепью. Анализ указанных характеристик позволил установить особенности метаболической активности бифидофлоры при дисбиозе 3 степени, характеризующиеся существенным снижением уксуснопродуцирующей активности бифидобактерий на фоне увеличения количества и доли капроновой кислоты, а также повышение долей органических кислот с более длинной цепью: изомасляной, масляной, валериановой и изокапроновой кислот (табл.).

Метаболический паспорт культур бифидобактерий в зависимости от микрoэкологического состояния источника выделения

Показатель	Обозначение	Эубиоз, Ме [Q ₂₅ -Q ₇₅] n=27	1 степень дисбиоза, Ме [Q ₂₅ -Q ₇₅] n=28	2 степень дисбиоза, Ме [Q ₂₅ -Q ₇₅] n=17	3 степень дисбиоза, Ме [Q ₂₅ -Q ₇₅] n=16
Общий уровень КЦЖК, ммоль/л	OU	19 [7,4–28]	20 [7,3–36]	6,8 [6,2; 13]	3,9* [3,3; 5,5]
Уксусная кислота	C2	18,8 [7,4–28]	20,5 [7,3–36]	6,7 [5,9–13]	4,6* [3,5–5,8]
Пропионовая кислота	C3	0,23 [0,1–0,38]	0,3 [0,11–0,43]	0,11 [0,05–0,28]	0,07* [0,06–0,07]
Изомасляная кислота	iC4	0,07 [0,03–0,1]	0,06 [0,04–0,1]	0,06 [0,05–0,14]	0,05 [0,04–0,08]
Масляная кислота	C4	0,06 [0,05–0,09]	0,05 [0,04–0,08]	0,05 [0,04–0,08]	0,04 [0,05–0,06]
Валериановая кислота	C5	0,03 [0,02–0,04]	0,02 [0,01–0,04]	0,02 [0,01–0,04]	0,02 [0,02–0,03]
Капроновая кислота	C6	0,03 [0,01–0,04]	0,04 [0,02–0,25]	0,13* [0,08–0,15]	0,13* [0,06–0,18]
Изокапроновая кислота	iC6	0,05 [0,02–0,11]	0,05 [0,04–0,11]	0,03 [0,02–0,04]	0,07 [0,06–0,08]
Протеолитические ЛЖК	iC4+iC6	0,1 [0,04–0,15]	0,1 [0,06–0,19]	0,09 [0,03–0,18]	0,1 [0,06–0,13]
Структурный индекс, %	СИ	0,98 [0,96–0,99]	0,97 [0,96–0,98]	0,96 [0,93–0,98]	0,9* [0,88–0,94]
Доля уксусной кислоты	pC2	98 [96–99]	97 [96–98]	96 [93–98]	90* [88–94]
Доля пропионовой кислоты	pC3	1,4 [0,77–1,9]	1,3 [0,87–1,8]	1,2 [0,7–2,7]	1,8 [1,3–2,3]
Доля изомасляной кислоты	piC4	0,36 [0,18–0,7]	0,35 [0,19–0,55]	1,3 [0,6–5,3]	1,8* [1,1–2,3]
Доля масляной кислоты	pC4	0,5 [0,24–0,9]	0,32 [0,15–0,7]	0,7 [0,6–0,8]	1,2* [1,0–1,3]
Доля валериановой кислоты	pC5	0,22 [0,1–0,34]	0,16 [0,1–0,3]	0,19 [0,1–0,4]	0,4* [0,37–0,4]
Доля капроновой кислоты	pC6	0,11 [0,1–0,2]	0,19 [0,1–0,4]	1,0* [0,7–2,0]	2,8* [1,5–3,8]
Доля изокапроновой кислоты	piC6	0,23 [0,1–1,1]	0,33 [0,3–0,8]	0,2 [0,1–0,7]	1,7* [1,4–2,0]

Примечание. * p≤0,05 относительно штаммов бифидобактерий, выделенных при эубиозе.

Анализируя метаболическую активность бифидофлоры — доминантных микросимбионтов толстого кишечника человека, следует учитывать существование различных видов бифидобактерий в биотопе отдельного индивидуума [2]. Оценка метаболической активности у различных видов бифидобактерий в условиях одного конкретного микросимбиоценоза также позволила установить ряд особенностей как в спектре, так и уровне карбоновых кислот. Так, из микросимбиоценоза обследуемой Ш., 41 год, представленного консорциумом из трех видов бифидобактерий (*B. longum*, *B. bifidum* и *B. catenulatum*), спектр и уровень КЦЖК среди культур различался. В метаболитах штамма *B. longum*, преобладающего в исследуемом консорциуме бифидобактерий с показателем микробной обсемененности (ПМО) 1×10^9 КОЕ/г, детектировались все анализируемые карбоновые кислоты в количестве С2 — 22 ммоль/л, С3 — 0,54 ммоль/л, iС4 и С4 — по 0,1 ммоль/л, С5 и С6 — по 0,03 ммоль/л, iС6 — 0,12 ммоль/л. Культуры *B. bifidum* (ПМО 3×10^8 КОЕ/г) также продуцировали все карбоновые кислоты, однако концентрация уксусной кислоты (С2) составляла только 17 ммоль/л, количество пропионовой (С3) и масляной (С4) кислот не отличалось от предыдущего штамма, а содержание изомаляной, валериановой, капроновой и изокапроновой кислот было на порядок выше (iС4 — 0,8 ммоль/л, С5 — 0,16 ммоль/л, С6 и iС6 по 0,3 ммоль/л) ($p \leq 0,05$). Метаболический профиль культуры *B. catenulatum*, которая имела самый низкий ПМО (3×10^7 КОЕ/г), был представлен 5 жирными кислотами из 7 изученных, а уровень кислот в метаболитах был значительно ниже (С2 — 7 ммоль/л, С3 — 0,07 ммоль/л, iС4 — 0,03 ммоль/л, С4 — 0,05 ммоль/л, С5 — 0,01 ммоль/л) ($p \leq 0,05$). Данные закономерности в консорциумах бифидофлоры, выделяемых из одного микросимбиоценоза толстого кишечника обследуемых, отмечались в $75 \pm 0,2\%$ случаев. В остальных случаях из микросимбиоценозов выделяли штаммы бифидобактерий, среди которых не выявлялся доминирующий вид, причем данные микросимбиоценозы характеризовались различным по степени выраженности дисбиозом.

Таким образом, в каждом анализируемом консорциуме бифидобактерий в условиях конкретного микросимбиоценоза человека выявлялся доминирующий вид с высокими значениями ПМО и метаболической активностью в сравнении с остальными представителями бифидофлоры в кишечнике человека. Также следует отметить, что уровень и доля уксусной и пропионовой кислот положительно коррелировали с показателем микробной обсемененности доминанта ($r=0,6 - 0,75$).

Установленные отличия в метаболическом профиле бифидобактерий в составе консорциума могли быть связаны с видоспецифическими особенностями культур. Однако проведенный анализ спектра и уровня карбоновых кислот у представителей одного вида бифидофлоры выявил отличия на уровне штамма, что дало основание исключить влияние видоспецифичности. Среди представителей вида *B. bifidum* встречались штаммы, в составе супернатанта которых обнаруживались все 7 карбоновых кислот (в $32 \pm 1,7\%$ случаев), у $60 \pm 1,3\%$ штаммов в метаболитах присутствовали 5 — 6 короткоцепочечных карбоновых кислот и у $8 \pm 1,9\%$ культур — только 4 кислоты. При изучении хроматографических спектров штаммов, относящихся к виду *B. bifidum*, оказалось, что разнообразие спектра и уровень карбоновых кислот в супернатантах указанных культур зависели от индивидуальных особенностей штамма и не были связаны с видовой принадлежностью *Bifidobacterium* spp. Штаммоспецифические отличия в метаболическом профиле от-

мечались и у представителей других видов — *B. longum*, *B. adolescentis* и *B. catenulatum*.

Таким образом, наши материалы показали, что отличия в метаболическом профиле бифидофлоры в составе индивидуальных консорциумов связаны не с видоспецифическими особенностями культур, его составляющих, а с метаболической активностью отдельных штаммов бифидобактерий в составе консорциума.

ОБСУЖДЕНИЕ

Принимая во внимание, что составление метаболического профиля (паспорта) человека рассматривается как основа новой стратегии в медицине [3], мы представили систему интегральной оценки кишечного микробиоценоза с целью расширения возможностей диагностики и прогноза развития заболеваний, связанных с их функциональным состоянием. Однако для изучения механизмов формирования и функционирования микросимбиоценозов человека необходимы сведения по характеристике метаболической активности ключевых представителей микробиоты, что позволит оценить их вклад в поддержание здоровья хозяина. Наши исследования позволили в рамках новых технологических решений составить метаболический паспорт бифидофлоры и комплексно оценить ферментативную активность клинических штаммов при различных микрoэкологических состояниях толстого кишечника человека.

На основе анализа комплексной оценки функциональной активности бифидобактерий показано значение метаболической активности бифидофлоры в формировании химической среды в толстом кишечнике, играющей важную роль в поддержании энергетического гомеостаза человека, синтезе кишечных гормонов и контроле локального воспаления через регуляцию цитокинового баланса [8, 9, 13]. Установленная в работе способность доминантов сохранять метаболическую активность при дисбиозе 1 — 2 степени на уровне метаболического статуса зубиотических штаммов — свидетельство функционирования важнейшего метаболического механизма поддержания стабильности микросимбиоценоза в условиях умеренных микрoэкологических нарушений в биотопе.

При глубоких нарушениях микросимбиоценоза кишечного биотопа установленные изменения в метаболизме КЦЖК бифидобактерий нельзя расценивать однозначно. С одной стороны, снижение способности бифидофлоры образовывать уксусную кислоту в условиях выраженных микрoэкологических нарушений в биотопе объясняет полученные ранее данные о снижении биопленкообразования и антагонистической активности бифидобактерий при дисбиозе толстого кишечника. Являясь доминантным звеном кишечного микросимбиоценоза, бифидобактерии за счет продукции ацетата способствуют закислению среды в просвете толстого кишечника человека, увеличивая свои адгезивные свойства и антагонистическую активность в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов [2].

С другой стороны, сохранение способности этих же культур образовывать масляную кислоту и ее формы характеризует достаточно высокие протективные и регуляторные свойства указанных доминантов, поскольку недостаточное количество масляной кислоты приводит к снижению колонизационной резистентности биотопа, всасываемости метаболитов энтероцитами и многим другим негативным эффектам, включая увеличение риска развития

онкопатологии, воспалительных, аутоиммунных заболеваний кишечника [6].

Существование микробных консорциумов в пределах одного рода в кишечном микросимбиозе, представители которого отличаются друг от друга способностью ферментировать субстрат, позволяет доминантам в конкретном микросимбиозе эффективно реализовывать свой метаболический потенциал, оказывая в полной мере мутуалистическое воздействие на организм хозяина. Современные методы исследования и описания генома и метаболома микроорганизмов свидетельствуют о том, что один и тот же вид микроорганизмов варьируется по составу генов и метаболическому профилю, благодаря чему за счет объединения в популяции одного вида и экономии ресурсов микробной клетки реализуется единая адаптивная стратегия в разных условиях среды. Аналогичный принцип был применен нами ранее для бифидобактерий, у которых проведение белкового профилирования позволило выявить наряду с общностью штаммов и различия между ними внутри вида [2]. Установленные нами различия в спектре короткоцепочечных карбоновых кислот экзометаболитов *Bifidobacterium* spp. являются индивидуальным молекулярным маркером штаммов бифидобактерий («фингерпринтом» штамма). Вероятно, это может быть связано с особенностями микросимбиоза дистального отдела толстого кишечника человека при ассоциативном симбиозе в условиях как прямого (контактного) взаимодействия, так и через микробные сигнальные метаболиты и систему кворум-сенсинга.

Таким образом, полученные материалы свидетельствуют о различиях метаболического профиля микроорганизмов рода *Bifidobacterium*, отражающих уникальность метаболома отдельных штаммов (штаммспецифичность) и определяют их функциональную активность, а метаболический профиль бифидофлоры может служить важнейшим критерием отбора эффективных пробиотических препаратов для лечения и профилактики дисбиозов кишечника человека.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Оренбургской области в рамках научного проекта №16-44-560553 «р. а» и фундаментальных научных исследований УрО РАН в рамках научных проектов № 15-5-4-7 «Роль бифидофлоры в формировании гомеостаза человека» и № 15-3-4-36 «Механизмы микробной регуляции ассоциативного симбиоза при инфекции».

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешкин В.А., Ардатская М.Д., Бабин В.Н. и др. Способ разделения смеси жирных кислот, фракций С2 — С7 методом газожидкостной хроматографии. Патент РФ № 2145511. Бюл. № 11, 2000.
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека. Екатеринбург, УрО РАН, 2014.
3. Затевалов А. М. Интегральная оценка состояния микробиоценозов биотопов желудочно-кишечного тракта и методы коррекции их нарушений. Автореф. дис. д-ра биол. наук. М., 2016.
4. Методические указания по контролю химических факторов. Определение массовых концентраций летучих жирных кислот (уксусная, пропионовая, изомасляная, масляная, валериановая, изокапроновая, капроновая) в биосредах (кровь) газохроматографическим методом. МУ № 4.1.2773-10. М., Роспотребнадзор, 2010.
5. Belenguer A., Duncan S.H., Calder A.G. et al. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium* adolescentis and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72 (5): 3593-3599.
6. Besten G., van Eunen K., Groen A. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 2013, 54 (9): 2325-2340.

7. Chen Y., Gozzi K., Yan F. et al. Acetic acid acts as a volatile signal to stimulate bacterial biofilm formation. *MBio*. 2015, 6 (3): e00392-15.
8. Fetissov S.O. Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016, 12. doi: .1038/nrendo.
9. Furusawa Y., Obata Y., Fukuda S. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013, 504 (7480): 446-450.
10. Kau A.L., Ahern P.P., Griffin N.W. Human nutrition, the gut microbiome, and immune system. *Nature*. 2011, 474 (7351): 327-336.
11. Murzyn A., Krasowska A., Stefanowicz P. et al. Capric acid secreted by *S. boulardii* inhibits *C. albicans* filamentous growth, adhesion and biofilm formation. *PLoS One*. 2010, 5 (8): e12050.
12. Russell D.A., Ross R.P., Fitzgerald G.F. et al. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 149 (1): 88-105.
13. Sun Y., O'Riordan M.X.D. Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. *Adv. Appl. Microbiol.* 2013, 85: 93-118.
14. Verbeke K.A., Boobis A.R., Chiodini A. et al. Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 2015, 28 (1): 42-66.
15. Jousimies-Somer H., Summanen P., Citron D. et al. *Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual*. Washington., 2002.

Поступила 21.09.16

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Т.В.Яковлева¹, Н.И.Брико², А.Н.Герасимов², Т.С. Салтыкова², А.А.Поздняков²

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКИХ СЕЗОНОВ ГРИППА 2015 — 2016 И 2009 — 2010 ГГ.

¹Министерство здравоохранения Российской Федерации, ²Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва

Цель. Проанализировать эпидемиологические и клинические особенности гриппа эпидемических сезонов 2009 — 2010 и 2015 — 2016 гг. *Материалы и методы.* Формы федерального государственного статистического наблюдения №№ 1, 2, 5, 6; информация с официального сайта НИИ гриппа Минздрава РФ; материалы различных конференций и конгрессов по проблеме гриппа; информационно-аналитические справки Министерства здравоохранения РФ. *Результаты.* Эпидемические подъемы заболеваемости в эпидемические сезоны 2009 — 2010 гг. и 2015 — 2016 гг. начинались в разное время и имели различную продолжительность. В структуре заболевших гриппом в эпидсезон 2009 — 2010 гг. преобладали дети до 14 лет, в сезон 2015 — 2016 гг. основная масса заболевших была представлена лицами 45 — 59 лет. Число летальных исходов с лабораторно подтвержденным диагнозом «грипп» в 2009 — 2010 гг. составило 687 случаев, а в 2015 — 2016 гг. — 663 случая. Практически все умершие от гриппа были не привиты против этой инфекции. Из общего числа умерших от гриппа заболевания сердечно-сосудистой системы отмечены у 484 человек. У большинства умерших отмечалось позднее обращение за медицинской помощью. *Заключение.* Эпидемический сезон по гриппу 2015 — 2016 гг. отличается от сезона 2009-2010 гг. динамикой развития заболеваемости и меньшим количеством тяжелых форм заболевания и летальных исходов. Это может быть связано с увеличением коллективного иммунитета к пандемическому штамму А(Н1N1)рdм09 как за счет проэпидемичивания в прошлые годы, так и в связи с увеличением охвата вакцинацией против гриппа.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 11—19

Ключевые слова: грипп, заболеваемость, летальность, вакцинация

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF EPIDEMIC SEASONS OF INFLUENZA 2015 — 2016 AND 2009 — 2010

¹Ministry of Health of Russian Federation; ²Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. Analyze epidemiologic and clinical features of influenza epidemic seasons 2009 — 2010 and 2015 — 2016. *Materials and methods.* Forms of federal state statistic observation No. 1, 2, 5, and 6; information from the official web-site of the Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of Russian Federation; materials of various conferences and congresses on problems of influenza; information-analytical certificates of the Ministry of Health of Russian Federation. *Results.* Epidemic morbidity increases in the season 2009 — 2010 and 2015 — 2016 started at various time and had different duration. Children younger than 14 years of age predominated in the structure of patients in the 2009 — 2010 epidemic season, the main mass of patients were presented by individuals aged 45 — 59 years in the 2015 — 2016 season. The number of lethal outcomes with laboratory confirmed influenza diagnosis in 2009 — 2010 was 687 cases, and in 2015 — 2016 — 663 cases. Almost all the deceased from influenza were not vaccinated against this infection. Cardiovascular system diseases were noted in 484 individuals of the total number of deceased. Most of the deceased were late to seek medical aid. *Conclusion.* Influenza epidemic season 2015 — 2016 differs from 2009 — 2010 season by dynamics of morbidity development and a lower amount of severe forms of the disease and lethal outcomes. This may be due to an increase of population immunity against pandemic strain A(H1N1)pdm09 via pro-epidemicizing in the recent years as well as an increase of influenza vaccination coverage.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 11—19

Key words: influenza, morbidity, lethality, vaccination

ВВЕДЕНИЕ

В течение долгого времени грипп остается одной из самых актуальных медицинских и социально-экономических проблем. Это одна из немногих инфекций, которая вызывает ежегодные эпидемии и периодически пандемии. Эпидемия гриппа оказывает негативное влияние не только на здоровье населения, но и на экономику, в связи со снижением производительности трудовых ресурсов, и создает чрезмерную нагрузку на службу здравоохранения.

События последних лет в мире, имевшие отношение к гриппу, были связаны с распространением пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Появление в 2009 г. нового антигенного варианта вируса гриппа А, его способность передаваться от человека к человеку стали причиной первой пандемии XXI века. Вирус не только закрепился в качестве эпидемического штамма в человеческой популяции, но и вытеснил из активной циркуляции эпидемический вирус гриппа A(H1N1). В России первую волну пандемии наблюдали в сезон 2009 — 2010 гг., последнюю волну в сезон 2015 — 2016 гг. При этом характер эпидемического процесса имел особенности, которые определялись различным долевым участием пандемического вируса и направлением его распространения в каждый из сезонов.

Цель работы — проанализировать эпидемиологические и клинические особенности гриппа в эпидемические сезоны 2009 — 2010 и 2015 — 2016 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования использовались данные по еженедельной заболеваемости и смертности и по охвату прививками против гриппа из форм федерального государственного статистического наблюдения № 5 и № 6,

данные из форм № 1 и № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за исследуемый период. Также были использованы формы статистического учета № 1 «Сведения об острых респираторных вирусных инфекциях, включая грипп» и формы статистического учета № 2 «Сведения о заболеваемости граждан гриппом, о случаях смерти от гриппа и о проведении неотложной и противовирусной терапии». Для получения информации о еженедельной заболеваемости гриппом использовали информацию с официального сайта НИИ гриппа Минздрава РФ [8]. Также использовались материалы 2 Межведомственной научно-практической конференции «Инфекционные болезни — актуальные проблемы, лечение и профилактика» (25 мая 2016 г., Москва), XXIII российского национального конгресса «Человек и лекарство» (11 — 14 апреля 2016 г., Москва), Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии юга России» (08 — 10 июня 2016 г., Краснодар) и др., а также информационно-аналитические справки Министерства здравоохранения РФ, подготовленные на основе материалов, поступивших из регионов страны.

Для анализа заболеваемости гриппом использовался метод ретроспективного эпидемиологического анализа с использованием пакетов статистических программ Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics version 22. Проводился корреляционный анализ с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена, коэффициента корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые рост гриппоподобной заболеваемости неясной этиологии был зафиксирован в феврале 2009 г. в Мексике, в апреле вирус был выделен и идентифицирован в Центрах по контролю и профилактике заболеваний (Атланта, США). Вирус отличался высокой способностью к трансмиссии, и к концу мая он был выявлен в различных странах мира [14]. Первый подъем заболеваемости гриппом был зарегистрирован в США и Канаде и продолжался в различных странах мира в мае—июне с последующим снижением в летний период [1, 2]. В России, несмотря на регистрацию sporadических завозных случаев пандемического гриппа в Москве, Санкт-Петербурге, Екатеринбурге и на Дальнем Востоке, эпидемии в этот период зарегистрировано не было [4 — 6, 13]. Вторая волна пандемического гриппа распространилась в странах Северного полушария во второй половине 2009 г.: в США в августе, в Канаде в сентябре, в Европе в октябре. Эта волна пандемии была моноэтиологичной с увеличением, по сравнению с первой, уровня заболеваемости, частотой госпитализации и летальными исходами от гриппа. В этот же период (октябрь—декабрь 2009 г.) в России развилась первая волна пандемии.

Первые признаки роста заболеваемости с превышением эпидемических порогов, вызванных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, были зарегистрированы на Дальнем Востоке (в Южно-Сахалинске) на 40 — 41 неделях 2009 г. и на Северо-Западе (Калининград). Последующее быстрое распространение пандемического вируса на 42 — 43 неделях привело к росту заболеваемости и в других городах Дальнего Востока (Хабаровске, Благовещенске, Сахалинской области), а затем и Сибири (Чите, Республике Хакасия) [11]. К 44 — 45 неделе большая часть территории нашей страны была охвачена пандемией. В эпидемический процесс включились города и субъекты Северо-Западного (Калининград, Мурманск, Санкт-Петербург, Республика Коми), Сибирского (Красноярск, Забайкальский край), Дальневосточного (Магадан, Амурская

область, Хабаровский край) и Уральского (Челябинская область) регионов, а также г. Москва [7, 12].

По данным лабораторного мониторинга, с 3 декады октября пандемический грипп занял лидирующие позиции, составив к концу месяца в этиологической структуре обследованных больных 22,3%. В ноябре эпидемия гриппа продолжала развиваться и регистрировалась на всей территории России. Пик заболеваемости пришелся на 47 — 49 недели 2009 г. (вторая и третья декады ноября), когда превышение порогового уровня заболеваемости было зарегистрировано практически во всех субъектах Российской Федерации. В ноябре удельный вес вируса А/Н1N1/09 в этиологической структуре обследованных больных гриппом и ОРВИ достиг 30,4% и его циркуляция отмечалась во всех регионах страны [11]. Существенное снижение заболеваемости гриппом и ОРВИ в целом на территории страны отмечено со второй половины декабря 2009 г. На фоне снижения заболеваемости в декабре отмечено и снижение удельного веса пандемического гриппа в структуре лабораторно обследованных больных гриппом и ОРВИ (19,2%).

В эпидемию 2009 — 2010 гг. максимальные средние показатели заболеваемости населения (10,3 и 10,2%) и продолжительности эпидемии (8 и 7,8 нед.) отмечены в городах Дальнего Востока и Сибири и минимальными были в городах Южного ФО [11].

Таким образом, наибольшее (в 5 и более раз) превышение эпидемического порога заболеваемости было зарегистрировано в 31 субъекте (большинстве субъектов Приволжского, Сибирского, Дальневосточного ФО, а также части территорий Южного, Северо-Западного и Уральского ФО); превышение от 2 до 4 раз — в 30 субъектах (половине территорий Южного, Сибирского и Северо-Западного ФО, части Приволжского и Уральского федеральных округов); превышение до 100% — в остальных территориях (преимущественно — в Центральном, Северо-Западном и Южном округах).

Общая продолжительность эпидемии по стране в 2009 — 2010 гг. составила 17 недель. Средняя длительность эпиднеблагополучия в субъектах Российской Федерации составила 7 — 9 недель. Наибольшая продолжительность была отмечена в г. Красноярск (13 недель), г. Чита (13 недель) и Чувашской Республике (10 недель).

По данным официальной статистики (форма государственного статистического наблюдения № 1), за период эпидемии (октябрь—декабрь 2009 года) в России переболели гриппом и ОРВИ (суммарно) 13,26 млн человек, что на 5,82 млн больше, чем за аналогичный период предыдущего года, когда эпидемия гриппа не была зарегистрирована. Только гриппом за время эпидемии (октябрь—декабрь 2009 г.) по стране переболело 4,09% от общей численности населения.

В общей структуре лабораторно подтвержденных случаев гриппа А/Н1N1/09 в Российской Федерации на долю взрослого населения приходилось 60,5% случаев, при этом наибольшее количество заболевших взрослых зарегистрировано в возрасте 18 — 39 лет (44,2% от всех лабораторно подтвержденных случаев).

С целью оптимизации мониторинговых исследований, изучения генетической структуры вируса гриппа А/Н1N1/09 для своевременного определения изменений возбудителя, в том числе по чувствительности к противовирусным препаратам, было организовано молекулярно-генетическое изучение вируса. В 2009 г. на базах ГНЦ ВБ «Вектор» и ЦНИИЭ Роспотребнадзора исследован материал более чем от 1,5 тыс. пациентов, включая секционный материал от

летальных случаев. Проведены молекулярно-генетические исследования более 400 вирусов гриппа А/Н1N1/09, которые подтвердили, что значительной антигенной вариабельности среди циркулирующих вирусов в Российской Федерации и в мире к настоящему моменту не наблюдается. Подтверждена идентичность российских штаммов с изолятом А/California/04/2009(Н1N1) [9].

При изучении резистентности к противогриппозным препаратам в нашей стране не выявлено устойчивости возбудителя к рекомендуемым противовирусным средствам. С января 2010 г. заболеваемость гриппом и ОРВИ в большинстве субъектов Российской Федерации регистрировалась на неэпидемическом уровне.

По данным лабораторного мониторинга, в этиологической структуре обследованных больных ОРВИ и гриппом в число доминирующих возбудителей наравне с вирусами парагриппа, РС-инфекции и аденовирусной инфекции вышел вирус гриппа В, составивший 4,4%. Удельный вес гриппа А/Н1N1/09 в этиологической структуре обследованных больных с середины февраля 2010 г. стабильно составлял около 1% и практически соответствовал долевого соотношению других циркулирующих вирусов сезонного гриппа (0,5 — 2,0%).

В 2009 г. в целом по стране были привиты против сезонного гриппа 34,4 млн человек, что составляет 24% от численности населения страны. За счет федерального бюджета были привиты 27 млн человек. За счет других источников финансирования — областных и местных бюджетов, страховых компаний, средств организаций, граждан и др. — дополнительно вакцинированы более 7,3 млн человек. Наряду с сезонной вакцинацией была организована иммунизация лиц из групп риска отечественными вакцинами против пандемического гриппа [9].

При подготовке к эпидсезону 2015 — 2016 гг. против гриппа были привиты 44,9 млн человек, что составляет 31,3% от численности населения страны. Из них за счет федерального бюджета были привиты 40 млн чел. В последний эпидемический сезон помимо вакцин Гриппол и Гриппол плюс вакцинацию взрослого населения осуществляли и вакцинами Совигрипп и Ультрикс, для детского населения, как и в предыдущие годы, использовалась вакцина Гриппол плюс [10].

В отличие от эпидемического сезона 2009 — 2010 гг., в сентябре—ноябре 2015 г. на территории РФ, как и во всем Европейском регионе, отмечалась низкая активность ОРВИ. В структуре циркулирующих вирусов преобладали (98 — 99%) вирусы негриппозной этиологии: парагриппа, адено- и РС-инфекции. На 52 неделе 2015 г. (21 — 27.12.2015) в 5 раз (до 14%) увеличилась доля циркулирующих вирусов гриппа, которая продолжила рост и к началу эпидемического подъема заболеваемости (с 3 недели 2016 г.) составила уже 50% [8]. Эпидемия 2016 г. началась в обычный для гриппа период [3, 15], [Карпова Л.С. и др., 2016] с южных регионов нашей страны: на 2-3 неделе 2016 г. в эпидпроцесс были включены южные регионы: РСО (Алания) и КЧР (на 2 неделе 2016 г.), Республика Адыгея, Ставропольский край, Ростовская, Волгоградская и Астраханская обл. (на 3 неделе 2016 г.), что, возможно, связано с эпидемическим неблагополучием по гриппу и ОРВИ в Украине в этот период. На 3 неделе 2016 г. (11 — 17.01.2016) по данным НИИ гриппа превышение эпидпорогов заболеваемости гриппом отмечено в 13 субъектах РФ, относящихся ко всем федеральным округам. Самым высоким темп прироста на этой неделе был в Северо-Западном ФО во всех возрастных группах, особенно среди взрослого населения (на 361,2%).

Пик эпидемии пришелся на 5 — 6 недели 2016 г. (25.01 — 31.01.2016 и 01.02 — 07.02.2016), когда превышение недельных эпидемических порогов отмечено соответственно в 74 и 68 субъектах РФ с вовлечением в эпидемический процесс всех возрастных групп населения [9]. Прирост заболеваемости гриппом и ОРВИ отмечен во всех федеральных округах и во всех возрастных группах. На 5 неделе самый высокий темп прироста по населению в целом отмечался в Южном ФО (на 70,3%).

На 5 неделе заболеваемость гриппом и ОРВИ в 59 городах в среднем была выше эпидемических порогов по населению в целом на 111,7% и во всех возрастных группах (среди детей 0 — 2 лет на 37,6%, 3 — 6 лет на 72,2% и 7 — 14 лет на 68,9% и выше всего среди лиц старше 15 лет — на 134,4%). Заболеваемость гриппом и ОРВИ в 59 городах по населению в целом составила 134,4 случаев гриппа и ОРВИ на 10 тыс. чел., что выше базовой линии для России (69,5) на 93,4% и недельного эпидемического порога (63,5) на 111,7%.

На 6 неделе, по сравнению с предыдущей неделей, отмечена тенденция снижения заболеваемости в наблюдаемых городах России, расположенных на европейской территории России. Однако на Дальнем Востоке и в Сибири продолжался рост заболеваемости. Заболеваемость гриппом и ОРВИ в 59 городах в среднем была выше эпидпорогов по населению в целом на 97,6% и во всех возрастных группах (среди детей 0 — 2 лет на 24,4%, 3 — 6 лет на 42,4% и 7 — 14 лет на 39,5% и выше всего среди лиц старше 15 лет — на 142,8%) [8].

Заболеваемость гриппом и ОРВИ в 59 городах в целом составила 125,2 случаев гриппа и ОРВИ на 10 тыс. чел., что выше базовой линии для России (69,5) на 80,1% и недельного эпидпорога (63,4) на 97,6%.

Таким образом, на 6 и 7 неделях по стране в целом наметился спад заболеваемости. Эпидемия окончилась при сравнении с базовой линией на 9 календарной неделе 2016 г., с недельным эпидемическим порогом для России в целом — на 12 неделе и по отдельным городам — только на 14 неделе — в Якутске [Карпова Л.С. и др., 2016]. Длительность эпидемии 2015 — 2016 гг. составила 5 — 6 недель.

Наиболее высокие интенсивные показатели заболеваемости по совокупному населению (от 170 до 300 на 10 тыс. населения) на пике сезона отмечены в Вологодской, Тюменской, Архангельской, Ивановской областях, Ненецком и Ямало-Ненецком автономных округах, Санкт-Петербурге, Республике Саха (Якутия) и Алтайском крае.

В 2015 — 2016 гг. максимальные показатели заболеваемости гриппом на пике заболеваемости среди детей 0 — 2 лет (от 70 до 105 на 100 тыс.) зарегистрированы в Ивановской, Вологодской обл., Ненецком и ЯНАО, Республике Коми; 3 — 6 лет (от 80 до 124 на 100 тыс.) — в Ивановской и Вологодской областях, Санкт-Петербурге и Ненецком АО; 7 — 14 лет (от 50 до 70 на 100 тыс.) — в Ивановской, Архангельской, Тюменской областях, Санкт-Петербурге и Ненецком АО; взрослых (от 8 до 13,3 на 100 тыс.) — в Вологодской, Калининградской, Тюменской, Архангельской областях, Санкт-Петербурге и Ненецком АО.

Таким образом, при сравнении эпидемий 2009 — 2010 гг. и 2015 — 2016 гг. обращает на себя внимание тот факт, что по интенсивности эпидемического процесса эти эпидемии имели схожие показатели.

Эпидемический процесс эпидемии гриппа в 2009 г. начался на 40 неделе и достиг своего максимума на 47 неделе (138,2 на 10 тыс. населения), а затем начал постепенное снижение вплоть до 2 недели 2010 г., когда заболеваемость

составила 28,7 на 10 тыс. населения. Однако начиная с 5 недели 2010 г. началась 2 волна эпидемии, не столь интенсивна, как первая, достигшая к 8 неделе показателя 75,8 на 10 тыс. В то же время, обращает на себя внимание тот факт, что в сезоне 2015 — 2016 гг. эпидемический подъем заболеваемости значительно сместился на первые недели 2016 г. и начался с 4 недели, превысив эпидпорог в 68,9 случаев на 10 тыс. населения. Пик заболеваемости пришелся на 5 — 6 недели 2016 г. и составил 132,2 и 125,5 на 10 000 соответственно. Снижение же заболеваемости ниже пороговых значений произошло на 9 неделе и составило 60 на 10 000 населения.

При анализе числа госпитализаций в период эпидемий 2009 — 2010 гг. и 2015 — 2016 гг. выявлено, что в сезон 2009 — 2010 гг. наибольшее число госпитализированных было на 46 и 48 неделях 2009 г. (3075 и 3295 человек соответственно). В то время, как в эпидемию 2015 — 2016 гг. самое большое число госпитализированных отмечено на 5, 6 и 8 неделях 2016 г. (3538, 4109 и 3099 соответственно). По общему количеству госпитализированных эпидемический сезон 2015 г. оказался более интенсивным [Львов Д.К., 2016].

Число зарегистрированных летальных исходов лабораторно подтвержденного гриппа в пандемию 2009 г. составило 687 случаев. В возрастной структуре умерших от гриппа преобладали лица в возрасте от 18 до 53 лет (78,8%), при этом доля каждой из трех возрастных категорий (18 — 31, 32 — 41, 42 — 53 года) была приблизительно одинаковой (от 22,9 до 28,7%). Доля лиц в возрасте от 54 до 64 лет составила 12,8%, а лиц старше 65 лет — 2,4% ($p < 0,05$).

Фактором риска смертельных исходов в период циркуляции пандемического вируса A(H1N1)pdm09 являлось наличие хронической патологии. В пандемию 2009 г. среди умерших больных наиболее часто встречался метаболический синдром (ожирение, диабет и гипертоническая болезнь) — у 8,1%, в том числе ожирение — у 6,5% и диабет — у 3,4%; болезни желудочно-кишечного тракта (гепатит, панкреатит, болезни почек) — у 7,1% и иммунодефицитные состояния (ВИЧ-инфекция, гепатиты В и С, болезни крови, новообразования) — у 5,7%. Другие виды патологии встречались реже, в том числе и сердечно-сосудистая патология (5,0%), которая была на 4 месте, затем следовали болезни легких (4,0%) и энцефалопатии (2,4%). Особую группу риска составляли беременные женщины, особенно во II — III триместре; 7 — 10% случаев госпитализации приходилось на беременных во II — III триместре, необходимость проведения им интенсивной терапии возникала в 10 раз чаще.

В ходе эпидемического подъема заболеваемости в 66 субъектах Российской Федерации за эпидсезон 2015 — 2016 гг. на 4 мая 2016 г. зарегистрированы 663 случая гриппа с летальным исходом с лабораторным подтверждением выделения РНК вируса гриппа методом ПЦР. Из числа умерших — 29 детей (4,4%) и 634 (95,6%) взрослых в возрасте от 20 до 90 лет, среди умерших — 8 (1,2%) беременных женщин в возрасте от 26 до 44 лет. Практически все умершие не были привиты против гриппа. Только 5 человек были привиты: 3 человека вакциной Гриппол, 1 вакциной Совигрипп и 1 — вакцина неизвестна.

При анализе летальности от гриппа в эпидемический сезон 2015 — 2016 гг. обращает на себя внимание тот факт, что наибольшие показатели летальности отмечаются в Северокавказском ФО и Крымском ФО (4,43 и 4,59% соответственно). Они более, чем в 3 раза, превышают общероссийский показатель (0,95%).

При анализе летальных исходов по возрастам получено, что средний воз-

раст умерших — $49,83 \pm 0,63$ лет. Средний возраст мужчин — $48,08 \pm 0,84$ лет, женщин — $51,84 \pm 0,95$ года, беременных — 34,1. Различия среднего возраста достоверно с $p=0,003$.

При анализе взаимосвязи даты заболевания и случаев смерти было выявлено, что с началом подъема заболеваемости в январе 2016 г. увеличилось число летальных исходов, которое достигло максимума 20 января 2016 г. и составило 28 летальных исходов за один день. 18 и 19 января было зарегистрировано по 26 летальных исходов от лабораторно подтвержденного гриппа. Большое количество летальных исходов регистрировалось ежедневно, вплоть до 1 февраля (23 случая). Начиная с 6 февраля 2016 г. количество смертельных исходов постепенно снижалось.

Среди основных причин летальных исходов при гриппе можно назвать следующие: отсутствие вакцинации, позднее обращение за медицинской помощью (более 3 суток от момента заболевания), отсутствие адекватного лечения на догоспитальном этапе, наличие сопутствующей патологии (ожирение, сахарный диабет, ИБС), возраст старше 65 лет.

В нашем исследовании мы проанализировали имеющиеся данные по сопутствующим диагнозам, которые были поставлены врачами-клиницистами тем больным, которые умерли от гриппа. Наиболее часто встречающиеся диагнозы: гипертоническая болезнь (ГБ), острый инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца (ИБС), острое нарушение мозгового кровообращения, отек мозга [Лобзин Ю.В., 2016].

Всего из общего числа умерших от гриппа (663 человека) заболевания сердечно-сосудистой системы отмечены у 484 человек (73%), гипертоническая болезнь — у 208 чел. (31%), ИБС — у 225 чел. (34%). Обращает на себя внимание тот факт, что диагнозы ишемическая болезнь сердца и гипертоническая болезнь очень часто встречаются совместно.

При анализе данных по гипертонической болезни у 49 чел. (7,4%) была отмечена ГБ I степени, у 86 (13,6%) — II степени, у 71 (10,7%) — III степени и у 2 человек (0,3%) — IV степени. Таким образом, 24,3% больных с диагнозом «грипп» имели гипертоническую болезнь II или III степени.

При анализе данных по ишемической болезни сердца выявлено, что средний возраст больных с ИБС составил $61,97 \pm 0,97$ лет. При анализе частоты встречаемости ИБС у больных с диагнозом «грипп» обнаружено, что наиболее часто (45% от всех диагнозов) диагноз ИБС встречается в Северо-Западном и Центральном федеральных округах. Различия частоты ИБС между округами достоверно различаются с $p=0,002$.

Известно, что исход болезни очень часто зависит от быстроты обращения за медицинской помощью. Мы проанализировали данные о времени обращения за медицинской помощью от начала болезни. Основное число заболевших, а затем и умерших от гриппа обращались за помощью не в первые два дня болезни, а на 3 — 8 дни, что могло сыграть отрицательную роль в возможном выздоровлении. Средняя продолжительность этого периода у мужчин и женщин достоверно не различается, отсутствовала также и корреляция с возрастом. В течение рассматриваемого эпидемиологического периода средний промежуток времени между началом заболевания и обращением за медицинской помощью достоверно снижался ($p < 0,001$). На 4 — 5 и 6 — 7 неделях 2016 г. между заболеванием и обращением за медицинской помощью отмечался самый короткий разрыв во времени (3,76 и 3,03 дня соответственно). Это могло быть связано с интенсивным распространением и агрессивностью вируса

гриппа. Длительность промежутка времени от начала заболевания до обращения за медпомощью в среднем по стране составила 4,76 дня.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпова Л.С., Маринич И. Г., Столярова Т.П., Поповцева Н.М. Анализ эпидемии гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1) в России в сезон 2009 — 2010 гг. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 52 (3): 23-30.
2. Карпова Л.С., Маринич И.Г., Поповцева Н.М., Столярова Т.П. Эпидемиология гриппа А(H1N1) Калифорния/07/09 среди населения 49 городов России в сезон 2009—2010 гг. Журн. микробиол. 2011, 3: 14-20.
3. Карпова Л.С., Соминина А.А., Бурцева Е.И., Пелих М.Ю., Феодоритова Е.Л., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Киселев О.И. Сравнение эпидемий гриппа в России, вызванных пандемическим вирусом гриппа А(H1n1)pdm09 в период с 2009 по 2013 г. Вопросы вирусологии. 2015, 60 (3):19-24.
4. Коновалова Н.И., Еропкин М.Ю., Гудкова Т.М. и др. Этиологическая характеристика эпидемий гриппа 2006 — 2009 гг. в РФ (по данным НИИ гриппа СЗО РАМН). Вопросы вирусологии. 2010, 4: 9-16.
5. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г. и др. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ № 2452 от 24.05.2009) первого штамма А/IV-Moscow/01/2009 от больного в Москве. Вопросы вирусологии. 2009, 5: 10-14.
6. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Прилипов А. Г., Колобухина Л. В., Малышев Н. А. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А(H1N1) в России. Вопросы вирусологии. 2010, 55 (3): 4-9.
7. Мельникова А. А. Организация мероприятий по предупреждению распространения пандемического гриппа в Российской Федерации. Бюлл. пробл. комис. РАМН. Грипп и гриппоподобные инфекции. СПб, 2010, с. 21-28.
8. Официальный сайт ФГБУ НИИ гриппа Минздрава РФ. http://www.influenza.spb.ru/system/epidemiological_situation/situation_on_a_flu/.
9. Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 13 апреля 2010 г. № 01/5578-10-32 «Об итогах пандемии гриппа А/Н1N1/09 в мире и Российской Федерации в эпидсезон 2009 — 2010 гг. и прогнозе на эпидсезон 2010 — 2011 гг.».
10. Попова А.Ю. и др. О предварительных итогах эпидемического сезона 2015-2016 гг. по гриппу и ОРВИ в РФ. Consilium medicum. 2016,18 (3): 8-11.
11. Соминина А. А., Грудинин М. П., Еропкин М. Ю. и др. Анализ пандемии гриппа в России как части глобального процесса по материалам референс-центра по мониторингу гриппа. Журн. микробиол. 2011, 3:20-26.
12. Соминина А. А., Карпова Л. С., Смородинцева Е. А. и др. Характеристика первой волны пандемии гриппа А(H1N1) в России по материалам Референс-центра по мониторингу гриппа при НИИ гриппа. Бюлл. пробл. комис. РАМН. Грипп и гриппоподобные инфекции. СПб, 2010, с. 44-69.
13. Щелканов М.Ю., Львов Д.К., Федякина И.Т. и др. Динамика распространения пандемического гриппа А/H1N1swI на Дальнем Востоке в 2009 г. Вопросы вирусологии. 2010, 55 (3): 8-10.
14. Human infection with new influenza A(H1N1) virus: Mexico update March–May 2009. Wkly. Epidemiol. Rec. 2009, 84 (23): 213-220.
15. Komissarov A., Fadeev A., Petrov S. et. al. Rapid spread of influenza A(H1N1)pdm09 viruses with a new set of specific mutations in the internal genes in the beginning of 2015/2016 epidemic season in Moscow and Saint-Petersburg (Russian Federation). Infl. Other Resp. Vir. May 2016, 10 (3). doi: 10.1111/irv. 12389.

Поступила 05.09.16

Контактная информация: Салтыкова Татьяна Сергеевна, к.м.н.,
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, р.т. (499)248-69-70

*А.П.Бондаренко¹, Т.А.Зайцева², О.Е.Троценко¹, Ю.А.Гарбуз³,
Т.Н.Каравянская², Т.В.Корита¹, Е.Н.Присяжнюк³, А.Т.Подколзин⁴,
В.А.Шмыленко¹, Т.Н.Тригорова³, О.Б.Бондарь³*

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ДИЗЕНТЕРИЕЙ ЗОННЕ В ХАБАРОВСКЕ И ХАБАРОВСКОМ КРАЕ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ АТИПИЧНЫМ МАННИТНЕГАТИВНЫМ ВОЗБУДИТЕЛЕМ

¹Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии, ²Управление Роспотребнадзора по Хабаровскому краю, ³Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае; ⁴Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

Цель. Определить особенности эпидемического процесса (ЭП) дизентерии Зонне в Хабаровском крае в 2012 — 2014 гг., обусловленной атипичным возбудителем. *Материалы и методы.* Дана детальная характеристика 161 культуры шигелл Зонне, выделенных от 81 больного из эпидемического очага в детском доме-интернате г. Бикин, а также от 22 больных из спорадических и групповых очагов дизентерии в г. Хабаровск (биохимический тип, колициногенотип, спектр лекарственной устойчивости). Молекулярно-биологическое субтипирование проведено для 11 штаммов методом пульс-электрофореза (PFGE). *Результаты.* Представлены материалы наблюдения за длительным очагом дизентерии Зонне с контактно-бытовым путем распространения инфекции в детском доме-интернате для инвалидов (октябрь 2012 г. — сентябрь 2014 г.). Заболевания этиологически связаны с атипичным маннитнегативным вариантом шигелл, выявленным впервые за 40 лет наблюдения на территории Хабаровского края. Эпидемический процесс шигеллеза поддерживался за счет длительного носительства возбудителя у переболевших и особого контингента больных дома инвалидов. Культуры шигелл, выделенные в очаге, относились к одному колициногенотипу, двум разным лекарственноустойчивым клонам, но к одному генотипу, установленному методом PFGE. *Заключение.* Результаты исследований свидетельствуют о важности определения традиционных фенотипических и современных генотипических вариантов шигелл и необходимости поиска аргументов, дополнительных методических приемов для установления сходства или различия изолятов шигелл, выделенных как в пределах одной вспышки заболеваний, так и для сравнения штаммов, циркулирующих на разных территориях.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 20—28

Ключевые слова: дизентерия Зонне, маннитнегативные шигеллы, фенотипические и генотипические маркеры

*A.P.Bondarenko¹, T.A.Zaitseva², O.E.Trotsenko¹, Yu.A.Garbuz³,
T.N.Karavyanskaya², T.V.Korita¹, E.N.Prisyazhnyuk³, A.T.Podkolzin⁴,
V.A.Shmylenko¹, T.N.Trigorlova³, O.B.Bondar³*

SONNEI DYSENTERY MORBIDITY IN KHABAROVSK AND KHABAROVSK REGION DUE TO ATYPICAL MANNITOL-NEGATIVE CAUSATIVE AGENT

¹Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Administration of Federal Service of Surveillance for Protection of Consumers Rights and Human Welfare in Khabarovsk Region, ³Centre of Hygiene and Epidemiology in Khabarovsk Region; ⁴Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Aim. Determine features of epidemic process (EP) of Sonnei dysentery in Khabarovsk Region in 2012 — 2014 due to atypical causative agent. *Materials and methods.* Detailed characteristics of 161 cultures of *Shigella sonnei* isolated from 81 patients from epidemic focus in children boarding school in Bikin as well as from 22 patients from sporadic and group foci of dysentery in Khabarovsk (biochemical type, colicin-genotype, spectrum of drug resistance) is given. Molecular-biologic subtyping was carried out for 11 strains by Pulsed Field Gel Electrophoresis method (PFGE).

Results. Materials of observation of a prolonged foci of *Sonnei* dysentery with contact-domestic transmission route of the infection in children boarding house for disabled (October 2012 — September 2014) are presented. The diseases are etiologically connected with atypical mannitol-negative types of shigella isolated for the first time in 40 years of observation in Khabarovsk region. Epidemic process of shigellosis was supported by prolonged carriership of the causative agent in patients and special contingent of the nursing home. Shigella cultures isolated in the focus belonged to the same colicin-genotype and 2 distinct drug resistance clones, but a single genotype established by PFGE method. *Conclusion.* Results of the studies give evidence on the importance of determination of traditional phenotypic and contemporary genotypic variants of shigella and the necessity of search for arguments, additional methodic approaches for establishing similarities and differences of shigella isolates from within the same outbreak of the diseases as well as for comparison of strains circulating in different territories.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 20—28

Key words: *Sonnei* dysentery, mannitol-negative types of shigella, phenotypic and genotypic markers

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в Хабаровском крае на фоне низкого уровня заболеваемости дизентерией Зонне (0,29 — 0,22 на 100 тыс. населения в 2009 и 2015 гг.) периодически регистрируются вспышки дизентерии, различающиеся по интенсивности, другим эпидемиологическим проявлениям и характеристике возбудителя [3].

Так, нами была описана вспышка дизентерии Зонне в детском доме-интернате для детей инвалидов (ДДИ) в городе Бикин Хабаровского края в 2012 г. (показатель заболеваемости 7,23 на 100 тыс. населения по краю и 95,95 на 100 тыс. населения в Бикинском районе) [3, 4]. Вспышка характеризовалась рядом особенностей: она была длительной, протекала в две волны и была вызвана атипичным возбудителем.

В связи с тем, что вспышка имела продолжение в виде третьей волны заболеваний, возникла необходимость в дополнительном анализе ситуации.

Для характеристики возбудителя использовали традиционные и молекулярно-биологические методы субтипирования шигелл [2, 3].

Цель данной работы — определить особенности эпидемического процесса дизентерии Зонне в Хабаровском крае в 2012 — 2014 гг., обусловленной атипичным возбудителем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичное выделение культур было выполнено на базе бактериологических лабораторий Центра гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае, Детской инфекционной клинической больницы им. А.К.Пиотровича, Бикинской центральной районной больницы. Выделение и идентификацию шигелл проводили общепринятыми методами [5, 6]. При обогащении исходного материала применяли селенитовую среду.

Всего была выделена 161 культура шигелл Зонне от 103 больных дизентерией, в т. ч. от 81 больного из эпидемического очага в ДДИ г. Бикин и от 22 больных из спорадических и групповых очагов дизентерии в г. Хабаровск.

Фенотипические маркеры для всех культур выявляли в лаборатории бактериальных инфекций Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии.

Биохимический тип определяли по отношению к мальтозе, рамнозе, ксиллозе. Колициногенотип — с использованием 9 индикаторов, чувствительных

или резистентных к определенным типам колицинов [2]. Лекарственную устойчивость исследовали методом дисков по отношению к 11 препаратам (гентамицину, канамицину, тетрациклину, стрептомицину, ампициллину, левомицетину, цефотаксиму, цефиксиму, ципрофлоксацину, фуразолидону, налидиксовой кислоте). Часть штаммов параллельно тестирована в баканализаторе ВИТЕК2 Compact30.

Молекулярно-биологическое субтипирование проведено для 11 штаммов шигелл Зонне на базе референс-центра по мониторингу возбудителей острых кишечных инфекций в Центральном НИИ эпидемиологии (Москва). Использован метод PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) — анализ набора продуктов рестрикции тотальной ДНК в пульсирующем электрическом поле с использованием протоколов PulseNet International Network. Обработка полученных данных проводилась с применением программного комплекса Bionumerix 6.6 (Applied Maths, США) [Кулешов К.В. и др., 2010].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Длительный и массивный очаг дизентерии Зонне (с октября 2012 г. по сентябрь 2014 г.) наблюдался в г. Бикин в детском доме-интернате для умственно отсталых детей.

Эпидемиологический фон в Бикинском районе, предшествующий возникновению очага, был вполне благоприятным. Случаев групповой заболеваемости острыми кишечными инфекциями в этот период на территории района не зарегистрировано.

В бикинском ДДИ размещено 210 подопечных в возрасте от 4 до 26 лет. Обслуживающий персонал насчитывает 201 человек. Дом-интернат расположен в двухэтажном помещении коридорного типа с полным инженерным обеспечением. В здании расположено 6 спальных корпусов, учебные помещения, медицинский блок. Спальные корпуса специализированы по возрастному, половому признакам подопечных и тяжести их состояния. Пищеблок расположен в отдельном отсеке на первом этаже здания и имеет необходимый набор производственных помещений. Питание организовано в общей столовой. Больные, не имеющие возможности передвигаться, питаются в палатах. Раздачу пищи, кормление лежачих подопечных проводят санитарки.

Установлено, что первые случаи заболеваний с признаками острой кишечной инфекции стали регистрироваться с 20.10.2012 г. в корпусе № 5 (дети от 6 до 14 лет). Позже — с 24.10.2012 г. — в корпусе № 2 (лежачие и колясочники), с 26.10.2012 г. — в корпусе № 3 (дети с тяжелой умственной отсталостью). Число больных нарастало постепенно, максимум случаев зарегистрирован 08.11.2012 и 9.11.2012 г. (по 15 случаев в день). Наибольшее число заболевших зарегистрировано в корпусах №№ 2, 3 и 5. В других корпусах (№№ 1, 4, 6 — мальчики и девочки 11 — 18 лет) наблюдались единичные случаи заболеваний.

Доминирующие симптомы заболевания: жидкий стул от 2 до 7 раз — у 84,7% заболевших, однократная рвота — у 28,2% подопечных, боли в животе — у всех заболевших, повышение температуры тела до 37°C — в 32,6% случаев, до 38°C — у 50% лиц, до 39 — 40°C — у 17,4% заболевших.

Состояние легкой степени тяжести — у 37% больных, средней степени тяжести у 56,5% больных, тяжелой степени — у 6,5% больных.

Заболевания протекали в 3 волны. С октября по декабрь 2012 г. выявлено 45 бактериологически подтвержденных случаев, в т. ч. у 3 взрослых из обслуживающего персонала (1 воспитатель и 2 санитарки). Во вторую волну

(январь—март 2013 г.) выявлено 28 новых бактериовыделителей, в т. ч. у 1 работницы медицинского блока. В третью волну (август—сентябрь 2014 г.) выявлено 8 новых случаев. В последующий анализ и разработку вошли 81 первичных бактериовыделителей.

При многократном бактериологическом обследовании пациентов и персонала в период с 20.10.2012 г. по 18.09.2014 г. шигеллы Зонне выделены от 81 человека, в т.ч. от детей 4 — 5 лет — 7 человек (8,6%), 6 — 7 лет — от 11 человек (13,6%), 8 — 10 лет — от 21 человека (26,0%), 11 — 14 лет от 15 человек (18,5%), старше 14 лет и взрослых — от 27 человек (33,3%). В последнюю группу вошли 4 человека из числа обслуживающего персонала.

В период 1 волны (октябрь—декабрь 2012 г.) в целях максимального выявления и последующей санации бактериовыделителей было выполнено 660 диагностических исследований. Высеваемость шигелл в первую половину ноября была высокой в группе диагностических анализов (50 — 80%) и при обследовании контактных лиц (~42%). При обследовании сотрудников возбудитель был выявлен в 0,8% случаев (у 3 лиц). Во вторую половину ноября высеваемость снизилась и составила 18,2% для переболевших и 13,4% для контактных лиц из числа подопечных. В декабре при обследовании контактных лиц бактериовыделителей не выявили.

В январе 2013 г. появились новые больные (2 волна: январь—март 2013 г.). Из 26 бактериовыделителей у 18 шигеллы были выявлены впервые, 8 человек из числа бактерионосителей первой волны вновь выделили шигеллы. В феврале из 9 положительных случаев — 6 новых бактериовыделителей и 3 из первой волны. В марте 2013 г. зарегистрировано 4 новых случая и 2 из первой волны. Все вновь выявленные бактериовыделители и повторные выделители изолированы в лечебные учреждения.

Всего в 1 и 2 волны заболеваний было выполнено 1565 исследований, позволивших выявить 73 первичных случаев заболеваний.

Через 1,5 года от даты окончания второй волны (март 2013 г.) или почти через 2 года от начала первой волны заболевания (20.10.2012 г.) с 28.08.2014 г. по 02.09.2015 г. (3 волна) зарегистрировано 8 новых случаев бактериовыделения шигелл Зонне, идентичных по своим свойствам штаммам 1 и 2 волн заболеваний. Среди 8 человек — трое больных острой дизентерией и 5 контактных лиц. Все бактериовыделители были подопечными 5 корпуса (дети от 4 до 11 лет). При этом семь человек из восьми участников третьей волны заболеваний поступили в ДДИ с мая 2013 г. по февраль 2014 г., то есть не присутствовали в интернате в период 1 и 2 волн заболеваний. Один из восьми пострадавших находился в интернате в 1 и 2 волну заболеваний, но не был отмечен среди бактериовыделителей.

Многократные обследования подопечных ДДИ, выполняемых с интервалом в 1 — 2 недели, позволили установить кратность и длительность выделения шигелл от одних и тех же лиц. Так, 51 человек (63%) выделил возбудитель однократно, 30 человек (37%) — повторно, а именно: двукратно (24,7%), трехкратно (7,4%), четырехкратно (4,9%).

Несмотря на большой объем проведенных лечебных, санитарно-гигиенических, противоэпидемических мероприятий, фагопрофилактику, отмечено длительное, до 2 (8,6% случаев), 3 (2,5%) и 4 месяцев (2,5%) бактериовыделение шигелл Зонне от одних и тех же больных.

Следует отметить, что все штаммы были чувствительны к действию дизентерийного поливалентного бактериофага серии Н33 со сроком годности до 09.2013 г. и серии Н71 со сроком годности до 05.2014 г. производства НПО

«Микроген» (Нижний Новгород). Однако лизис культур был неполным и оценивался на два или три креста при четырехкрестовой оценке полноты фаголизиса.

Таким образом, в ДДИ г. Бикин сформировался длительный очаг дизентерии Зонне с множественными случаями заболеваний. Вероятный источник инфекции — персонал ДДИ. Путь передачи возбудителя — контактно-бытовой. ЭП поддерживался за счет длительного носительства возбудителя у переболевших и особого контингента подопечных ДДИ. Характерной особенностью длительного очага дизентерии Зонне стало трехволновое течение ЭП.

Возникновению очага способствовали выявленные в ДДИ нарушения санитарно-эпидемиологических требований, предъявляемых к учреждениям интернатного типа для длительного содержания определенных контингентов населения, а также несоблюдение установленного режима обслуживания лежачих подопечных ДДИ и колясочников.

Так, кормление и гигиеническое обслуживание лежачих подопечных осуществлялись младшим медицинским персоналом; уборка и кормление проводились в одной спецодежде; младший медицинский персонал не был закреплен за одним корпусом, свободно перемещался по отделениям ДДИ. Отмечены несвоевременные выявление и изоляция больных дизентерией, запоздалое информирование органов санэпиднадзора, позднее проведение санитарно-противоэпидемических мероприятий и т. д.

Все выделенные культуры шигелл переданы для изучения в Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии для определения фенотипических маркеров. В ходе детального изучения культур было выявлено важное отличительное свойство штаммов: все они были маннитнегативными. Эта особенность характеризует штаммы как атипичные. В доступной литературе мы нашли только 3 работы из Англии, Японии, Чехословакии, содержащие сведения о регистрации маннитнегативных вариантов шигелл Зонне. Отмечены редкие случаи выявления таких штаммов, связанные с завозом инфекции из других стран, с последующим возникновением заболеваний [9 — 11]. На территории Дальнего Востока такие штаммы не регистрировались в течение 40 лет наблюдения.

Другой особенностью этих штаммов, помимо маннитнегативного признака, явилось то, что по сочетанию фенотипических маркеров (колициногенотип + лекарственная устойчивость) шигеллы были отнесены к двум клонам (или биоварам): 1. Клон SIIe E+I(Cm Tc Sm)^{r+} — шигеллы Зонне, биохимический тип IIe, колициногенотип E+I, устойчивые к левомицетину, тетрациклину, стрептомицину. Выделен от 54 человек. 2. Клон SIIe E+I(Cm Tc Sm Amp Stc)^{r+} — шигеллы Зонне, биохимический тип IIe, колициногенотип E+I, устойчивые к левомицетину, тетрациклину, стрептомицину, ампициллину, цефотаксиму. Выделен от 27 человек.

Накопленный нами опыт работы со вспышечными штаммами свидетельствовал о следующем: штаммы, выделенные в пределах одной вспышки и имеющие единый колициновый маркер, но различающиеся по лекарственной устойчивости, могут иметь происхождение от 2 разных источников. В связи с этим, полученные результаты были подвергнуты тщательному анализу для обоснованной трактовки.

В случае со вспышкой в ДДИ г. Бикин предполагаемый источник (обслуживающий персонал) является носителем первого клона. Неслучайность выявленного признака (два лекарственноустойчивых клона в пределах одного очага) была подтверждена следующими наблюдениями.

Во-первых, при детальном анализе этих результатов установлено, что доля выделения первого клона в первую волну вспышки составила большинство (37 случаев из 45), т.е. 82,2%, доля второго клона составила 17,8% (8 случаев из 45). Во вторую волну доля второго клона стала преобладающей и составила 64,2% (у 18 человек из 28). В третью волну среди 18 культур, выделенных от 8 человек, 17 культур отнесены к первому клону и 1 культура отнесена ко второму клону.

Во-вторых, на примере штаммов, выделенных в 1 и 2 волны заболеваний, изучена способность к длительной персистенции в организме человека шигелл, относящихся к двум разным клонам. Из 47 лиц — носителей первого клона — 29,8% пациентов повторно выделяли возбудитель. Из 26 лиц — носителей второго клона — 38,5% пациентов повторно выделяли возбудитель. Именно со вторым клоном связано самое длительное (до 4 месяцев) носительство.

В-третьих, изучена стабильность лекарственной устойчивости по линии сохранения характеристики у культур, повторно выделенных от одного и того же больного в динамике болезни. Установлено, что принадлежность шигелл к определенному лекарственноустойчивому клону сохранялась у 87,5% лиц, повторно выделяющих шигеллы (т.е. у 21 человека из 24). При этом не исключена возможность перепутывания проб или их нечеткой маркировки в условиях массового обследования подопечных ДДИ, когда в один день забирали до 200 проб. Указанное обстоятельство могло привести к снижению показателя стабильности шигелл, принадлежащих к одному клону.

С учетом редкого маннитнегативного признака, объединяющего эти 2 группы культур, было сделано предположение, что в ходе затяжного течения шигеллезной инфекции в очаге ДДИ произошло преобразование клональной структуры шигелл по фенотипическому признаку лекарственной устойчивости.

Это предположение было подтверждено при молекулярно-биологическом изучении этих 2 фенотипов шигелл методом PFGE. Установлено, что шигеллы Зонне, выделенные в ДДИ, вне зависимости от лекарственных маркеров дифференцируются на 2 типа с высоким уровнем гомологии (табл.).

Результаты генотипирования позволили расценить вспышку дизентерии Зонне в ДДИ г. Бикин как очаг с единым возбудителем.

Следует отметить, что в г. Хабаровск в тот же период были зарегистрированы 22 случая дизентерии Зонне, обусловленной также маннитнегативным ва-

Результаты молекулярно-генетического субтипирования 3 групп маннитнегативных штаммов шигелл Зонне, выделенных в период вспышки дизентерии Зонне в г. Хабаровск и в г. Бикин (ДДИ) в 2012 г.

Группы штаммов	Фенотипические маркеры	Формула генотипа PFGE-XbaI и PFGE-BlnI-профилям
г. Бикин (ДДИ)* 4 штамма	SIIE E+I(Cm Tc Sm) ⁺⁺ изоляты №1,2,3,4	J16X01.0012-J16A26.0008 изоляты № 3,7,8
г. Бикин (ДДИ)* 4 штамма	SIIE E+I(Cm Tc Sm Amp Ctc) ⁺⁺ изоляты №5,6,7,8	J16X01.0013-J16A26.0008 изоляты № 1,2,4,5,6
г. Хабаровск ** (школа № 80 и спорадические случаи) 3 штамма	SIIE E+I(Cm Tc Sm) ⁺⁺ изоляты №9,10,11	J16X01.0009-J16A26.0007 изолят № 9 J16X01.0010-J16A26.0007 изолят № 10 J16X01.0011-J16A26.0007 изолят № 11

Примечание. * Изоляты дифференцируются на 2 типа с высоким (99%) уровнем гомологии.
** Изоляты дифференцируются на 3 типа с высоким (99%) уровнем гомологии.

риантом возбудителя с маркером бикинских штаммов: SIIe E+I(Cm Tc Sm)⁺. Заболевания отмечены на ограниченной территории (7 — 8 соседствующих улиц) Железнодорожного района г. Хабаровск с формированием мини-очагов в школе №80, семейных очагов. В этом же секторе расположены 2 — 3 рынка уличной торговли. Заболевания возникли несколько раньше, чем в г. Бикин.

Из 22 случаев 6 заболеваний возникли в сентябре 2012 г., 15 случаев отмечены в октябре и 1 случай в ноябре (семейный контакт). Возрастной состав заболевших: дети от 1 г. до 5 лет — 8 человек, школьники 8 — 14 лет — 9 человек, взрослые 26 — 32 лет — 5 человек. Максимальная длительность бактериального носительства (до 3 недель) отмечена только в одном случае (5,6%).

Таким образом, по возрастному признаку (преимущественное вовлечение в эпидпроцесс детей школьного возраста и взрослых — в сумме 63,6%) ситуация не отличалась от таковой в г. Бикин. Однако продолжительность бактериовыделения и частота встречаемости этого признака в г. Хабаровск значительно ниже, что объясняется разным контингентом заболевших в этих двух городах. Хабаровские культуры, также как и бикинские, единой партией были направлены в референс-центр для определения генотипа возбудителя и подтверждения единого геноварианта для трех групп атипичных культур, объединенных исключительно редким фенотипическим признаком.

Однако хабаровские изоляты при изучении продуктов рестрикции ДНК в пульсирующем электрическом поле были отнесены к отдельному геноварианту, отличающемуся от бикинских культур (табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ

Произошло неожиданное несовпадение данных эпидемиологического анализа ситуации, выполненного с привлечением традиционных методов маркировки возбудителя, и результатов генотипического исследования. С ориентиром на результаты генотипирования методом PFGE появилась возможность предположить, что с учетом интенсивной миграции населения и завозом продуктов питания из других территорий произошло одновременное попадание на территорию Хабаровского края (завоз) двух различных геновариантов атипичных маннитнегативных возбудителей дизентерии Зонне. Информация о циркуляции таких возбудителей на территории среднеазиатских республик, ближайших сопредельных граничных стран (территории с возможной циркуляцией атипичных шигелл) отсутствует.

Как следует из последнего сообщения референс-центра по мониторингу острых кишечных инфекций, в котором изложены результаты генетического анализа (метод PFGE) 190 изолятов шигелл Зонне (12 очагов групповой заболеваемости) из 10 субъектов Российской Федерации, выявлена высокая генетическая гетерогенность данного патогена. Всего было идентифицировано 42 генотипа с различающейся комбинацией XbaI и BlnI профилей. В целом изоляты были схожи внутри каждого из очагов и имели высокие дистанции при сравнении между различными очагами заболевания. Возможная эпидемиологическая связь на основании общности генотипа была определена лишь для двух территорий (Карачаево-Черкессия и Ростов-на-Дону), где были зафиксированы случаи групповой заболеваемости дизентерией Зонне в 2012 — 2013 гг. Выяснение возможных связей между территориально удаленными случаями групповых и спорадических заболеваний требует дополнительных организационных усилий по созданию централизованной системы лабораторий и служб межтерриториального эпидемиологического расследования [Харитонов Н.Е. и др., 2014].

Ситуация в бикинском ДДИ потребовала дополнительного эпидемиологического анализа, выясняющего причины и условия столь длительного поддержания очага дизентерии. С этой же целью проанализированы научные публикации, обсуждающие возможные механизмы развития ЭП, а также вопросы латентной инфекции, хронической инфекции, носительства [8].

Так, известно, что ЭП может быть представлен одновременно и манифестными, и бессимптомными формами инфекции. В дальнейшем обе формы могут закончиться или полным освобождением организма от возбудителя, или носительством. Бактерионосительство — своеобразная форма сосуществования патогенных микробов и организма хозяина, не проявляющаяся в течение длительного времени внешними реакциями со стороны организма [Токаревич К.Н. Актовая речь, 1987]. В соответствии с теорией саморегуляции паразитарных систем именно носительство как форма инфекционного процесса обеспечивает сохранение возбудителя в межэпидемический период. Тем самым подчеркивается возможность перехода бессимптомного носительства в манифестную форму [1]. При этом возникновение новых заболеваний в манифестной форме у бактерионосителей возможно сразу вслед за действием какого-либо фактора, приводящего к дисбалансу в иммунной системе человека [8].

Дальнейшее развитие ЭП может проходить по нескольким вариантам. Один из них, когда манифестация происходит в полностью иммунном к данной инфекции коллективе. Тогда ЭП проявляется спорадическими заболеваниями. Другой — когда в коллективе есть неиммунные индивидуумы, тогда возможна эпидемическая вспышка среди неиммунных лиц. Первоначально у потенциальных источников инфекции происходит переход носительства в манифестную форму инфекции. Затем при наличии условий, способствующих распространению возбудителя, заболевают восприимчивые лица. Таким образом, запуск, точнее активизация ЭП, не предполагает нового заноса инфекции [7, 8].

Вышеизложенное позволяет высказать суждение о том, что ситуация в ДДИ г. Бикин, когда через 2 года от начала вспышки дизентерии вновь возникли заболевания с идентичным атипичным возбудителем, могла найти объяснение в особенностях развития ЭП, реализуемого вследствие перехода скрытого носительства возбудителя у участников 1 и 2 волн заболеваний в манифестную форму под воздействием каких-либо факторов риска. Активизация эпидемического процесса повлекла за собой групповые заболевания среди неиммунных лиц (третья волна заболеваний). Так, семь из восьми участников вспышки пришли в закрытый коллектив ДДИ в конце 2013 г. — начале 2014 г. и не присутствовали в интернате в период первой и второй волн заболеваний.

Таким образом, в ДДИ г. Бикин сформировался длительный очаг дизентерии Зонне с множественными случаями заболеваний. Вспышка была обусловлена атипичными маннитнегативными шигеллами, впервые зарегистрированными на территории Хабаровского края. По сочетанию фенотипических маркеров шигеллы относились к двум различным лекарственноустойчивым клонам. Результатами генотипирования установлено, что вне зависимости от лекарственных маркеров штаммы шигелл относятся к близкородственным геновариантам, что позволило расценить вспышку как очаг с единым возбудителем. Вероятный источник инфекции — персонал ДДИ. Путь распространения возбудителя — контактно-бытовой. Характерной особенностью длительного очага дизентерии стало трехволновое течение заболеваний. ЭП поддерживался за счет длительного носительства возбудителя у переболевших и контактных лиц и особого контингента подопечных ДДИ для умственно отсталых детей. Возникновению очага способствовали выявленные наруше-

ния санитарно-эпидемиологических требований, предъявляемых к учреждениям интернатного типа, поддержанию очага — отсутствие гигиенических навыков у подопечных и ненадлежащий контроль со стороны администрации учреждения за соблюдением санитарно-гигиенических требований работниками и подопечными.

Результаты исследований свидетельствуют о важности определения традиционных фенотипических и современных генотипических вариантов шигелл и необходимости поиска аргументов, дополнительных методических приемов для установления сходства или различия изолятов шигелл, выделенных как в пределах одной вспышки заболеваний, так и для сравнения штаммов, циркулирующих на разных территориях.

Ситуация по заболеваемости дизентерией в Хабаровском крае 2012 — 2014 гг. обосновывает необходимость продолжения микробиологического мониторинга для установления эпидемиологических закономерностей циркуляции атипичных возбудителей и целенаправленного поиска источников, путей распространения, факторов передачи инфекции, эффективных мер профилактики, лечения и ликвидации инфекции.

Выявление клональной структуры шигелл дает новые возможности для осуществления мониторинга при острых кишечных инфекциях. Опыт эпидемиологического маркирования шигелл ставит новые задачи методического и организационного плана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д., Тец В.В. Саморегуляция паразитарных систем. М., Медицина, 1987.
2. Бондаренко А.П., Корита Т.В., Присяжнюк Е.Н., Прохорец Е.В. Обеспечение санитарно-эпидемиологического надзора за дизентерией Зонне в Хабаровском крае. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2009, 14: 102-107.
3. Бондаренко А.П., Троценко О.Е., Корита Т.В., Отт В.А., Каравянская Т.Н., Прохорец Е.В., Присяжнюк Е.Н., Голобокова Е.В., Подколзин А.Т., Корита П.В., Тригорлова Т.Н., Бондарь О.Б. Эпидемиологическое маркирование шигелл в анализе заболеваемости дизентерии Зонне в Хабаровском крае. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2013, 23: 36-45.
4. Бондаренко А.П., Каравянская Т.Н., Отт В.А., Зайцева Т.А., Прохорец Е.В., Присяжнюк Е.Н., Троценко О.Е., Подколзин А.Т., Бобова К.Ф., Тригорлова Т.Н., Бондарь О.Б. Заболеваемость дизентерией, обусловленной маннитнегативными вариантами шигелл Зонне. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2013, 22: 52-60.
5. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями. М., 1984.
6. Методики клинических лабораторных исследований. Справочное пособие. Т. 3. Под ред. В.В.Меньшикова. М., Лабора, 2009.
7. Яковлев А.А. К дискуссии о причине, условиях и механизме формирования заболеваемости. Эпидемиол. инфекц. болезни. Актуал. вопр. 2013, 4: 39-44.
8. Яковлев А.А. О возможных механизмах развития эпидемического процесса. Эпидемиол. инфекц. болезни. Актуал. вопр. 2014, 6: 52-56.
9. Aldova E., Sobotkova J., Hausner O. et al. Rarely occurring *Shigella* serovars. Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. A. 1988, Aug. 269 (2): 257-265.
10. Graham J.M. An outbreak of dysentery due to a non-mannitol-fermenting strain of *Shigella sonnei*. J. Pathol. Bacteriol. 1958, Jul.: 291-293.
11. Masao Benoki, Kioshi Yabuuchi, Chiyoko Yoshizaki. On a non-mannitol fermenting strain of *Shigella Sonnei*. J. Showa Medical Association. 1961, 21 (4): 462-464.

Поступила 25.08.16

Контактная информация: Бондаренко Альбина Павловна, к.м.н., 680610, Хабаровск, ул. Шевченко, 2, р. т. (4212) 32-88-93

*Н.Ф.Василенко, О.В.Малецкая, Е.А.Манин, Д.А.Прислегина, В.М.Дубянский,
Л.И.Шапошникова, А.С.Волынкина, Я.В.Лисицкая, Е.С.Котенев, А.Н.Куличенко*

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ЮГЕ РОССИИ В 2015 Г.

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Анализ эпизоотологических проявлений природно-очаговых инфекций (ПОИ) на юге России в 2015 г. *Материалы и методы.* Использованы донесения, представленные Управлениями Роспотребнадзора, центрами гигиены и эпидемиологии, научно-исследовательскими противочумными институтами и противочумными станциями Роспотребнадзора. Обработку полученных данных проводили с использованием программы Excel. *Результаты.* Всего исследовано 37 738 проб полевого материала, из них наибольшее количество — на туляремию (8268), Крымскую геморрагическую лихорадку (6894) и лихорадку Западного Нила (4875). При эпизоотологическом обследовании территории юга России выявлены возбудители 15 нозологических форм ПОИ, преобладающее количество положительных проб получено при исследовании материала на клещевой боррелиоз (612), Крымскую геморрагическую лихорадку (279) и туляремию (237). *Заключение.* Анализ эпизоотологической обстановки по природно-очаговым инфекциям на юге России свидетельствует о повышении активности природных очагов бактериальных (туляремия, клещевой боррелиоз), риккетсиозных (клещевые пятнистые лихорадки) и вирусных инфекций (Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, клещевой вирусный энцефалит), в связи с чем вопросы профилактики природно-очаговых инфекционных болезней и постоянного мониторинга их природных очагов в субъектах Южного, Северо-Кавказского и Крымского федеральных округов имеют особую актуальность.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 29—35

Ключевые слова: эпизоотологический мониторинг, природно-очаговые инфекции, полевой материал, маркеры возбудителей, субъекты юга России

*N.F.Vasilenko, O.V.Maletskaia, E.A.Manin, D.A.Prislegina, V.M.Dubyansky,
L.I.Shaposhnikova, A.S.Volynkina, Ya.V.Lisitskaya, E.S.Kotenev, A.N.Kulichenko*

EPIZOOTOLOGIC MONITORING OF NATURAL-FOCAL INFECTIONS IN THE SOUTH OF RUSSIA IN 2015

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Analyze epizootologic manifestations of natural-focal infections (NFI) in the south of Russia in 2015. *Materials and methods.* Reports provided by administrations of Federal Service of Surveillance for Protection of Consumers Rights and Human Welfare, Centers of Hygiene and Epidemiology, Research Institutes for Plague Control and Station for Plague Control were used. Data processing was carried out using Excel program. *Results.* A total of 37 738 samples of field material were studied, most of those — for tularemia (8268), Crimea hemorrhagic fever (6894) and West Nile fever (4875). Causative agents of 15 nosologic forms of NFI were detected during epizootologic examination of the territory of south of Russia, predominating amount of positive samples was obtained during study of material for tick-borne borreliosis (612), Crimea hemorrhagic fever (279) and tularemia (237). *Conclusion.* Analysis of epizootologic situation on natural-focal infections in the south of Russia gives evidence on the increase of activity of natural foci of bacterial (tularemia, tick-borne borreliosis), rickettsia (tick-borne spotted fevers) and viral infections (Crimea hemorrhagic fever, West Nile fever, tick-borne viral encephalitis), and thus problems of prophylaxis of natural-focal infectious diseases and constant monitoring of natural foci in subjects of Southern, North-Caucasian and Crimea federal districts are of particular importance.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 29—35

Key words: epizootologic monitoring, natural-focal infections, field material, markers of causative agents, subjects of south of Russia

ВВЕДЕНИЕ

Одним из направлений повышения эффективности эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекциями (ПОИ) является оптимизация эпизоотологического мониторинга. Выявление маркеров возбудителей ПОИ, уровня численности их носителей и переносчиков в сочетании с оптимальными условиями существования для всех сочленов паразитарных систем свидетельствует об активности природных очагов этих инфекций, обладающих определенным эпидпотенциалом [4, 5].

Ландшафтно-географические и климатические особенности юга России, куда относятся Южный (ЮФО), Северо-Кавказский (СКФО) и Крымский (КФО: Республика Крым и город федерального значения Севастополь) федеральные округа, высокая численность клещей и комаров, разнообразный видовой состав диких млекопитающих и птиц создают благоприятные условия для циркуляции возбудителей ПОИ; наблюдается повсеместное расширение их ареала [1 — 3]. Все это определяет необходимость систематического эпизоотологического обследования территории юга России в отношении природных очагов ПОИ.

Цель данной работы — анализ эпизоотологических проявлений природно-очаговых инфекций на юге России в 2015 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения анализа эпизоотологической обстановки по природно-очаговым инфекциям на юге России использованы донесения, представленные Управлениями Роспотребнадзора, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии», научно-исследовательскими противочумными институтами и противочумными станциями Роспотребнадзора из 6 субъектов ЮФО, 6 субъектов СКФО и КФО. Обработку полученных данных проводили с использованием программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В 2015 г. эпизоотологический мониторинг на юге России проводился по 18 нозологическим формам ПОИ, в том числе вирусной этиологии — 8, риккетсиозной — 2, бактериальной — 8.

Более всего уделялось внимание обследованию территории субъектов юга России на Крымскую геморрагическую лихорадку (КГЛ), которое проводилось в 12 субъектах региона (в 2014 г. — в 11). Эпизоотологический мониторинг возбудителя КГЛ в 2015 г. проводился в ЮФО (во всех субъектах), СКФО (в 4 субъектах, за исключением Чеченской Республики и Республики Северная Осетия-Алания) и в КФО.

Всего исследовано 6894 пробы полевого материала (иксодовые клещи, органы мелких млекопитающих и птиц). Следует отметить, что наиболее масштабный мониторинг проводился на территории Ростовской области, где обследовано 72,1% территории области, исследовано 1506 проб полевого материала, что составило 21,8% от всех исследованных проб в субъектах юга России, положительные пробы составили 37,3% от всех исследованных проб. Отмечено расширение ареала распространения возбудителя КГЛ по сравнению с 2014 г. в северном и западном направлениях.

В Ставропольском крае вирусофорность клещей составила 6,9%, маркеры возбудителя КГЛ выявлены в 9 муниципальных районах. Впервые наибольшее количество позитивных проб обнаружено в Апанасенковском районе — 46 (73%).

В целом, маркеры вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) выявлены в 10 субъектах юга России, кроме Республики Адыгея и Карачаево-Черкесской Республики. Результаты исследований полевого материала подтверждают сохраняющуюся высокую активность природного очага КГЛ.

Маркеры возбудителя лихорадки Западного Нила (ЛЗН) обнаружены на территории 5 субъектов ЮФО (кроме Республики Адыгея, где эпизоотологический мониторинг вируса Западного Нила не проводился) и в Ставропольском крае. Наибольшее количество проб (1724 или 35,4%) полевого материала исследовано в Ростовской области, получено 15 (0,9%) позитивных проб на территории 4 административных образований. В Республике Калмыкия на ЛЗН обследовано 78,6% территории, маркеры вируса Западного Нила обнаружены в 4 муниципальных районах (9 проб — 1,6%). В остальных субъектах выявлено от 1 до 3 проб. Зараженность объектов окружающей среды осталась на уровне предыдущего года (0,7%).

Эпизоотологический мониторинг возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) проводился в Ростовской и Волгоградской областях, Краснодарском и Ставропольском краях и в Республике Адыгея. Циркуляция хантавирусов установлена на всех обследованных территориях. Наиболее интенсивными эпизоотические проявления этой инфекции, как и в предыдущие годы, были в Краснодарском крае. Положительные пробы зарегистрированы на территории 12 административных районов и, в целом, составили 40,5% (66 проб из 163 исследованных). По сравнению с 2014 г. зараженность мышевидных грызунов хантавирусами увеличилась в 3 раза. Отмечен высокий показатель инфицированности грызунов в Республике Адыгея, граничащей с Краснодарским краем — 10,7%. Результаты лабораторных исследований показали увеличение зараженности мышевидных грызунов хантавирусами на территории всех обследованных субъектов юга России, за исключением Волгоградской области.

Заболееваемость клещевым вирусным энцефалитом (КВЭ) на юге России регистрируется только в КФО, однако циркуляция возбудителя КВЭ ежегодно отмечается в ряде субъектов данного региона. В 2015 г. маркеры КВЭ на юге России обнаружены в 3 субъектах ЮФО: Ростовской, Волгоградской и Астраханской областях. В 2014 г. — только в Ростовской области, в 2013 г. — в Ставропольском крае, Волгоградской области (клещ *Ixodes persulcatus* был заносным из Новосибирской области), Республиках Адыгея и Дагестан.

Одной из особенностей региона является эндемичность Астраханской пятнистой лихорадки (АПЛ) — инфекции, заболеваемость которой регистрируется исключительно на юге России. В связи с этим, с 2014 г. специалистами Ставропольского противочумного институт Роспотребнадзора проводится мониторинг возбудителей группы клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ). В 2015 г. циркуляция возбудителей КПЛ установлена в Ставропольском крае, где зараженность иксодовых клещей составила 27,8%, Ростовской области — 43,5% и КФО — 24,9% (в 2014 г. маркеры выявлены в Ставропольском крае, Республике Дагестан и КФО). В связи с этим, возможны и эндемические проявления КПЛ в данных субъектах юга России. Несмотря на то, что ежегодно в Астраханской области и Республике Калмыкия регистрируется заболеваемость Астраханской пятни-

стой лихорадкой, эпизоотологический мониторинг возбудителей группы КПЛ в этих субъектах не проводится.

В 2014 — 2015 гг. только в Астраханской области регистрировалась заболеваемость Ку-лихорадкой, но при эпизоотологическом обследовании подтверждена циркуляция ее возбудителя в природных биотопах Волгоградской, Астраханской и Ростовской областей, Ставропольского края, Республики Дагестан и КФО. Как и в предыдущие годы (2013 — 2014), широкое распространение возбудителя Ку-лихорадки отмечено в Ставропольском крае, где инфицированность иксодовых клещей составила 9,1%, маркеры *Soxiella burnetii* обнаружены в 7 районах (в 2014 г. — в 5). Отмечено повышение зараженности клещей в Астраханской области в 4,2 раза, в Республике Дагестан — в 3, в КФО — в 3,3 раза. Расширение ареала распространения *S. burnetii* наблюдается в Волгоградской области: в 2014 г. циркуляция установлена в 3 районах, в 2015 г. — в 10. Впервые специалистами Дагестанской противочумной станции маркеры возбудителя Ку-лихорадки выявлены в Республике Ингушетия.

Эпизоотологический мониторинг клещевой боррелиоза (КБ), проведенный в 9 субъектах юга России, показал достаточно высокую активность его природного очага в данном регионе. В 612 пробах объектов окружающей среды (21,6% всех исследованных проб) были обнаружены маркеры *Borrelia burgdorferi* s.l. (в 2014 г. зараженность клещей боррелиями составляла 14,1%, что в 1,5 раза ниже показателя 2015 г.). Самый высокий показатель зараженности клещей установлен в КФО (38,8%) и Ставропольском крае (36,4%). Значительно возросла инфицированность клещей в Республике Адыгея (в 6 раз), в Волгоградской области, наоборот, в 6 раз снизилась.

На кишечный иерсиниоз обследованы территории 4 субъектов (Краснодарского края, Республик Калмыкия, Адыгея, Кабардино-Балкарской Республики) и КФО. Исследовано 1828 проб мышевидных грызунов и получено 87 (4,8%) положительных результатов. Наибольшее количество (79) позитивных проб выявлено в КФО, что составило 90,8% от всего числа положительных проб.

Эпизоотологический мониторинг возбудителя псевдотуберкулеза проводился в Кабардино-Балкарской Республике, Республике Адыгея и КФО. Маркеры *Yersinia pseudotuberculosis* обнаружены только на территории Республики Крым, где положительные пробы от грызунов составили 15,6%. В 2014 г. мониторинг кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза проводился только в Кабардино-Балкарской Республике, и маркеры их возбудителей не были обнаружены.

Эпизоотологическое обследование на туляремию проведено в 10 субъектах юга России, кроме Дагестана, Ингушетии, Северной Осетии-Алании и Чеченской Республики. На данную инфекцию исследовано наибольшее количество проб — 8268 (21,9%). Максимальное количество (119 положительных проб, или 35,4%) получено в Волгоградской области. В КФО маркеры *Francisella tularensis* обнаружены в 21,2% проб, в Карачаево-Черкесской Республике — 7,4%, в остальных субъектах — около 2%, не выявлены — в Астраханской области и Кабардино-Балкарской Республике, где исследовано 2889 и 375 проб соответственно. В целом, положительные пробы составили 2,9%, что в 1,3 раза выше показателя 2014 года.

Эпизоотологический мониторинг природных очагов лептоспироза был проведен в 9 субъектах. Наибольшее количество положительных проб получено в Краснодарском крае и Астраханской области (34,8 и 25,5% соответственно). В Краснодарском крае отмечено увеличение зараженности грызунов

лептоспирами в 3,6 раза. Самый большой объем (684 пробы) полевого материала был исследован в Кабардино-Балкарской Республике, но положительных результатов не получено. В целом, при исследовании 2062 проб на наличие маркеров *Leptospira interrogans* выявлено 127 (6,2%) позитивных, что находится на уровне 2014 г. (6,8%). Циркуляция возбудителя лептоспироза установлена в 5 субъектах ЮФО, 1 — СКФО и КФО, что наряду с регистрацией случаев заболевания лептоспирозом свидетельствует о неблагоприятной эпидемиологической обстановке по лептоспирозу на юге России.

В 2014 г. впервые на территории юга России выявлено наличие природного очага гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ). В 2015 г. маркеры возбудителя ГАЧ выявлены в Ростовской области, Республиках Адыгея, Дагестан и КФО. В КФО при исследовании 35 пулов иксодовых клещей во всех пулах обнаружена ДНК *Anaplasma phagocytophilum*. В Дагестане получены 3 положительные пробы из 4 исследованных (в 2014 г. зараженность клещей *A. phagocytophilum* составляла 8,3%). Впервые маркеры возбудителя ГАЧ выявлены в Ростовской области и Адыгее (1,2 и 4,3% положительных проб соответственно). По результатам эпизоотологического мониторинга можно сделать вывод о расширении ареала возбудителя ГАЧ на юге России.

В 3 субъектах юга России установлена циркуляция возбудителя моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ). Несмотря на то, что число положительных проб было небольшим (в КФО — 2,7%, в Ростовской области — 1,1%, в Дагестане — 2 пробы из двух исследованных), их наличие диктует необходимость дальнейшего проведения эпизоотологического обследования территории юга России на эту нозологию. В 2015 г. впервые на юге России (в Ставропольском крае) было зарегистрировано по одному случаю заболевания ГАЧ и МЭЧ.

В Ростовской области проводился мониторинг арбовирусных инфекций. В единичных пробах, доставленных с трех административных районов, выявлены антигены вирусов Калифорнийской серогруппы (Инко, Тягиня). В 5 (0,7%) пробах обнаружены маркеры вируса Синдбис. В 2014 г. мониторинг арбовирусных инфекций не проводился. В 2013 г. маркеры вирусов Инко и Тягиня были выявлены на территории 5 административных районов, вируса Синдбис — 8, вируса Батаи — 3. Полученные данные свидетельствуют о циркуляции ряда арбовирусов на территории Ростовской области.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов эпизоотологического мониторинга на юге России показал, что наиболее активный эпизоотологический мониторинг проводился в Ростовской области (по 14 нозологиям), Республике Адыгея и КФО (по 11 нозологиям) и Ставропольском крае (по 10 нозологиям). В Краснодарском крае проведен мониторинг по 9 нозологиям, Волгоградской области и Республике Калмыкия — по 8, в Астраханской области и Кабардино-Балкарской Республике — по 6, в Республике Дагестан — по 5, в Карачаево-Черкесской Республике — по 3, в Республике Ингушетия — по 2, в Республике Северная Осетия-Алания — по 1 нозологии. В Чеченской Республике эпизоотологический мониторинг не проводился (как и в 2013 — 2014 гг.).

Наибольшее количество эпизоотических проявлений природно-очаговых инфекций в 2015 г. подтверждено в Ростовской области (12) и КФО (10). В Ставропольском крае и Волгоградской области обнаружены маркеры 8 возбудителей ПОИ, в Краснодарском крае — 7, в Адыгее — 6, в Дагестане и Астраханской области — 5. В Калмыкии выявлена циркуляция возбудителей

4 ПОИ, в Ингушетии — 2, в Карачаево-Черкесской и Кабардино-Балкарской Республиках — по 1.

Более всего уделялось внимание обследованию территории субъектов юга России на КГЛ, которое проводилось в 12 субъектах региона (в 2014 г. — в 11), в 10 из них выявлены маркеры возбудителя КГЛ (в 2014 г. — в 9). На туляремию обследовано 10 субъектов (в 2014 г. — 7), маркеры возбудителя туляремии выявлены в 8 (в 2014 г. — в 5). В 9 субъектах проведен мониторинг клещевого боррелиоза, Ку-лихорадки (в 2014 г. — в 7) и лептоспироза (в 2014 г. — в 8). Циркуляция возбудителей лептоспироза и Ку-лихорадки установлена в 7 субъектах юга России, клещевого боррелиоза — в 6. На ЛЗН обследовано 8 субъектов (в 2014 г. — 10), в 6 из них обнаружены маркеры вируса Западного Нила (в 2014 г. — в 5).

Мониторинг возбудителей ГЛПС, КВЭ, ГАЧ, МЭЧ, кишечного иерсиниоза проводился в 5 субъектах юга России, КПЛ и псевдотуберкулеза — в 3, листериоза — в 2, возбудителей бешенства и арбовирусных инфекций — в 1.

Маркеры хантавируса выявлены в 5 субъектах юга России, маркеры возбудителя ГАЧ обнаружены в 4 субъектах, КВЭ, МЭЧ, КПЛ и кишечного иерсиниоза — в 3, листериоза — в 2, псевдотуберкулеза, бешенства и арбовирусных инфекций — в 1 субъекте.

Следует отметить, что из всех нозологий только на ЛЗН и ГЛПС, по сравнению с 2014 годом, было обследовано меньше на 1 субъект, по всем остальным ПОИ увеличилось количество обследованных субъектов. Кроме того, в 2014 г. не проводился мониторинг возбудителей листериоза, бешенства и арбовирусных инфекций.

Обращает на себя внимание объем проведенных лабораторных исследований полевого материала в разных субъектах юга России. Всего исследовано 37 738 проб полевого материала, что в 2 раза больше, чем в эпидсезон предыдущего года (в 2014 г. — 19 121 проба). Значительно выше, чем в других субъектах, объем эпизоотологического обследования отмечен в Ростовской области, где исследовано 8977 проб полевого материала (в 2014 г. — 134).

На высоком уровне осуществлялся эпизоотологический мониторинг ПОИ в Ставропольском крае (5115 проб), более 4000 проб исследовано в Астраханской и Волгоградской областях. Большой объем исследований выполнен в Республике Адыгея (3601 проба) и в Крымском федеральном округе (3342 пробы). В Кабардино-Балкарской Республике и Республике Калмыкия проведено 2907 и 2903 исследований соответственно, в Краснодарском крае — 1896 исследований.

На низком уровне эпизоотологический мониторинг проводился в Карачаево-Черкесской Республике (190 проб полевого материала), Республиках Дагестан (172 пробы), Северная Осетия-Алания (87 проб) и Ингушетия (31 проба). Исследования проведены специалистами ФКУЗ «Дагестанская противочумная станция» Роспотребнадзора.

Больше всего проб полевого материала в 2015 г. в субъектах юга России исследовано на туляремию (8268), КГЛ (6894) и ЛЗН (4875).

Всего на юге России при эпизоотологическом обследовании территории выявлены возбудители 15 нозологических форм ПОИ (в 2014 г. — 11), преобладающее количество положительных проб получено при исследовании материала на клещевой боррелиоз (612), КГЛ (279) и туляремию (237).

Таким образом, проведенный анализ эпизоотологической обстановки по природно-очаговым инфекциям на юге России свидетельствует о повышении активности природных очагов бактериальных (туляремия, клещевой борре-

лиоз), риккетсиозных (КПЛ) и вирусных инфекций (КГЛ, ЛЗН, КВЭ), в связи с чем, вопросы профилактики природно-очаговых инфекционных болезней и постоянного мониторинга их природных очагов в субъектах ЮФО, СКФО и КФО остаются по-прежнему актуальными. Учитывая эпидемиологическую обстановку в мире по некоторым арбовирусным инфекциям, а также наличие их переносчиков на территории ряда субъектов юга России, необходимо усилить эпизоотологический мониторинг возбудителей данных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Василенко Н.Ф., Ермаков А.В., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых трансмиссивных инфекций в регионе Кавказских Минеральных Вод Ставропольского края. Здоровье населения и среда обитания. 2014, 5 (254): 28-30.
2. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А. Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых инфекций в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2014 г. Здоровье населения и среда обитания. 2016, 1 (274): 38-41.
3. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Григорьев М.П. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2015 г. Ставрополь, 2016.
4. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Шапошникова Л.И., Евстафьев И.Л., Товпи-нец Н.Н. и др. Эпизоотическая ситуация в Крымском федеральном округе по результатам обследования в 2014 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 2: 33-36.
5. Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Шапошникова Л.И., Котенев Е.С. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекци-ям в Крымском федеральном округе в 2014-2015 гг. Журн. микробиол. 2016, 2: 62-69.

Поступила 28.06.16

Контактная информация: Василенко Надежда Филипповна, д.б.н., проф., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652) 26-03-83

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Н.С.Сердюк¹, Ю.М.Евченко¹, И.В.Кузнецова¹, Е.Б.Жилченко¹,
Н.В.Жаринова¹, О.А.Коняева¹, В.М.Мезенцев¹, А.С.Волынкина¹,
Е.С.Котенев¹, М.Е.Платонов², А.П.Анисимов², А.Н.Куличенко¹*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ КАВКАЗА МЕТОДОМ МУЛЬТИ-ЛОКУСНОГО VNTR-АНАЛИЗА

¹Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, ²Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск

Цель. Определение степени филогенетического родства штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на территориях природных очагов чумы Кавказа, с помощью VNTR-типирования по 25 локусам (MLVA25). *Материалы и методы.* В работе использовали 26 штаммов *Y. pestis* из российских природных очагов Кавказа. Для выполнения мультилокусного VNTR-анализа использовали 25 локусов tandemных повторов в геноме *Y. pestis* по схеме Le Fleche. Расшифровку нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3130 Genetic Analyser. Анализ приуроченности кластеров к определенным территориям, объектам и срокам изоляции штаммов осуществляли с использованием программы Arc GIS 10.1. *Результаты.* Сформированы группы MLVA25-типов разного уровня дискриминации: кластеры, группы и подгруппы. Кластеры сформированы штаммами различной таксономической принадлежности: основным и полевочьем подвидами *Y. pestis*. Подгруппы отображают принадлежность штаммов к определенным очагам, а

MLVA25-типы — степень генетического родства. *Заключение.* Полученные с помощью MLVA25-типов генетические «портреты» культур возбудителя чумы, циркулирующих на разных природноочаговых территориях, позволяют решать задачи как теоретического, так и практического характера: от трактовки процессов микроэволюции до поиска источника инфекции и путей ее распространения при возможных эпидемических осложнениях.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 35—41

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, природные очаги чумы Кавказа, генотипирование, мультилокусный VNTR-анализ (MLVA25)

*N.S.Serdyuk*¹, *Yu.M.Evchenko*¹, *I.V.Kuznetsova*¹, *E.B.Zhilchenko*¹,
*N.V.Zharinova*¹, *O.A.Konyaeva*¹, *V.M.Mezentsev*¹, *A.S.Volynkina*¹,
*E.S.Kotenev*¹, *M.E.Platonov*², *A.P.Anisimov*², *A.N.Kulichenko*¹

DETERMINATION OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF *YERSINIA PESTIS* STRAINS FROM NATURAL PLAGUE FOCI OF THE CAUCASUS BY MULTI-LOCUS VNTR-ANALYSIS

¹Stavropol Research Institute for Plague Control, ²State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

Aim. Determination of the degree of phylogenetic relationship of *Yersinia pestis* strains isolated from the territories of natural foci of plague from the Caucasus using VNTR-typing by 25 loci (MLVA25). *Materials and methods.* 26 strains of *Y. pestis* from Russian natural foci of the Caucasus were used in the study. 25 loci of tandem repeats in *Y. pestis* genome by Le Fleche scheme were used for execution of multi-locus VNTR-analysis. Deciphering of nucleotide sequences was carried out in automatic sequencer ABI 3130 Genetic Analyser. Analysis of confinement of clusters to certain territories, objects and time of isolation of strains was carried out using Arc GIS 10.1 program. *Results.* Groups of MLVA25-types of various levels of discrimination were formed: clusters, groups and subgroups. Clusters were formed by strains of various taxonomic membership: main and subspecies of *Y. pestis*. Subgroups reflect membership of strains in certain foci, and MLVA25-types — the degree of genetic relationship. *Conclusion.* Genetic «portraits» of plague causative agents obtained using MLVA25-types circulating in various natural-focal territories allow to solve problems of both theoretical and practical character: from interpretation of microevolution processes to the search of the source of infection and ways of its spread during possible epidemic complications.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 35—41

Key words: *Yersinia pestis*, natural plague foci of the Caucasus, genotyping, multi-locus VNTR-analysis (MLVA25)

ВВЕДЕНИЕ

Чума — особо опасное инфекционное природно-очаговое заболевание, способное к эпидемическому распространению с охватом больших масс населения, и характеризуется крайне тяжелым течением с высокой летальностью. Периодическая активность природных очагов, возможность заноса возбудителей с эндемичных территорий на эпидемически благополучные оставляют эпидемическую обстановку достаточно сложной [9].

В соответствии с унифицированной классификацией очаговых территорий, основанной на особенностях проявлений чумы в различных ландшафтных зонах, на российской территории Кавказа выделены шесть природных очагов. *Y. pestis*, изолированные в этих очагах, подразделяется на два подвида:

основной *Yersinia subsp. pestis*, штаммы которого выделяют на территориях Центрально-Кавказского высокогорного (01), Дагестанского равнинно-предгорного (03), Прикаспийского песчаного (43), Терско-Сунженского низкогорного (02), Прикаспийского Северо-Западного степного (14) очагов, и кавказский *Yersinia subsp. caucasica* [4] (полевочий *Y. subsp. microti* [6]), изоляты которого выделяются в Восточно-Кавказском высокогорном очаге (39) (в круглых скобках — шифры природных очагов чумы).

К настоящему времени накоплен большой фактический материал о фенотипических и молекулярно-генетических свойствах *Y. pestis* из природных очагов разного типа. В основу фенотипических методов дифференциации возбудителя чумы положены способность ферментировать различные субстраты, питательные потребности и вирулентность для лабораторных животных. Хотя фенотипические методы и позволяют различать подвиды и биовары *Y. pestis*, с их помощью невозможно проводить типирование на уровне штаммов [1, 8].

Развитие методов современной фундаментальной генетики и молекулярной микробиологии позволяет перевести существующие классификации *Y. pestis* на качественно новый уровень, основанный на генетических свойствах возбудителя чумы [2, 7].

С помощью специальных компьютерных программ результаты генотипирования штаммов одного вида можно представить в виде филогенетического древа, причем кластеры у многих видов имеют четкую географическую локализацию [6].

Павлова А.И. и др. [5] показали, что в большинстве природных очагов сусликового и песчаночьего типов Российской Федерации и Монголии циркулируют штаммы с общим генотипом. Анисимовым А.П. и др. [8] были составлены молекулярные «портреты» штаммов *Y. pestis* из природных очагов Российской Федерации и различных регионов мира.

Проведенное нами ранее методом мультилокусного VNTR-анализа изучение штаммов из Центрально-Кавказского высокогорного природного очага позволило установить генетическую дивергенцию возбудителя чумы в процессе приспособления его паразитарной системы к условиям высокогорья, что может служить основанием для деления очага на отдельные участки природной очаговости, или на мезоочаги [2, 3]. Представляет интерес исследование степени генетического родства штаммов *Y. pestis* из природных очагов Северного Кавказа, сформировавшихся из древнего очага, занимавшего в среднем плейстоцене обширные пространства Южной Европы.

Цель работы — определить степень филогенетического родства штаммов *Y. pestis*, выделенных на территориях природных очагов чумы Кавказа, с помощью VNTR-типирования по 25 локусам (MLVA25).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 26 штаммов *Y. pestis* из природных очагов Кавказа из коллекции Ставропольского противочумного института. Сведения о генотипах пяти штаммов из Терско-Сунженского низкогорного и Прикаспийского Северо-Западного степного очагов были взяты из базы данных Государственного НИЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск). Сведения о времени и местах выделения штаммов представлены в табл.

Геномную ДНК выделяли в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР». Для выполнения мультилокусного VNTR-анализа использовали 25 локусов тандем-

Характеристика штаммов *Y. pestis* из разных природных очагов

Природный очаг чумы (шифр)	№ штамма	Объект выделения	Год и место выделения
01	C-777, C-816	Горный суслик, блохи (<i>C.tesquorum</i>)	2001, 2007, КБР
	C-771, C-775, C-803, C-806	Горный суслик, блохи (<i>C.tesquorum</i>)	2000, 2001, 2004, 2004, КЧР
03	C-742, C-747, C-749	Блохи (<i>N.setosa</i>)	1997, 1999, 1999, РД
43	C-768, C-770, C-790	Блохи (<i>N.setosa</i> , <i>C.tesquorum</i>), домовая мышь	2001, 2001, 2003, РД
39	C-739, C-825, C-823, C-824, C-707, C-831, C-744, C-371, C-700	Блохи (<i>M.turbidus</i> , <i>F.elata</i> , <i>C.caspicus</i> , <i>C.intermedius</i>), серый хомячок	1978, 1995, 1996, 1997, 1998, 2010, 2013, РД
02	C-277, C-278, C-283	Малый суслик	1970, ЧР
14	M-65 (98), M-421 (6275)	Тамарисковая песчанка	1925, 1938, Астраханская обл.

Примечание. Наименование природного очага см. во «Введении». КЧР — Карачаево-Черкесская Республика, КБР — Кабардино-Балкарская Республика, РД — Республика Дагестан, ЧР — Чеченская Республика.

ных повторов в геноме *Y. pestis* по схеме Le Fleche. Размер ампликонов для MLVA-локусов определяли после горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле с помощью маркера молекулярных масс (20 bd).

Расшифровку нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США) с набором реагентов Big Dye Terminator Kit v.3.1.

На основании метода UPGMA с помощью компьютерной программы START 2 была построена дендрограмма, отображающая степень филогенетического родства изолятов различных MLVA25-типов.

Анализ приуроченности кластеров к определенным территориям, объектам и срокам изоляции штаммов проводили с использованием программы Arc GIS 10.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами была проанализирована дендрограмма, отображающая степень филогенетического родства MLVA25-типов штаммов *Y. pestis*, изолированных в российских очагах Кавказа. Исследованные штаммы возбудителя чумы были подразделены на 21 MLVA25-типа (рис.).

Изученные изоляты делятся на два крупных кластера А и В. Кластер А сформирован штаммами из Восточно-Кавказского высокогорного очага, которые относятся к кавказскому подвиду *Y. pestis* subsp. *caucasica* (*Y. pestis* subsp. *microti*). Кластер В состоит из штаммов *Y. pestis* основного подвида, изолированных в очагах Северо-Кавказского и Южного федеральных округов.

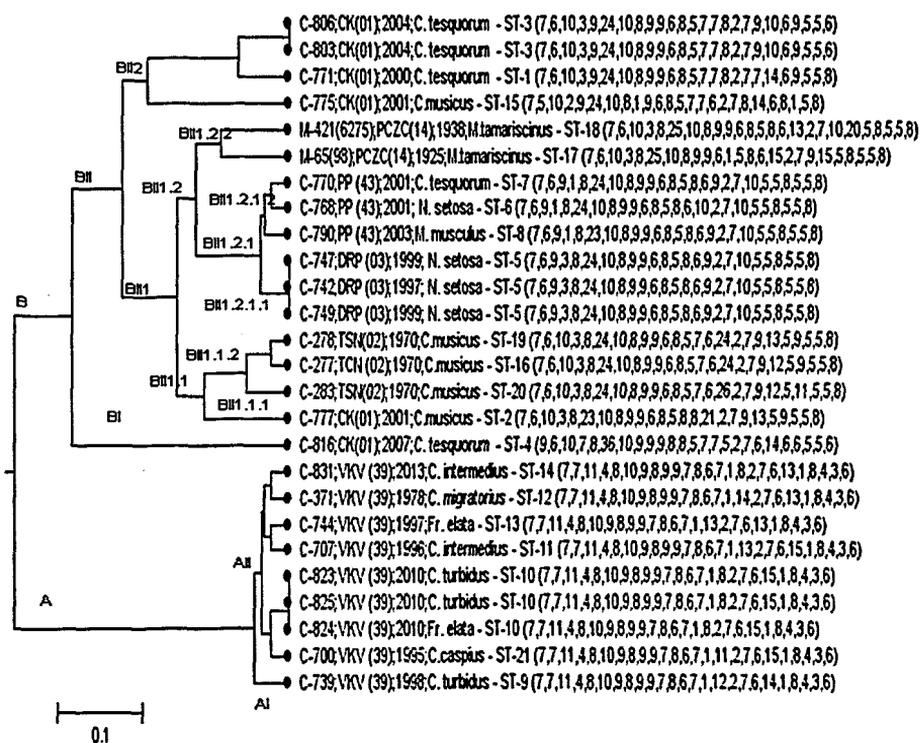
Кластер А образован двумя ветвями. Первая ветвь А1 представлена изолятом С-739, выделенным в Кулинском районе недалеко от села Хосрех в 1998 г.

от блох (*M. turbidus*), добытых из гнезд обыкновенной полевки. Вторая ветвь АII представлена восемью штаммами, образующими четыре подгруппы, изолированными в Кулинском и Агульском районах от разных носителей и их блох в течение 1995 — 2013 гг. Обращает на себя внимание MLVA25-тип, который состоит из трех штаммов С-823, С-824 и С-825, выделенных от блох разных видов на территории Кулинского района в 2010 г., что свидетельствует о циркуляции на этой территории в 2010 г. генетически однотипных штаммов.

Кластер В включает штаммы основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного, Дагестанского равнинно-предгорного, Прикаспийского песчаного, Терско-Сунженского низкогогорного и Прикаспийского Северо-Западного степного природных очагов. Данный кластер образован двумя группами VI и VII.

Ветви VI, VII1 и VII2 формируют группу типичных штаммов основного подвида из очагов сусликового типа: восточной части Центрально-Кавказского высокогорного и Терско-Сунженского низкогогорного.

Следующая группа организована ветвями VII1.2.1.1, VII1.2.1.2 и VII1.2.2. Это штаммы из Дагестанского равнинно-предгорного, Прикаспийского песчаного очагов и Прикаспийского Северо-Западного степного очага. В данных очагах носителями чумы являются как малые суслики, так и песчанки. Каждый из указанных очагов формирует в пределах группы отдельную подгруппу. Обращает на себя внимание, что штаммы из Дагестанского равнинно-предгорного очага относятся к одному MLVA25-типу. Они выделены от блох (*N. setosa*), добытых из входов нор и очеса малого суслика, собранных в 1997



Дендрогрмма MLVA25-типов штаммов *Y. pestis*, выделенных из очагов Кавказа (описание в тексте).

и 1998 гг. в Бабаюртовском районе недалеко от села Герменчик Республики Дагестан.

Отдельная подгруппа ВП1.2.2 представлена штаммами, изолированными в 1925 и 1938 гг. в Прикаспийском Северо-Западном степном очаге на территории Астраханской области, т.е. в период предшествующий массовому истреблению малых сусликов и выделению из состава этого очага в качестве самостоятельного Прикаспийского песчаного природного очага чумы.

Заключительная группа в дендрограмме, образованная ветвью ВП2, составлена штаммами из западной части Центрально-Кавказского высокогорного природного очага. Эта ветвь далеко отстоит от ветвей штаммов С-777 и С-816 (В1 и ВП1.1.1) из восточной части очага, что указывает на их значительные генетические различия, что является одним из свидетельств об эволюционной изменчивости паразитарной системы по мере продвижения носителей из зоны степей в высокогорные ландшафты. В этой группе отмечается еще один общий MLVA25-тип для двух штаммов С-806 и С-803 из западной части этого очага, изолированных в 2004 г.

Таким образом, в результате анализа филогенетического древа, построенного на основании результатов генотипирования 26 штаммов *Y. pestis* из шести природных очагов Кавказа, сформированы группы MLVA25-типов разного уровня дискриминации: кластеры, ветви, группы и подгруппы. Кластеры сформированы штаммами различной таксономической принадлежности: основным и полевочьим подвидами *Y. pestis*.

Кластер основного подвида состоит из групп и подгрупп. Группы объединяют штаммы очагов разных типов: сусликового, полевочьего и песчаночьего типов. Подгруппы составлены изолятами из отдельных очагов. Принадлежность штаммов к одному MLVA25-типу является свидетельством их генетического родства, как правило, они характеризуются общими участками и временем изоляции. Приведенная кластеризация свидетельствует о приуроченности сформированных на дендрограмме групп MLVA25-типов к определенным территориям.

Три очага — Прикаспийский Северо-Западный степной, Прикаспийский песчаный и Дагестанский равнинно-предгорный расположены в зоне степей и полупустынь Восточно-Европейской равнины, южной части Северо-Дагестанской низменности и предгорий Восточного Кавказа. Они составляют обширную и сплошную природноочаговую территорию, которая в историческом аспекте является реликтом древнего очага, занимавшего в среднем плейстоцене пространство Южной Европы. В 80-х годах прошлого столетия от Прикаспийского Северо-Западного очага отделен Прикаспийский песчаный очаг на том основании, что в результате профилактических противочумных работ численность малого суслика была резко снижена и основное эпизоотологическое значение приобрели песчанки. Южная оконечность природноочаговой территории представлена Дагестанским равнинно-предгорным очагом, который формировался в раннем голоцене в пределах ареала малого суслика. Все три очага являются полигостальными: носители чумы представлены малым сусликом, полуденными и гребенщикowymi песчанками, реже полевками и мышами разных видов.

К указанным очагам примыкает Восточно-Кавказский высокогорный природный очаг, который отделен от них географическим препятствием в виде лесистых высокогорий Восточного Кавказа. Популяции носителей существуют в виде мозаичных поселений обыкновенных и других видов полевок. Возбудитель чумы, циркулирующий здесь, имеет существенные генетические

отличия от возбудителя основного подвида, что послужило основанием выделения в отдельный кавказский подвид *Y. pestis*.

Терско-Сунженский низкогорный и Центральнo-Кавказский высокогорный природные очаги эволюционировали отдельно от остальных, будучи изолированными естественными физическими преградами. Оба они являются очагами сусликового типа и моногостальными. Однако в Центральнo-Кавказском очаге отмечается разнообразие генотипов возбудителя чумы. Здесь в результате проникновения сусликов в высокогорье структура паразитарной системы существенно изменилась, обусловив появление специфических для этих мест генотипов возбудителя чумы. Вместе с тем, в горной степи восточной части очага до настоящего времени сохранилась паразитарная система, присущая равнинным природным очагам чумы сусликового типа [3].

В целом, полученные с помощью MLVA25-типов генетические «портреты» культур возбудителя чумы, циркулирующих на разных природноочаговых территориях, позволяют решать задачи как теоретического, так и практического характера: от трактовки процессов микроэволюции до поиска источника инфекции и путей ее распространения при возможных эпидемических осложнениях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарева О.С., Савченко С.С., Ткаченко Г.А., Абуева А.И., Муратова Ю.О., Антонов В.А. Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014, 1: 34-43.
2. Евсеева В.В., Платонов М.Е., Говорунов И.Г., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Дентовская С.В., Куличенко А.Н., Анисимов А.П. Сравнительный анализ MLVA25- и MLVA7-типирования по способности определять очаговую принадлежность штаммов *Yersinia pestis* на примере изолятов из Центральнo-Кавказского высокогорного очага чумы. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016, 1: 37-40.
3. Евченко, Ю.М., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Мезенцев В.М., Белявцева Л.И., Платонов М.Е. и др. Изучение генетического разнообразия штаммов *Yersinia pestis* из Центральнo-Кавказского высокогорного природного очага чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 4: 51-55.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М., Медицина, 2004.
5. Павлова А.И., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Анализ генетической изменчивости штаммов *Yersinia pestis* средневекового био-вара из природных очагов чумы России и Монголии. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 4: 49-53.
6. Платонов М.Е. Молекулярно-генетическое изучение разнообразия и микроэволюции *Yersinia pestis*. Автореф. дис. канд. биол. наук. Оболенск, 2010.
7. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Светоч Т.Э., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Дентовская С.В., Куличенко А.Н., Анисимов А.П. Филогеография полевоцых штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов Кавказа и Закавказья. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012, 3: 18-21.
8. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Молекулярное типирование *Yersinia pestis*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2013, 2: 3-12.
9. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Матросов А.Н., Немченко Л.С., Вержуцкий Д.Б., Малецкая О.В., Горшенко В.В., Попов В.П., Топорков В.П., Топорков А.В., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2010 г. и прогноз на 2011 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2011, 1: 7-31.

Поступила 10.08.16

Контактная информация: Сердюк Наталия Сергеевна, к.б.н., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-48-19

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЕРОВАРОВ LEPTOSPIRA МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, С.-Петербург, ²Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова

Цель. Попытка использования метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации изолятов лептоспир на уровне сероваров. *Материалы и методы.* В исследование были включены 8 референсных штаммов *Leptospira* spp. и 11 штаммов лептоспир, выделенных от больных лептоспирозом и инфицированных животных в Северо-Западном регионе России. Масс-спектры всех исследуемых штаммов получали прямым профилированием клеточных экстрактов. Созданные главные спектральные профили (MSP) референсных штаммов использовали для идентификации изолятов. Оценку идентификации осуществляли путем вычисления коэффициентов совпадения отдельных спектров каждого изолята с MSP всех референсных штаммов. *Результаты.* Результаты идентификации показали схожесть спектров изолятов, относящихся к серогруппам *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae* и *Canicola*, с MSP сапрофитного штамма *L. biflexa* Patoc I. Предполагается, что спектры исследуемых штаммов содержали в своем составе пики полисахаридных O-антигенов. При этом максимальные средние значения коэффициентов совпадения между спектрами изолятов и MSP патогенных референсных штаммов лептоспир правильно совпадали с типом серовара изолята. *Заключение.* Дальнейшие расширенные исследования могут быть положены в основу разработки быстрого и простого метода типирования возбудителей лептоспироза на уровне сероваров с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 42—49

Ключевые слова: *Leptospira* spp., серотипирование, серовары, MALDI-TOF масс-спектрометрия

Е.В.Зуева¹, Н.А.Стоянова¹, Н.К.Токаревич¹, Арег А.Тотолян^{1,2}

IDENTIFICATION OF LEPTOSPIRA SEROVARS BY MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY

¹Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Russia

Aim. An attempt to use MALDI-TOF mass-spectrometry method for identification of leptospiral isolates on the serovar level. *Materials and methods.* 8 reference *Leptospira* spp. and 11 leptospira strains isolated from leptospiral patients and infected animals in the North-Western region of Russia were included into the study. Mass-spectra of all the studied strains were obtained by direct profiling of cell extracts. The created main spectral profiles (MSP) of reference strains were used for identification of isolates. Evaluation of identification was carried out by calculating coefficients of matching rate of separate spectra of each isolate with MSP of all the reference strains. *Results.* Results of identification have shown the similarity of spectra of isolates belonging to *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae* and *Canicola* serogroups, with MSP of saprophyte strain *L. biflexa* Patoc I. It is assumed that spectra of the studied strains contained peaks of polysaccharide O-antigens. Wherein maximum mean values of matching rate coefficients between spectra of isolates and MSP of pathogenic reference strains of leptospira correctly matched serovar type of the isolate. *Conclusion.* Further extended studies may form the base of development of a simple and rapid method of typing of leptospirosis causative agents on the level of serovars using MALDI-TOF mass-spectrometry.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 42—49

Key words: *Leptospira* spp., serotyping, serovars, MALDI-TOF mass-spectrometry

ВВЕДЕНИЕ

Лептоспироз — зоонозное бактериальное заболевание, наиболее распространенное в районах с высоким уровнем осадков и теплым климатом. Ежегодно лептоспирозом заболевают около одного миллиона человек и регистрируется до 60 000 смертей среди населения планеты. При этом наибольшая заболеваемость и летальность отмечаются в самых бедных регионах мира, а также в местах, где санитарно-эпидемиологический надзор осуществляется не на должном уровне [12]. Согласно данным глобальных исследований Международного общества по лептоспирозу, ежегодно регистрируется 350 000 — 500 000 тяжелых случаев течения заболевания [9]. Эти оценки свидетельствуют о значимости лептоспироза как одного из ведущих зоонозных заболеваний. Ожидается, что в ближайшие десятилетия лептоспироз станет важной эпидемиологической проблемой в связи с изменениями климата и демографии нашей планеты. Факторами риска повышения заболеваемости лептоспирозом могут стать глобальное потепление, частые экстремальные климатические явления, урбанизация, миграция [14].

Возбудителями лептоспироза являются бактерии рода *Leptospira*, принадлежащие к самостоятельному семейству *Leptospiraceae* в порядке *Spirochaetales*. Генетическая классификация, основанная на методе ДНК-ДНК гибридизации, насчитывает 21 вид лептоспир [18], которые можно разделить на три эволюционные ветви: 1) патогенные виды, 2) промежуточные, которые являются патогенно-подобными видами, 3) сапрофиты [Picardeau M., 2014]. Согласно традиционной серологической классификации, основанной на структурной неоднородности полисахаридных О-антигенов, входящих в состав липополисахаридов (ЛПС) клеточной мембраны грамотрицательных бактерий, представители рода лептоспир подразделяются более чем на 300 сероваров, которые сгруппированы в 29 серогрупп в соответствии с антигенным родством [11, 16].

Лептоспироз имеет широкое географическое распределение из-за большого спектра млекопитающих (грызуны, домашние и сельскохозяйственные животные), являющихся хозяевами инфекционного агента и выделяющих его с мочой в окружающую среду. Распространение различных сероваров лептоспир связано с одним или несколькими хозяевами, которые служат в качестве резервуара инфекции. Например, крысы служат в качестве резервуара для сероваров *icterohaemorrhagiae*, в то время как собаки, чаще всего, могут быть источником серовара *canicola*. [1, 6, 19]. В России наибольшее эпидемиологическое значение имеют возбудители серовариантов *icterohaemorrhagiae*, *sopenhageni*, *canicola*, *grippotyphosa*, *romona*, *tarassovi*, *sejroe* [2, 6], относящиеся к трем геномным видам: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*. Таким образом, идентификация штаммов лептоспир, выделенных от больных и инфицированных животных, на уровне сероваров и серогрупп важна для решения эпидемиологических задач и понимания распространенности лептоспир в различных регионах.

В настоящее время таксономическое типирование подвидов лептоспир базируется на классических серологических методах, таких как реакция микроскопической агглютинации (РМА) для определения серогруппы и тест-перекрестной агглютинации-абсорбции для идентификации сероваров. Серотипирование изолятов лептоспир является сложной процедурой, которая

может быть выполнена только в референсных центрах. По этой причине в качестве альтернативы были предложены различные молекулярно-генетические методы [9], среди которых наиболее часто используемыми являются секвенирование гена 16S рибосомальной РНК и мультилокусное секвенирование-типирование. Эти методы генотипирования позволяют дифференцировать лептоспиры на уровне видов и в настоящее время используются преимущественно в качестве инструмента популяционного филогенетического анализа для более глубокого понимания эволюции лептоспир [5, 8, 10, 15, 20].

Таким образом, серотипирование лептоспир до сих пор остается чрезвычайно ценным инструментом эпидемиологических исследований, который нуждается в новых подходах к их идентификации и простых в исполнении современных методах типирования штаммов лептоспир на уровне сероваров.

В последнее десятилетие для идентификации бактерий и грибов стал использоваться метод матрикс-активированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной (MALDI-TOF) масс-спектрометрии. Появились единичные литературные данные, свидетельствующие о том, что MALDI-TOF масс-спектрометрия может быть быстрым и надежным методом идентификации лептоспир путем создания библиотеки спектров [3, 13]. Кроме того, показано, что масс-спектрометрия позволяет идентифицировать штаммы лептоспир на уровне видов аналогично методам секвенирования [18], определена возможность применение этого метода для категоризации штаммов лептоспир на патогенные и непатогенные группы [21], а также для лабораторного контроля пересева эталонных штаммов *Leptospira*, используемых в РМА [4].

Цель данной работы — попытка применения метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации штаммов *Leptospira*, выделенных от больных лептоспирозом людей и инфицированных животных, на уровне сероваров с использованием подхода построения библиотеки эталонных спектров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали набор референсных штаммов *Leptospira* spp., применяемый в РМА, включающий 4 штамма вида *L. interrogans*, 1 штамм вида *L. borgpetersenii*, 2 штамма вида *L. kirschneri* и 1 сапрофитный штамм *L. biflexa*, а также 11 штаммов лептоспир, выделенных в Северо-Западном регионе России. Все исследуемые штаммы были из коллекции С.-Петербургского НИИ им. Пастера. Предварительная характеристика изолятов была проведена на уровне определения серогруппы методом РМА и сероваров методом перекрестной агглютинации-абсорбции. Три штамма исследуемых изолятов относились к серогруппе Pomona (серовары *mozdoc* и *pomona*), два штамма — к серогруппе Icterohaemorrhagiae (серовары *copenhageni*), два штамма — к серогруппе Canicola, два штамма — к серогруппе Grippotyphosa и два штамма — к серогруппе Tarassovi. Референсные штаммы и штаммы изолятов культивировали в течение 14 дней в фосфатно-сывороточной среде Терских при 28°C. Масс-спектры клеточных экстрактов были получены на масс-спектрометре «Microflex RLF» (Bruker Daltonics, Германия) с использованием в качестве калибратора бактериального тест-стандарта (Bruker Daltonics, Германия). Эталонные спектры 8 референсных штаммов получены путем объединения не менее 15 отдельных спектров каждого штамма в главный спектральный профиль (MSP). Кластерный анализ спектров осуществляли

методом главных компонент и путем построения MSP дендрограммы с помощью программного обеспечения «Biotyper 3.1» (Bruker Daltonics). Оценка идентификации 11 штаммов *Leptospira*, выделенных от людей и инфицированных животных, осуществлялась путем вычисления коэффициентов совпадения не менее 6 отдельных спектров каждого изолята со всеми эталонными спектрами. Результаты сравнительной идентификации обрабатывали с использованием программы GraphPad Prism v.6.0. Различия между коэффициентами совпадения спектров изолятов с референсными штаммами оценивали однофакторным дисперсионным анализом ANOVA методом множественного сравнения с использованием критерия Даннета при $\alpha = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для создания библиотеки эталонных масс-спектров был проведен масс-спектрометрический анализ семи хорошо охарактеризованных патогенных референсных штаммов *Leptospira* spp., входящих в диагностический набор для постановки РМА, и одного непатогенного штамма Patoc I. Оценка отдельных спектров, включенных в состав эталонного спектра каждого референсного штамма, проведенная с помощью кластерного анализа методом главных компонент (рис. 1), показала четкое разделение отдельных спектров на кластеры согласно соответствующим сероварам. Визуализация результатов анализа представлена в виде 3-мерного графика, в котором система координат (основные компоненты) отражает линейную комбинацию коэффициентов корреляции Тау-Кендалла между

множеством значений интенсивности пиков в спектрах. Как видно на рис. 1, отдельные спектры каждого референсного штамма, представленные в виде точек, имели близкие коэффициенты корреляции и группировались в кластеры согласно соответствующим сероварам. При этом спектры сероваров pomona, copenhageni, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa и tarassovi давали четкое разделение на однородные кластеры. В то же время, спектры сероваров patoc, canicola и mozdoc, хотя и образовывали отдельные кластеры, но коэффициенты корреляции между их пиками не имели достаточного различия для удовлетворительного визуального расхождения их кластеров.

Для определения сход-

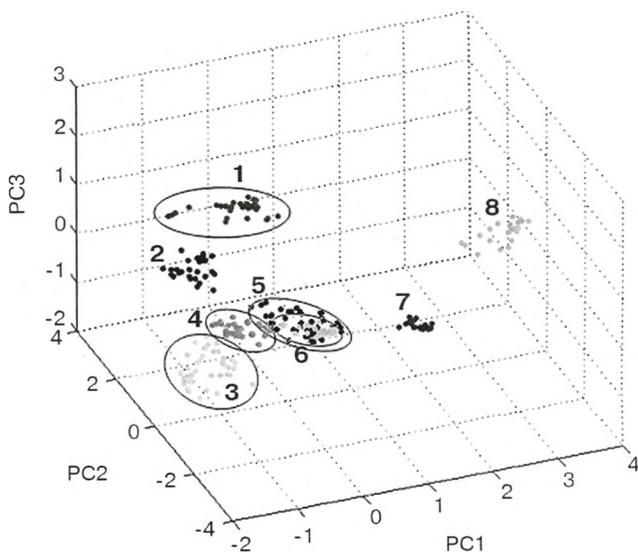


Рис. 1. Анализ масс-спектров референсных штаммов *Leptospira* spp. методом главных компонент.

Значения по осям координат соответствуют коэффициентам корреляции Тау-Кендалла между спектрами. Кластеры: 1 — *L.interrogans* copenhageni st. M20, 2 — *L.interrogans* icterohaemorrhagiae st. RGA, 3 — *L.interrogans* pomona st. Pomona, 4 — *L.biflexa* patoc st. Patoc I, 5 — *L.kirschneri* mozdoc st. 5621, 6 — *L.interrogans* canicola st. Hond Utrecht IV, 7 — *L.kirschneri* grippotyphosa st. Moskva V, 8 — *L.borgpetersenii* tarassovi st. Perepelitsin.

ства и таксономического родства между референсными штаммами и исследуемыми изолятами *Leptospira* spp. был проведен анализ их главных спектральных профилей с помощью построения дендрограммы (рис. 2), представляющей собой иерархию всех 18 штаммов. Видно, что профили всех штаммов группировались в три подгруппы, дистанция между которыми, обозначенная пунктирными линиями, составляла около 130, 160 и 220 арбитральных единиц. При этом подгруппа I включала штаммы, относящиеся к серогруппе Tarassovi, подгруппа II включала штаммы серогруппы Grippotyphosa. Подгруппа III содержала профили штаммов серогрупп Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola, а также непатогенного штамма Patoc I.

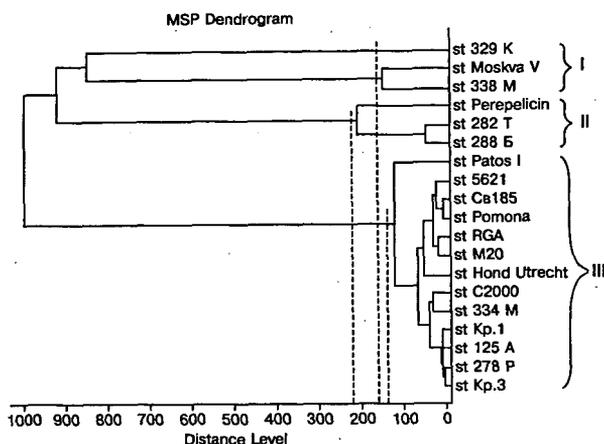


Рис. 2. Иерархическая кластеризация спектров референсных штаммов и изолятов *Leptospira*.

Ось абсцисс — расстояние с баллами значений меры близости (расстояние Евклида) между спектральными профилями. Произвольные вертикальные пунктирные линии обозначают отсечение значений подобия между кластерами.

При идентификации изолятов лептоспир для каждого исследуемого штамма был назначен контрольный эталонный спектр серовара, на уровне которого изолят был предварительно серотипирован. Из представленных в табл. результатов видно, что для всех изолятов при сопоставлении их спектров с

Результаты идентификации изолятов лептоспир методом MALDI-TOF масс-спектрометрии

Серогр. изолята (РМА)	Штамм изолята	Среднее значение (M) коэффициента совпадения изолята с MSP контрольного серовара и отличие от него средних значений коэффициентов совпадения изолята с сероварами референсных штаммов							
		pomona	mozd.	patoc	canicola	copenh.	ictero.	grippot.	tarass.
Ictero.	346A	0,15	0,34	-0,08	0,08	M=2,2	0,04	0,56*	1,30***
Ictero.	278P	0,32	0,53	0,12	0,21	M=2,3	0,16	1,09**	1,46***
Canicol.	C2000	0,13	0,39*	0,04	M=2,1	0,40*	0,23	0,42*	0,84***
Canicol.	M480	1,6***	0,09	0,15	M=2,4	0,13	0,38	0,23	2,0***
Pomona	Св185	M=2,7	0,50**	0,27	0,57**	0,49*	0,63***	0,93***	0,85***
Pomona	Кр1	0,67***	M=2,3	-0,07	0,21	0,50**	0,30	0,38*	0,88***
Pomona	Кр3	0,66*	M=2,3	-0,06	0,25	0,66*	0,13	0,52*	1,64***
Grippot.	338M	0,15	0,52**	0,19	0,41*	0,27	0,39*	M=2,1	0,65**
Grippot.	329K	0,77***	0,48**	0,31*	0,66***	0,47**	0,95***	M=2,3	1,10***
Tarass.	288Б	0,55	0,79**	1,4***	0,94***	0,89**	0,91***	1,15***	M=2,2
Tarass.	282Т	1,1*8	1,11*	1,20**	0,83	1,57***	1,21**	1,47**	M=2,0

Примечание. *P<0,05; **P<0,01; *** P<0,001 — уровень значимости различия коэффициентов совпадения согласно тесту множественного сравнения с применением критерия Даннета.

MSP патогенных референсных штаммов наиболее высокие баллы коэффициентов совпадения регистрировались у соответствующих контрольных сероваров. В то же время, при сопоставлении с сапрофитным штаммом Patoc I у изолятов 125A, Kp1 и Kp3 оценки совпадения с ним были немного более высокие, чем с соответствующими контрольными сероварами. Кроме того, не было достоверно значимого различия между оценками совпадения большинства изолятов с сапрофитом, за исключением изолятов, которые относились к серогруппам Tarassovi и Grippytyphosa. Наиболее достоверно значимые показатели классификации наблюдались у изолятов серогрупп Grippytyphosa, Pomona и Tarassovi, в то время как у изолятов серогрупп Canicola и Icterohaemorrhagiae статистически значимое различие было только с сероварами tarassovi и grippytyphosa.

ОБСУЖДЕНИЕ

Методы серотипирования, такие как РМА и тест перекрестной агглютинации-абсорбции, являются трудоемкими, требующими наличия и поддержания коллекции эталонных штаммов, а также панелей стандартных кроличьих сывороток, специфичных к различным серогруппам и сероварам лептоспир. Поскольку патогенные *Leptospira* spp. насчитывают более 250 сероваров [11], то к большинству из них соответствующие антисыворотки отсутствуют, что ограничивает возможности этих методов по типированию эпидемиологически важных штаммов. В то же время, несмотря на прогресс в области молекулярно-генетических исследований в последние десятилетия, методы генотипирования пока не позволяют идентифицировать лептоспиры на уровне сероваров.

Для определения возможности типирования лептоспир методом MALDI-TOF масс-спектрометрии был применен подход построения библиотеки эталонных спектров референсных штаммов *Leptospira* spp., относительно которых проведен сравнительный анализ спектров изолятов. Иерархия спектров всех исследуемых штаммов, представленная в виде дендрограммы, выявила дифференциацию их на три подгруппы, при этом две из них соответствовали серогруппам Tarassovi и Grippytyphosa. Третья подгруппа объединяла штаммы сразу нескольких серогрупп, включая и сапрофитный штамм Patoc I. Небольшое различие в баллах Евклидова расстояния между профилями спектров в этом кластере свидетельствует о значительной мере близости между патогенными штаммами серогрупп Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola и непатогенным штаммом Patoc I. Эти результаты согласуются с хорошо известными данными о том, что сыворотки крови больных лептоспирозом имеют перекрестную реактивность в РМА с некоторыми сапрофитными штаммами [7, 20]. Доказано, что иммунологический перекрест этих сапрофитов с патогенными сероварами обусловлен сходством строения их ЛПС, что позволило использовать полисахаридный антиген *L. biflexa* Patoc I в производстве диагностических наборов для определения IgG и IgM к основным возбудителям лептоспироза [17].

Результаты идентификации десяти изолятов также показали отсутствие достоверно значимых различий между оценками совпадения большинства их с сапрофитным штаммом Patoc I. Полученные результаты схожести патогенных штаммов, относящиеся к серогруппам Pomona, Icterohaemorrhagiae и Canicola, с непатогенным штаммом Patoc I позволили предположить, что как исследуемые спектры изолятов, так и эталонные спектры референсных штаммов содержат в своем составе пики не только белков, но и полисахаридных

О-антигенов, структурное различие которых обуславливает серологическую специфичность. По-видимому, присутствие в спектрах полисахаридных пиков обусловило получение максимальных значений коэффициентов совпадения изолятов с эталонными спектрами соответствующих сероваров патогенных штаммов, на уровне которых изоляты были серотипированы, и в целом позволило правильно идентифицировать изоляты согласно их серологической классификации.

Дальнейшие исследования по созданию библиотеки эталонных спектров с включением в нее широкого набора референсных штаммов *Leptospira* spp., совершенствованию протокола масс-спектрометрии, а также проведение испытания на большом количестве образцов выделенных штаммов могут способствовать применению быстрого, простого в исполнении метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации возбудителей лептоспироза на уровне сероваров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы в Российской Федерации: современные особенности эпидемического проявления природных и техногенных очагов. Ветеринарная патология 2004, 4: 54-57.
2. Ананьина Ю.В., Петров Е.М. Лептоспирозы в России: этиологическая структура и современная этиология. Пест-Менеджмент 2006, 1: 8-10.
3. Бренева Н.В., Афанасьев М.В., Шаракшанов М.Б. и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ клеточных белков в идентификации представителей *Leptospira*. Журн. микробиол. 2014, 4: 36-43.
4. Зуева Е.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Тотолян Арег А. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов *Leptospira* spp., используемых в серодиагностике лептоспироза. Журн. микробиол. 2015, 6: 28-36.
5. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. и др. Типирование штаммов *Leptospira* spp. на основе 16S rRNA. Журн. микробиол. 2016, 1: 35-39.
6. Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний лептоспирозами. Методические указания 3.1.1128-02. М., МЗ РФ, 2002.
7. Addamiano L, Babudieri B. Water strains of *Leptospira* in the serodiagnosis of human and animal leptospirosis. Bull. World Health Organ. 1968, 39: 925-934.
8. Ahmed A., Thaipadungpanit J., Boonsilp S. et al. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. PLoS Negl. Trop. Dis. 2011, 5: e1374.
9. Ahmed A., Grobusch M.P., Klatser P.R., Hartskeerl R.A. Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. J. Bacteriol. Parasitol. 2012, 3: 1000133.
10. Boonsilp S., Thaipadungpanit J., Amornchai P. et al. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. PLoS Negl. Trop. Dis. 2013, 7 (1): e1954.
11. Cerqueira G.M., Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. Infect. Genet. Evol. 2009, 9: 760-768.
12. Costa F., Hagan J. E., Calcagno J. et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. PLoS Negl. Trop. Dis. 2015, 9: e0003898.
13. Djelouadji Z., Roux V., Raoult D. et al. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms. Vet. Microbiol. 2012, 6: 142-146.
14. Lau C.L., Smythe L.D., Craig S.B., Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2010b, 104: 631-638.
15. Leon A., Pronost S., Fortier G. et al. Multilocus sequence analysis for typing *Leptospira* interrogans and *Leptospira kirschneri*. J. Clin. Microbiol. 2010, 48 (2): 581-585.
16. Levett P.N. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 2001, 14: 296-326.
17. Matsuo K., Isogai E., Araki Y. Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. Microbiol. Immunol. 2000, 44: 887-890.

18. Rettinger A., Krupka I., Grünwald K. et al. *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology* 2012, 12: 185.
19. Stoyanova N., Tokarevich N., Gracheva L. et al. Leptospirosis in North-West Russia. *EpiNorth*. 2004, 2: 29–32.
20. Voronina O.L., Kunda M.S., Aksenova E.I. et al. The characteristics of ubiquitous and unique *Leptospira* strains from the collection of Russian centre for leptospirosis. *BioMed Res. Int.* 2014: 649034.
21. Xiao D., Zhang C., Zhang H. et al. A novel approach for differentiating pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* based on molecular fingerprinting. *J. Proteomics*. 2015, 119: 1–9.

Поступила 25.08.16

Контактная информация: Зуева Елена Викторовна, к.б.н.,
197101, С.-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812)232-31-55

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*И.В.Савельева*¹, *С.Н.Тихонов*², *В.Н.Савельев*¹, *Д.А.Ковалев*¹, *С.В.Писаренко*¹,
*Е.С.Котенев*¹, *Б.В.Бабеншев*¹, *Л.С.Зинич*², *Н.Н.Пидченко*², *А.Н.Куличенко*¹

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ, ВЫДЕЛЕННЫХ В УКРАИНЕ В 1994 — 2011 ГГ.

¹Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, ²Противочумная станция Республики Крым, Симферополь

Цель. Ретроспективный анализ биологических и молекулярно-генетических свойств штаммов возбудителя холеры, выделенных в период эпидемий в Украине в 1994 — 2011 гг. *Материалы и методы.* С помощью традиционных бактериологических и генетических методов исследованы фенотипические и молекулярно-генетические свойства 5 штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор, выделенных от больных холерой, и 4 штамма — из объектов окружающей среды. Детекцию ДНК генов токсигенности и генов, присущих биовару Эль Тор или классическому, осуществляли методом ПЦР с использованием набора реагентов: «АмплиСенс-Vibrio cholerae FRT» и «Гены *Vibrio cholerae* ctxB-rstR-rstC, РЭФ» (экспериментальная тест-система). Секвенирование геномов 4 штаммов возбудителя холеры осуществляли на генетическом анализаторе Ion Torrent Personal Genome Machine. *Результаты.* Штаммы холерных вибрионов, идентифицированные в Украине в 1994 и 2011 гг. как типичный токсигенный биовар Эль Тор (*V.cholerae* O1, El Tor, Ogawa, Hly-, ctxA⁺, trxA⁺), содержат в своем геноме гены классического холерного вибриона и являются генетически измененными (гибридными) вариантами холерного вибриона биовара Эль Тор, продуцирующими энтеротоксин СТ1 и обладающими повышенной вирулентностью, что клинически выразилось в преобладании тяжелых форм течения холеры в Мариуполе Донецкой области в 2011 г. Геномные последовательности четырех исследуемых штаммов депонированы в международную базу данных DDBJ/EMBL/GenBank. *Заключение.* По результатам сравнения геномных последовательностей исследуемых штаммов с геномами штаммов *V. cholerae* из международной базы данных GenBank установлено, что исследуемые изоляты входят в клад штаммов, ассоциируемых со вспышками холеры на Гаити и на Азиатском континенте, откуда в 2010 г. генетически измененные штаммы холерных вибрионов биовара Эль Тор были завезены на Гаити.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 49—55

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холера, ПЦР, гентипирование, гибридные варианты биовара Эль Тор

I.V.Savelieva¹, S.N.Tikhonov², V.N.Saveliev¹, D.A.Kovalev¹, S.V.Pisarenko¹,
E.S.Kotenev¹, B.V.Babenyshchev¹, L.S.Zinich², N.N.Pidchenko², A.N.Kulichenko¹

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF BIOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC PROPERTIES OF STRAINS — CAUSATIVE AGENTS OF CHOLERA — ISOLATED IN UKRAINE IN 1994 — 2011

¹Stavropol Research Institute for Plague Control, ²Station for Plague Control of the Republic of Crimea, Simferopol, Russia

Aim. Retrospective analysis of biological and molecular-genetic properties of strains — causative agents of cholera — isolated in the period of epidemics in Ukraine in 1994 — 2011. **Materials and methods.** Phenotypic and molecular-genetic properties of 5 strains of cholera vibrios, biovar El Tor isolated from cholera patients and 4 strains from the environmental samples were studied using traditional bacteriological and genetic methods. Detection of DNA for toxigenicity genes and genes characteristic for El Tor and classic biovar were carried out by PCR method using reagent kits «AmpliSens-*Vibrio cholerae* FRT» and «*Vibrio cholerae* ctxB-rstR-rstC genes, REF» (an experimental test system). Sequencing of genomes of 4 strains of causative agents of cholera was carried out in genetic analyzer Ion Torrent Personal Genome Machine. **Results.** Strains of cholera vibrios identified in Ukraine in 1994 and 2011 such as a typical toxigenic biovar El Tor (*V. cholerae* O1, El Tor, Ogawa, Hly-, ctxA+, tcpA+) contain genes of the classic cholera vibrio in their genome and are genetically altered (hybrid) variants of cholera vibrio biovar El Tor producing enterotoxin CT1 and having increased virulence, that was clinically manifested in predominance of severe forms of cholera in Mariupol of Donetsk region in 2011. Genome sequences of the 4 studied strains were deposited into the international database DDBJ/EMBL/GenBank. **Conclusion.** The studied isolates were established to belong to a clade of strains associated with cholera outbreaks in Haiti and Asian continent, from where genetically altered strains of cholera vibrios biovar El Tor were introduced to Haiti in 2010, based on results of comparison of genomic sequences of the studied strains with genomes of *V. cholera* strains from the international database GenBank.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 49—55

Key words: *Vibrio cholerae*, cholera, PCR, genotyping, hybrid variants of El Tor biovar

ВВЕДЕНИЕ

В период седьмой пандемии, начавшейся в 1961 г. на о. Сулавеси (Индонезия), холера в Украину (Одесса) была завезена морским транспортом из неблагополучных по холере стран Азиатского континента в 1970 г. Из биологического материала 1982 больных был выделен типичный токсигенный холерный вибрион биовара Эль Тор (*Vibrio cholerae* O1, El Tor, Ogawa, Hly-, ctxA⁺, tcpA⁺). В последующие годы крупные вспышки завозного характера регистрировали в Республике Крым (Симферополь, 1994 г.); в 1991, 1994, 1995 гг. — в Николаевской, Одесской, Херсонской и Донецкой (1994, 2011 гг.) областях и были вызваны токсигенными штаммами холерного вибриона биовара Эль Тор (*Vibrio cholerae* O1, El Tor, Ogawa, Hly-, ctxA⁺, tcpA⁺) [1, 2, 4].

Вспышки холеры в Украине протекали в летне-осенний период года, при высокой температуре воздуха, на территориях со значительной плотностью населения, при реализации массовых факторов передачи возбудителя (вода, пищевые продукты) на фоне грубых нарушений при эксплуатации систем водоснабжения и канализации [5].

С 27.05.2011 по 31.08.2011 гг. была зарегистрирована вспышка холеры в Мариуполе (Донецкая область) — крупном портовом и промышленном городе. Всего было зарегистрировано 58 случаев инфицирования, в том числе

33 больных и 25 носителей. Вспышка была вызвана токсигенными штаммами *V. cholerae* O1 серогруппы, которые относились к биовару El Tor, серовару Ogawa и содержали основные гены патогенности $ctxA^+$, $tcpA^+$. С фекалиями больных (носителей) возбудитель попал в городскую централизованную канализационную систему Мариуполя, выгребные ямы для нечистот, ливневую канализацию, затем в реки Кальчик, Кальмиус и Азовское море.

Развитию вспышки способствовали интенсивные дождевые осадки, подтопления частных канализационных колодцев, аварии в централизованной канализационной системе города, несанкционированные сбросы сточных вод в ливневую канализацию и впоследствии в реки Кальчик, Кальмиус и Азовское море. Заражение людей происходило при отлове, разделке и употреблении в пищу рыбы, пойманной в контаминированной холерными вибрионами речной и морской воде, а также при купании в море или питье необеззараженной воды из рек.

Предположительно эпидемически опасные штаммы холерного вибриона биовара Эль Тор были завезены туристами, вернувшимися в 2011 г. в Украину из Гаити, Доминиканской Республики и Африки, где в то время наблюдались эпидемии холеры [6].

Эпидемические вспышки холеры в Украине в 1994 и 2011 гг. характеризовалась преобладанием тяжелых форм течения болезни с выраженным обезвоживанием (III — IV степень), которая отмечена у 68,8% больных. Другая особенность вспышки холеры в 2011 г. заключалась в том, что выделенные от больных и из объектов окружающей среды (вода реки Кальмиус, выпадающая в Азовское море в районе городского пляжа, вода моря, рыба) 136 культур, идентифицированные как *Vibrio cholerae* O1, El Tor, Ogawa, Hly-, $ctxA^+$, $tcpA^+$, обладали полирезистентностью к антибактериальным препаратам (левомицетину, ампициллину, стрептомицину, бензилпенициллину, ампициллину) [3].

Приведенные данные об особенностях течения эпидемического процесса холеры в 1994 и 2011 гг. позволяют сделать вывод о том, что этиологическим агентом инфекции были холерные вибрионы биовара Эль Тор с повышенной токсигенностью и полирезистентностью к антибактериальным препаратам, что характерно для генетически измененных (гибридных) вариантов холерного вибриона биовара Эль Тор, получивших глобальное распространение в мире в начале девяностых годов XX столетия [8,9,11]. Диагностическими препаратами для идентификации и детекции генетически измененных вариантов холерного вибриона биовара Эль Тор Украина не располагала.

Цель работы — ретроспективный анализ биологических и молекулярно-генетических свойств штаммов возбудителя холеры, выделенных в период вспышек в г. Мариуполь Донецкой области в 1994 и в 2011 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы 9 штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор: 3 штамма выделены от людей и 1 из объектов окружающей среды (сточная вода инфекционной больницы) в г. Мариуполь Донецкой области Украины в период эпидемий холеры в 1994 г.; 1 штамм холерных вибрионов от больного и 1 штамм из воды канала и 2 штамма из морской воды в 2011 г.; 1 штамм холерных вибрионов Эль Тор изолирован от больного в 1995 г. Морфологические, биохимические, серологические, фаголизательные свойства штаммов холерных вибрионов изучали в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». Детекцию ДНК генов токсигенности и генов, присутствующих

биоварам Эль Тор или классическому, осуществляли методом ПЦР с использованием набора реагентов «АмплиСенс-Vibrio cholerae FRT», предназначенного для детекции в материале от людей или в пробах из объектов окружающей среды холерных вибрионов O1 (по hlyA-гену) и O139 (по wbeF-гену) серогрупп с одновременным определением генов токсигенности (ctxA и tcpA), и с помощью разработанного нами набора реагентов для идентификации токсигенных штаммов Vibrio cholerae O1, определения их биовара и дифференциации штаммов биовара Эль Тор на типичные токсигенные и генетически измененные варианты методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с электрофорезным учетом результатов «Гены Vibrio cholerae ctxB-rstR-rstC, РЭФ». Для определения размеров ампликонов использовали DNA Ladder 100.

Праймеры к мишеням основных генов патогенности профагов CTX^{CL}_φ (ctxB^{CL}, rstR^{CL}), CTX^{EL}_φ (ctxB^{EL}, rstR^{EL}) и гена rstC профага RSI_φ [7, 8, 12] изготовлены в Ставропольском противочумном институте.

Секвенирование геномов 4 штаммов возбудителя холеры (V. cholerae 31, V. cholerae 39, V. cholerae 43, V. cholerae 56) осуществляли на генетическом анализаторе модели Ion Torrent Personal Genome Machine. Оценка качества первичных данных проводили с помощью программы FastQC. Функциональную аннотацию геномных последовательностей осуществляли с использованием ресурсов «Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST)» и «NCBI GenBank Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении фенотипических и молекулярно-генетических свойств штаммов холерных вибрионов, обусловивших эпидемические вспышки холеры в Украине в 1994 и 2011 гг., установлено, что данные микроорганизмы являются грамотрицательными, аспорогенными, полиморфными прямыми или слегка изогнутыми палочками, активно подвижными, с одним полярно расположенным жгутиком, индофенолоксидазоположительными, ферментирующими глюкозу в аэробных и анаэробных условиях до кислоты (без газа), расщепляющими маннозу, сахарозу, маннит, не активными в отношении лактозы, арабинозы, дульцита, инозита, декарбоксилирующие лизин и орнитин, не обладающие аргининдегидролазой, агглютинирующимися холерной сывороткой O1 серогруппы и типовой Ogawa, и, таким образом, таксономически относятся к роду Vibrio семейства Vibrionaceae, виду Vibrio cholerae O1 серологической группы, серовару Ogawa. Устойчивость к 50 ЕД полимиксина В, агглютинация эритроцитами морской свинки, образование ацетилметилкарбинола в реакции Фогес-Проскауэра, лизис диагностическим бактериофагом Эльтор II и устойчивость к бактериофагу «С» позволяют отнести выделенные в г. Мариуполь Донецкой области штаммы к Vibrio cholerae O1 серологической группы, биовару Эль Тор.

Результаты генетической идентификации всех 9 изучаемых штаммов микроорганизмов с помощью мультилокусной ПЦР (набор «АмплиСенс-Vibrio cholerae FRT») показали, что все холерные вибрионы, выделенные от людей и из объектов окружающей среды, относятся к виду V. cholerae (hlyA⁺) O1 серологической группы (wbeT⁺), геномы которых, за исключением штамма № 137, выделенного из морской воды в 2011 г., содержат гены токсигенности — ctxA и tcpA.

С целью определения изменений основных генов токсигенности в резуль-

тате эволюционных преобразований генома типичного токсигенного холерного вибриона Эль Тор в первый 30-летний период седьмой пандемии холеры с помощью экспериментальной ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* *ctxB-rstR-rstC*, РЭФ») изучена структура генов профагов CTX_{ϕ} и $RS1_{\phi}$ штаммов холерных вибрионов, выделенных в г. Мариуполь Донецкой области в 1994 и 2011 гг. (табл.).

Из представленных данных (табл.), следует, что у всех изучаемых штаммов (кроме № 137) в структуре профага CTX_{ϕ} присутствуют гены токсигенности как холерного вибриона Эль Тор, так и гены классического биовара в различных сочетаниях: $ctxB^{CL}$, $rstR^{CL}$, $rstR^{EL}$, $rstC$ (III генотип, штаммы № № 12, 43, 80, 551 — выделены в 1994 — 1995 гг.); $ctxB^{CL}$, $rstR^{EL}$, $rstC$ (IV генотип, штаммы № № 31, 39, 239 — выделены в 2011 г.); $ctxB^{CL}$, $rstR^{CL}$, $rstR^{EL}$ (VI генотип, штамм № 56 — выделен в 1994 г.). Следует отметить, что геном названных вариантов биовара Эль Тор обязательно содержит ген $ctxB^{CL}$, кодирующий биосинтез энтеротоксина классического типа (СТ1), в отличие от гена $ctxB^{EL}$ — типичного холерного вибриона биовара Эль Тор, кодирующего энтеротоксин типа Эль Тор (СТ2).

Генетическая структура профагов CTX_{ϕ} и $RS1_{\phi}$ штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор, выделенных от больных и из объектов окружающей среды в Мариуполе, с помощью ПЦР тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* *ctxB-rstR-rstC*, РЭФ»

Пробы ДНК, штамм, источник и дата выделения	Фрагменты генов					Результат
	$ctxB^{EL}$ 186 п.н.	$rstR^{EL}$ 501 п.н.	$rstC$ 224 п.н.	$ctxB^{CL}$ 186 п.н.	$rstR^{CL}$ 501 п.н.	Вариант (генотип)
ПКО + ДНК классического вибриона	—	—	—	+	+	Классический биовар (I)
ПКО + ДНК типичного Эль Тор	+	+	+	—	—	Типичный Эль Тор (II)
ДНК штамма № 43, больной, 28.09.1994	—	+	+	+	+	Гибрид (III)
ДНК штамма № 551, больной, 11.10.1994	—	+	+	+	+	Гибрид (III)
ДНК штамма № 80, больной, 05.10.1994	—	+	+	+	+	Гибрид (III)
ДНК штамма № 56, сточная вода инфекционной больницы, 04.10.1994	—	+	—	+	+	Гибрид (VI)
ДНК штамма № 12, больной, 29.05.1995	—	+	+	+	+	Гибрид (III)
ДНК штамма № 31, больной, 04.06.2011	—	+	+	+	—	Гибрид (IV)
ДНК штамма № 39, вода канала, 06.06.2011	—	+	+	+	—	Гибрид (IV)
ДНК штамма № 239, вода морская, 08.06.2011	—	+	+	+	—	Гибрид (IV)
ДНК штамма № 137, вода морская, 17.06.2011	—	+	+	—	—	Эль Тор атоксигенный (—)

Для определения происхождения генетически измененных штаммов холерных вибрионов Эль Тор, изолированных в Украине в 1994 и 2011 гг., и установления их филогенетических связей с ранее выделенными *V. cholerae* на других территориях проведено полногеномное секвенирование 4 штаммов данных микроорганизмов.

Геномные последовательности исследуемых штаммов депонированы в международную базу данных DDBJ/EMBL/GenBank: LJFF00000000 (*V. cholerae* 31, O1 biovar El Tor), LJFG00000000 (*V. cholerae* 39, O1 biovar El Tor), LJFH00000000 (*V. cholerae* 43, O1 biovar El Tor), LJFI00000000 (*V. cholerae* 56, O1 biovar El Tor).

Сравнение геномных последовательностей исследуемых штаммов с геномами штаммов *V. cholerae* из международной базы данных GenBank позволило установить наибольшее сходство штаммов *V. cholerae* 31, *V. cholerae* 39 и *V. cholerae* 56 со штаммом *V. cholerae* 2012EL-2176 (выделен на о. Гаити в 2012 г., обладает резистентностью к ампициллину, амоксициллину с клавулановой кислотой, цефокситину, цефтриаксону, цефтиофуру) и *V. cholerae* O395 (классический штамм O1, серотип Огава). Штамм *V. cholerae* 43 имеет сходство со штаммами *V. cholerae* MJ1236 (токсигенный штамм Эль Тор Инаба, выделен в Бангладеш в 1994 г.) и *V. cholerae* O395, выделенном в Индии в 1965 г.

Результаты проведенных исследований показали, что штаммы холерных вибрионов, идентифицированные в Украине в 1994 и 2011 гг. как типичный токсигенный биовар Эль Тор (*V. cholerae* O1, El Tor, Ogawa, Hly-, ctxA⁺, tcpA⁺), содержат в своем геноме гены классического холерного вибриона и потому являются генетически измененными (гибридными) вариантами холерного вибриона биовара Эль Тор, продуцирующими энтеротоксин СТ1, обладающими повышенной вирулентностью, что клинически выразилось в преобладании тяжелых форм течения холеры в Мариуполе Донецкой области в 2011 г.

Штаммы холерных вибрионов, выделенные в 1994 г. от людей, относятся к генотипу III, а выделенные из сточной воды инфекционного госпиталя — к генотипу VI, что свидетельствует о заносе различных клонов генетически измененных вариантов холерных вибрионов биовара Эль Тор на территорию Мариуполя. Генетически измененные холерные вибрионы биовара Эль Тор, выделенные в Мариуполе в 2011 г. от людей из объектов окружающей среды (вода канала, морская вода), относятся к одному и тому же генотипу IV, что подтверждает водный путь распространения холеры. На контактно-бытовой путь передачи пришлось 11% случаев заражений [4].

По результатам сравнения геномных последовательностей исследуемых штаммов с геномами штаммов *V. cholerae* из международной базы данных GenBank установлено, что исследуемые изоляты входят в клад штаммов, ассоциируемых со вспышками холеры на Гаити и на Азиатском континенте, откуда в 2010 г. генетически измененные штаммы холерных вибрионов биовара Эль Тор были завезены на Гаити [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеенко В.В. Социальные и биологические факторы эволюции эпидемического процесса при холере Эль Тор. Дис. д-ра мед. наук. Киев, 1985.
2. Алексеенко В.В. Распространение холеры в Украине в ходе семи пандемий. Профилактическая медицина. 2008, 2: 48-55.
3. Домашенко О.Н., Беломеря Т.А., Мартынова Н.В., Дараган Г.Н., Демкович О.О., Малахова Ю.В., Землянская Г.И., Попова Д.М. Холера в Приазовье. Журнал инфектологии, 2015, 7 (2): 92-97.

4. Кирьякова Л.С. Эпидемиологические и экологические особенности 7 пандемии холеры в Украине. Дисс. канд. мед. наук. Киев, 2007.
5. Стеценко И.И. Изучение процесса формирования эндемического очага холеры в Мариуполе. Профилактическая медицина. 2009, 2 (6): 37-42.
6. Хайтович О.Б., Шварсалон М.К., О.Л. Павленко О.Л., Зинич Л.С., Ильичев Ю.О., Денисенко В.И., Гусаков Г.М., Антонова Л.П. Вспышка холеры в Мариуполе в 2011 году. Инфекционные болезни. 2011, 1: 10-14.
7. Morita M., Ohnishi M., Arakava E. et al. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCA assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Microbiol. Immunol. 2008, 52: 314-317.
8. Nusrin S., Khan G.Y., Bhuiyan N.A. Diverse CTX phages among toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholera is endemic in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2004, 42 (12): 5854-5856.
9. Safa A., Bhuiyan N.A., Nursin S. et al. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor diotypes. J. Med. Microbiol. 2006, 55: 1563-1569.
10. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. Trends Microbiol. 2010, 18: 46-54.
11. Taneja N., Mishra A., Sangar G. et al. Outbreaks caused by new variant of *Vibrio cholerae* O1 eltor, India. Emerg. Infect. Dis. 2009, 15 (2): 352-354.
12. Waldor M.K., Rubin E.J., Gregori D.N. Regulation, replication, and integration functions of the CTX_φ are encoded by regions RS2. Mol. Microbiol. 1997, 24: 917-926.

Поступила 25.08.16

Контактная информация: Савельева Ирина Вилориевна,
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т (8652)26-48-19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Т.Ю.Загоскина, М.В.Чеснокова, В.Т.Климов, Ю.О.Попова, Е.Ю.Марков, О.А.Старикова

КОНСТРУИРОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ С НАНОЧАСТИЦАМИ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА И КИШЕЧНОГО ИЕРСИНИОЗА В ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗЕ

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Конструирование иммунологической тест-системы для обнаружения возбудителей энтеропатогенных иерсиний (*Yersinia pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) методом дот-иммуноанализа. *Материалы и методы.* В качестве маркера специфических антител использовали наночастицы коллоидного серебра размером 5 — 9 нм. IgG фракцию выделяли из коммерческих антисывороток к псевдотуберкулезным (O:1) и кишечной иерсиниозным (O:3 и O:9) микроорганизмам. Испытание полученной тест-системы проведено на 20 штаммах *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* (по десять каждого вида). *Результаты.* Дот-анализ имел специфический характер и обнаруживал энтеропатогенные иерсинии в концентрации $5 \cdot 10^5$ — $8 \cdot 10^6$ м.к./мл (100 — 1000 м.к. в пробе). При этом не наблюдалось перекрестного реагирования с гетерологичными исследованными микроорганизмами — *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis* EV. Показана возможность одновременного обнаружения и серотипирования *Y. enterocolitica*, что является обязательным для подтверждения их эпидемической значимости. *Заключение.* Разработанные тест-системы позволяют исследовать микрообъемы испытуемых проб (1 мкл), экспрессны (1,5 — 2 ч), высокочувствительны и специфичны, технически просты и не требуют использования дорогостоящего оборудования, специальной подготовки персонала, могут с успехом применяться в практическом здравоохранении в лабораториях разного уровня оснащенности.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 55—61

Ключевые слова: коллоидное серебро, агглютинирующие специфические сыворотки, дот-иммуноанализ, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*

T. Yu. Zagoskina, M. V. Chesnokova, V. T. Klimov, Yu. O. Popova, E. Yu. Markov, O. A. Starikova

CONSTRUCTION OF A TEST-SYSTEM WITH NANOPARTICLES OF COLLOID SILVER FOR DETECTION OF PSEUDOTUBERCULOSIS AND INTESTINAL YERSINIOSIS FOR CAUSATIVE AGENTS IN DOT-IMMUNOASSAY

Irkutsk Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Construction of an immunologic test-system for detection of causative agents of enteropathogenic yersinia (*Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*) by dot-immunoassay. **Materials and methods.** Nanoparticles of colloid silver sized 5 — 9 nm were used as a marker of specific antibodies. IgG fraction was isolated from commercial antisera to *Y. pseudotuberculosis* (O:1) and *Y. enterocolitica* (O:3 and O:9). Testing of the obtained test-system was carried out on 20 strains of *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* (10 of each species). **Results.** Dot-analysis had a specific character and detected enteropathogenic yersinia at a level of $5 \cdot 10^5$ — $8 \cdot 10^6$ CFU/ml (100 — 1000 CFU in sample). Wherein cross-reaction with heterologic studied microorganisms — *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis* EV — was not observed. A possibility of simultaneous detection and serotyping of *Y. enterocolitica* is shown, that is necessary for confirmation of their epidemic significance. **Conclusion.** The developed test-systems allow to study micro volumes of the samples under study (1 μ l), are express (1.5 — 2 h), highly sensitive and specific, technically simple and do not require the use of high-cost equipment, special training of the staff, may be successfully used in practical healthcare in laboratories with varying equipment levels.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 55—61

Key words: colloid silver, agglutinating specific sera, dot-immunoassay, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время около 70% всех регистрируемых болезней человека имеют инфекционную этиологию. Контроль за распространением инфекций в мире актуален в условиях современных темпов и масштабов миграции населения. Псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз относятся к эмерджентным (emergency) пищевым зоонозам, эпидемические проявления которых возникают внезапно, без видимых предвестников. По социально-экономической значимости, частоте распространения энтеропатогенные иерсинии в Европейском союзе занимают третье место после возбудителей сальмонеллеза и кампилобактериоза. В Российской Федерации псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз регистрируются практически повсеместно в виде спорадической и вспышечной заболеваемости, при этом наиболее высокие показатели характерны для сибирского, дальневосточного и северо-западного федеральных округов [7]. Возникновение массовых эпидемических осложнений этих инфекционных болезней возможно и при стихийных бедствиях и катастрофах в местах размещения пострадавшего населения, ввиду увеличения численности грызунов и появления среди них эпизоотий, что приводит к контаминации возбудителем воды и пищевых продуктов. Важнейшей предпосылкой эффективности мероприятий, проводимых при возникновении эпидемических очагов, является своевременное обнаружение патогенных биологических агентов, что требует быстрой и достоверной диагностики. В этом плане методы, направленные на детекцию специфических антигенов

возбудителя как при исследовании клинического материала от больных, так и проб из объектов окружающей среды (пищевые продукты, вода, смывы и др.) являются наиболее перспективными.

В 80 — 90-е годы в Российской Федерации проводились широкие научные исследования по разработке и апробации ряда диагностических тест-систем: гемагглютинационных (РНГА, РТНГА), агглютинационных (реакции коаггутинации и латекс-агглютинации), твердофазных иммунохимических (ИФА) [1, 8, 10 — 13]. Несмотря на эффективные диагностические возможности разработанные ранее в экспериментальных условиях иммунологические методы в практике лабораторной службы не получили широкого распространения ввиду сложности постановки большинства реакций, нестабильности выпускаемых серий препаратов, отсутствия сертифицированных тест-систем. Кроме этого, не все учреждения здравоохранения имеют техническую базу для выполнения сложных анализов, большинство из них нуждается в оснащении надежными, простыми, недорогими диагностическими тестами, не требующими использования сложной аппаратуры для постановки анализа и учета результатов, специальной подготовки персонала. Одним из широко распространенных экспресс-методов обнаружения патогенных микроорганизмов и диагностики вызываемых ими заболеваний является дот-иммуноанализ (ДИА). Достаточно высокие специфичность и чувствительность, простота постановки, миниатюризация, экспрессность, отсутствие потребности в ридерах и других дорогостоящих приборах делают ДИА перспективным при индикации возбудителей опасных инфекционных болезней [2], особенно в режиме чрезвычайных ситуаций. Наиболее привлекательным представляется использование в ДИА в качестве маркеров иммунных реагентов золь тяжелых металлов, в частности, серебра, которые способны при накоплении на поверхности матрицы создавать визуально различимую окраску.

Цель исследования — конструирование тест-систем для дот-иммуноанализа с использованием наночастиц коллоидного серебра в качестве маркера специфических антител для обнаружения корпускулярных антигенов *Yersinia pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, пригодных как для скрининга исследуемого материала в период эпидемиологического неблагополучия, так и выполнения индивидуальных анализов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При конструировании соответствующих диагностических тест-систем для дот-иммуноанализа использованы специфические антитела, источником которых служили коммерческие агглютинирующие псевдотуберкулезные и кишечной синеозные O:3 и O:9 серовариантов не адсорбированные сыворотки производства Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток с титром антител 1:3200 — 1:6400, полученные против липополисахаридного антигена возбудителей и традиционно применяемые в реакции агглютинации. Выделение IgG фракций из указанных сывороток осуществляли комбинированным методом с использованием каприловой кислоты и сульфата аммония [14]. Золь серебра готовили восстановлением из раствора азотнокислого серебра боргидридом натрия. Для этого к 0,05% водного раствора боргидрида натрия одномоментно приливали равный объем 0,02% водного раствора азотнокислого серебра. Все манипуляции приводили при постоянном встряхивании [4]. Формирующийся золь коллоидного серебра первоначально имел соломенно-желтый цвет, который в процессе созревания менялся на светло-коричневый. Размер частиц золя составлял 5 — 9 нм. После коррекции pH

золь серебра насыщали растворами соответствующих IgG, предварительно осветленных центрифугированием при 12 000 g в течение 5 мин для осаждения присутствующих в препаратах агрегатов и денатурированных молекул иммуноглобулинов, имеющих большое количество гидрофобных участков на поверхности и способных негативно влиять на качество получаемых диагностикомов [2, 4]. Стабилизатором биозондов являлся раствор, содержащий бычий сывороточный альбумин, полиэтиленгликоль, хлорид и азид натрия [5].

Постановку дот-иммуноанализа осуществляли традиционным способом, предполагающим адсорбцию исследуемого материала, содержащего корпускулярные антигены *Yersinia pseudotuberculosis* (штаммы 45, 47, 57, 59, 61, 65, 71, 74, 66, 44) и *Y. enterocolitica* серовариантов O:3 и O:9 (штаммы 1731, 1188, 1190, 157 — 162, 1189, 91, 8, 1659, 378, 880) из рабочей коллекции отдела эпидемиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института, на нитроцеллюлозной мембране, блокирование свободных сайтов связывания раствором 1 % казеината натрия. Детекцию адсорбированных на твердой фазе антигенов осуществляли с помощью соответствующих IgG, меченных наночастицами коллоидного металла. Визуализацию результатов реакции проводили погружением мембран в раствор проявителя, состоящего из метола, лимонной кислоты и азотнокислого серебра, с последующим промыванием ее проточной водой. Общее время проведения анализа ~2 ч. Пробы, содержащие искомые антигены, выявлялись в виде темно-серых пятен. В отрицательных контролях окрашивания не развивалось [2 — 6, 9].

Для проверки специфичности разработанных тест-систем использовали штаммы *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis* EV в концентрациях 10^7 , 10^8 м.к./мл, инактивированные кипячением на водяной бане в течение 20 мин.

Обнаружение энтеропатогенных иерсиний проводили с использованием 10 различных штаммов *Y. pseudotuberculosis* (45, 47, 57, 59, 61, 65, 71, 74, 66, 44) и 10 штаммов *Y. enterocolitica* серовариантов O:3 и O:9 (1731, 1188, 1190, 157 — 162, 1189, 91, 8, 1659, 378, 880), инактивированных кипячением на водяной бане в течение 20 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов установлено, что все взятые в работу штаммы *Y. pseudotuberculosis* уверенно обнаруживались в дот-иммуноанализе с применением специфических антител, меченных наночастицами коллоидного серебра, но в разных концентрациях (рис. 1). Поскольку используемые для конструирования тест-системы коммерческие псевдотуберкулезные сыворотки были получены против поверхностных структур бактериальной клетки определенных штаммов возбудителя, это, вероятно, сказалось на различиях в минимальной определяемой концентрации пато-

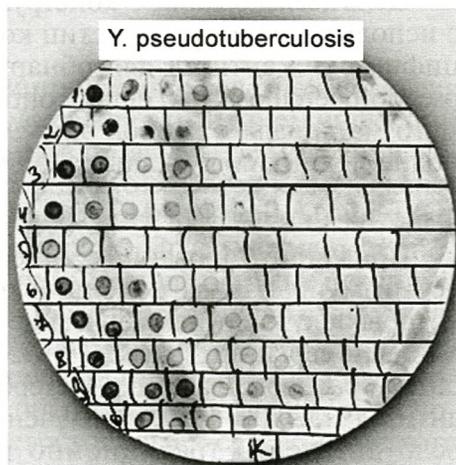


Рис. 1. Дот-анализ для определения *Y. pseudotuberculosis*.

По горизонтали — штаммы *Y. pseudotuberculosis*: 1 — 45, 2 — 47, 3 — 57, 4 — 59, 5 — 61, 6 — 65, 7 — 71, 8 — 74, 9 — 66, 10 — 44. По вертикали — разведения антигена: 10^8 , $5 \cdot 10^7$, $2,5 \cdot 10^7$, $1,6 \cdot 10^7$, $8 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^6$, 10^6 , $5 \cdot 10^5$, $2,5 \cdot 10^5$, $1,25 \cdot 10^5$ м.к./мл.

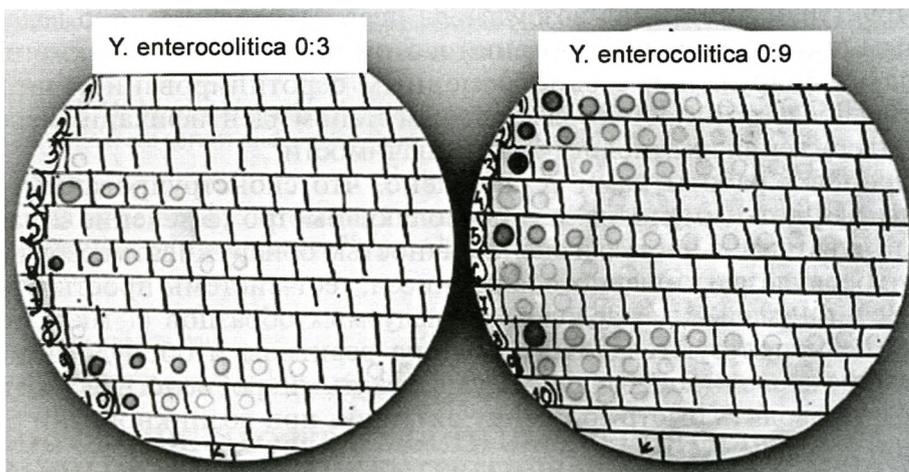


Рис. 2. Дот- анализ для определения и серотипирования *Y. enterocolitica* O:3 и *Y. enterocolitica* O:9.

По горизонтали — штаммы *Y. enterocolitica* (слева — обнаружение *Y. enterocolitica* O:3, справа — обнаружение *Y. enterocolitica* O:9): 1 — 1731; 2 — 1188; 3 — 1190; 4 — 157/162; 5 — 1189; 6 — 91; 7 — 8; 8 — 1659; 9 — 378; 10 — 880. По вертикали — разведения антигена: 10^8 , $5 \cdot 10^7$, $2,5 \cdot 10^7$, $1,6 \cdot 10^7$, $8 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^6$, 10^6 , $5 \cdot 10^5$, $2,5 \cdot 10^5$, $1,25 \cdot 10^5$ м.к./мл.

гена каждого исследуемого штамма и указывало на различный количественный и/или качественный состав отдельных структурных макромолекул поверхностных антигенов исследуемых штаммов возбудителя (преимущественно, ЛПС). Так, в дот-иммуноанализе обнаруживались штаммы *Y. pseudotuberculosis* в следующих концентрациях: 45 — 10^6 м.к./мл, 47 — $8 \cdot 10^6$, 57 — $5 \cdot 10^5$, 59 — $8 \cdot 10^6$, 61 — $1,6 \cdot 10^7$, 65 — $8 \cdot 10^6$, 71 — $4 \cdot 10^6$, 74 — $2 \cdot 10^6$, 66 — 10^6 , 44 — $8 \cdot 10^6$. При этом не наблюдалось перекрестного реагирования с гетерологичными исследованными микроорганизмами — *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *Y. pestis* EV.

В разработанных тест-системах для дот-иммуноанализа с использованием специфических кишечной иерсиниозных O:3 и O:9 иммуноглобулинов, меченых наночастицами коллоидного серебра, исследовано 10 штаммов *Y. enterocolitica* обоих серовариантов (рис. 2). В дот-иммуноанализе с использованием IgG из кишечной иерсиниозных сывороток серовара O:3 положительные результаты получены только со штаммами *Y. enterocolitica* O:3 сероварианта: 1731 — отр.; 1188 — отр.; 1190 — отр.; 157/162 — $8 \cdot 10^6$ м.к./мл; 1189 — отр.; 91 — $2 \cdot 10^6$ м.к./мл; 8 — отр.; 1659 — отр.; 378 — 10^6 м.к./мл; 880 — $8 \cdot 10^6$ м.к./мл. Штаммы серовариантов O:9 в данной тест-системе не обнаруживались, что указывает на возможность серотипирования штаммов *Y. enterocolitica* в предлагаемом варианте дот-иммуноанализа.

При использовании IgG из кишечной иерсиниозных сывороток серовара O:9 указанные корпускулярные антигены обнаруживались только в штаммах *Y. enterocolitica* O:9 сероварианта: 1731 — $2 \cdot 10^6$ м.к./мл; 1188 — $2 \cdot 10^6$; 1190 — $2 \cdot 10^6$; 157/162 — $5 \cdot 10^7$ (слабо положительный); 1189 — $2 \cdot 10^6$ м.к./мл; 91 — отр.; 8 — $2,5 \cdot 10^7$ м.к./мл; 1659 — 10^6 ; 378 — $5 \cdot 10^7$ (слабо положительный); 880 — $2,5 \cdot 10^7$ м.к./мл (слабо положительный).

Полученные результаты указывают на высокую чувствительность и специфичность разработанных тест-систем для дот-иммуноанализа энтеропатогенных иерсиний, на возможность в сравнительном аспекте определения количественных и/или качественных различий по поверхностным антиген-

ным структурам у штаммов возбудителя псевдотуберкулеза, что делает актуальным продолжение исследований в этом направлении, а также на возможность обнаружения с одновременным серотипированием штаммов *Y. enterocolitica*, что является обязательным этапом идентификации иерсиний для подтверждения их этиологической значимости.

В процессе работы нами установлено, что сконструированные тест-системы для дот-иммуноанализа позволяют быстро (в течение 2 часов) с высокой чувствительностью и специфичностью обнаруживать возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, тест-системы просты в исполнении, с минимальным расходом исследуемых образцов (1 мкл), экономичны (не используются дорогостоящие реактивы и оборудование), их применение позволит оперативно осуществлять микробиологический мониторинг и проводить быструю оценку ситуации при возникновении биологической угрозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бургасова О.А., Куляшова Л.Б., Ценева Г.Я. Сравнительная оценка различных иммунологических реакций в динамике псевдотуберкулеза. Журн. микробиол. 1996, 2: 48-51.
2. Загоскина Т.Ю., Балахонов С.В., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Субычева Е.Н., Чапоргина Е.А., Михайлов Е.П., Бодрых О.Б., Попова Ю.О. Апробация диагностических тест-систем с использованием наночастиц серебра в качестве маркеров специфических антител для скрининга исследуемого материала на наличие антигенов возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии и ботулотоксина в дот-иммуноанализе. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 4: 61-64.
3. Загоскина Т.Ю., Балахонов С.В., Чапоргина Е.А., Марков Е.Ю., Гаврилова О.В., Бодрых О.Б., Долгова Т.М., Тайкова Т.С., Иванова Т.А., Попова Ю.О., Корнева А.В. Сравнительная оценка методов детекции ботулотоксина в клиническом материале от больных людей. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 4: 65-68.
4. Загоскина Т.Ю., Калиновский А.И., Марков Е.Ю., Докорина А.А., Голубинский Е.П. Использование специфических антител, меченных частицами коллоидного серебра, для выявления антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализа. Клин. лаб. диагностика. 2002, 6: 38-39.
5. Загоскина Т.Ю., Марков Ю.Е., Калиновский А.И., Голубинский Е.П. Обнаружение антигенов бруцелл с помощью частиц коллоидных металлов в качестве маркеров специфических антител. Журн. микробиол. 2001, 3: 65-69.
6. Загоскина Т.Ю., Чапоргина Е.А., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Соловьев С.Ю., Андреевская Н.М., Балахонов С.В. Совершенствование тест-системы для скрининга материала на ботулотоксин в дот-иммуноанализе. Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2015, 1 (101): 60-62.
7. Иерсинии и иерсиниозы. Г.Я. Ценева (ред.). СПб, Медмассмедиа, 2006.
8. Куляшова Л.Б., Ценева Г.Я., Буйневич Ю.Б. Роль антигенов наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* в патогенезе и диагностике псевдотуберкулеза. Журн. микробиол. 1997, 1: 14-18.
9. Носкова О.А., Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Гриднева Л.Г., Михайлов Е.П. Применение дот-иммуноанализа для выявления антигенов чумного микроба в полевом материале. Проблемы ООИ. 2014, 3: 69-71.
10. Смирнова Е.Ю. Совершенствование лабораторного обеспечения системы эпидемиологического надзора за иерсиниозами: Автореф. дис. канд. мед. наук. СПб, 2003.
11. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина, 2001.
12. Ценева Г.Я., Куляшова Л.Б., Белая Ю.А., Быстрова С.М. Применение псевдотуберкулезного коагулинирующего антительного диагностикума в лабораторной практике. Лаб. дело. 1995, 2: 111-113.

13. Шпилюк Г.Ф., Головешкина Т.Н., Володина И.К. и др. Иммуноглобулиновые латексные препараты для экспресс диагностики иерсиниозов. Журн. микробиол. 1993, 6: 92-93.
14. McKinney M. M., Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. J. Immunol. Meth. 1987, 96 (2): 271-278.

Поступила 15.06.16

Контактная информация: Загоскина Татьяна Юрьевна, д.м.н.,
664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р.т. (3952)22-01-39

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Ф.Н.Шубин¹, А.В.Раков¹, Н.А.Кузнецова¹, Т.В.Якубич², И.П.Снеткова³

ФОРМИРОВАНИЕ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НАСЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛЕЗОМ, ВЫЗВАННЫМ SALMONELLA ENTERITIDIS, В РАЙОНАХ С НЕПОЛНЫМ ОБЕСПЕЧЕНИЕМ НАСЕЛЕНИЯ МЕСТНОЙ ПРОДУКЦИЕЙ ПТИЦЕВОДСТВА

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии, Владивосток; ²Центр гигиены и эпидемиологии в Сахалинской области, Южно-Сахалинск; ³Центр гигиены и эпидемиологии в Еврейской АО, Биробиджан

Цель. Изучение плазмидных характеристик штаммов *S. enteritidis* у больных и особенностей эпидемиологии инфекции в областях с неполным обеспечением населения местной продукцией птицеводства. *Материалы и методы.* Выполнен плазмидный анализ штаммов микроба, выделенных от 382 больных и из 8 проб продуктов, и оценена значимость плазмидных типов в заболеваемости населения. Идентификацию сальмонелл проводили общепринятыми методами, определение спектра плазмид — по методу Kado C.I. и Liu S.T. (1981). *Результаты.* 98,4% штаммов содержали плазмиду вирулентности р38, а 80,1% штаммов вместе с ней имели мелкие плазмиды. Сахалинские штаммы разделены на 16 плазмидных типов ($D=0,794$), а штаммы из Еврейской АО — на 10 ($D=0,834$). Выявлена однотипность штаммов у больных при вспышках инфекции и в факторах передачи. *Заключение.* Особенности сальмонеллеза в изучаемых субъектах РФ определяются повышенным риском завоза продуктов, содержащих сальмонеллы. Мониторинг на основе плазмидного анализа является эффективной базой эпидемиологического надзора.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 61—67

Ключевые слова: сальмонеллез, *Salmonella enteritidis*, плазмидные типы, местная и завозная заболеваемость

F.N.Shubin¹, A.V.Rakov¹, N.A.Kuznetsova¹, T.V.Yakubich², I.P.Snetkova³

FORMATION OF POPULATION MORBIDITY WITH SALMONELLOSIS CAUSED BY SALMONELLA ENTERITIDIS IN REGIONS WITH INCOMPLETE SUPPLY OF LOCAL POULTRY PRODUCTS

¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok; ²Centre of Hygiene and Epidemiology in Sakhalin Region, Yuzhno-Sakhalinsk; ³Centre of Hygiene and Epidemiology, in Jewish AR, Birobidzhan, Russia

Aim. Study plasmid characteristics of *S. enteritidis* strains in patients and features of epidemiology of the infection in regions with incomplete supply of population with local poultry production. *Materials and methods.* Plasmid analysis of microbe strains isolated from 382 patients and 8 samples of products was carried out, and significance of plasmid types in population morbidity was evaluated. Identification of salmonella was carried out by conventional methods, plasmid

specter — by Kado C.I. and Liu S.T. (1981) method. *Results.* 98.4% of strains contained virulence plasmid p38, and 80.1% of strains also had small plasmids. Sakhalin strains were divided into 16 plasmid types ($D=0.794$), and strains from Jewish AO — 10 ($D=0.834$). Uniformity of strains in patients during infection outbreaks and in transmission factors was detected. *Conclusion.* Features of salmonellosis in the studied subjects of Russian Federation are determined by higher risk of import of products containing salmonella. Monitoring based on plasmid analysis is an effective base for epidemiologic control.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 61—67

Key words: salmonellosis, *Salmonella enteritidis*, plasmid types, local and imported morbidity

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (*S. enteritidis*) занимает ведущее место в этиологии сальмонеллеза в России и во многих странах мира [1, 10]. Общим для формирования заболеваемости сальмонеллезом, вызванным *S. enteritidis*, является ее связь с употреблением в пищу продуктов птицеводства [1, 4]. В силу актуальности проблемы исследования по молекулярной характеристике популяций сальмонелл, и в частности *S. enteritidis*, широко выполняются во многих странах мира. Разработка и внедрение в Приморском крае централизованного микробиологического мониторинга за сальмонеллами, выделяемыми от больных людей и из пищевых продуктов, основанного на данных плазмидного типирования микроба, позволило дифференцировать в популяции *S. enteritidis* плазмидные типы и выяснить степень ее гетерогенности [2]. Несмотря на то, что снабжение края продукцией птицеводства осуществляется в основном местными птицефабриками, популяция микроба включает местную и завозную ее части, но первая из них — основа для формирования доминирующих в этиологии типов микроба.

Однако в России имеются субъекты федерации с частичным обеспечением населения местной продукцией птицеводства или местное производство отсутствует. Можно полагать, что эпидемический процесс сальмонеллеза на этих территориях будет иметь свои особенности. Для решения данного вопроса выбраны Сахалинская область и Еврейская автономная область.

Цель работы — изучение плазмидных характеристик штаммов *S. enteritidis* у больных и особенностей эпидемиологии инфекции в областях с неполным обеспечением населения местной продукцией птицеводства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе централизованного микробиологического мониторинга за сальмонеллами исследованы штаммы *S. enteritidis*, выделенные в 2011 — 2013 гг. от 231 больного и из двух проб куриной продукции в Сахалинской области, и от 151 больного и из 6 проб продуктов, изолированных в период с 2007 по 2015 гг. в Еврейской АО. Идентификацию сальмонелл проводили общепринятыми методами. Определение спектра плазмид выполнено у свежевыделенных штаммов микроба по методу C.I. Kado и S.T. Liu [7]. Электрофоретическое разделение плазмидных ДНК, их визуализацию и определение молекулярной массы проводили, как описано ранее [2]. При анализе заболеваемости населения оценивали удельный вес (в %) больных, выделенные от которых штаммы исследовали в плазмидном анализе, от общего количества заболевших сальмонеллезом в определенный период, а также удельный вес больных, от

которых был выделен микроб различных плазмидных типов. На основе этих данных вычисляли расчетную заболеваемость для каждого плазмидного типа в показателях на 100 000 населения. Небольшое число больных, штаммы которых типированы методом плазмидного анализа, при спорадической заболеваемости населения в 2011 г. в Сахалинской области и на протяжении всех лет наблюдений в Еврейской АО не позволило оценить этиологическую и эпидемическую значимость отдельных плазмидных типов микроба в заболеваемости населения. Выполненные ранее расчеты [2] показали, что репрезентативные данные могут быть получены при изучении штаммов микроба, выделенных не менее чем у 50% заболевших. Поэтому приводятся данные лишь о частоте выявления плазмидных типов в выборках *S. enteritidis*. Напротив, в 2012 г. и за 7 месяцев 2013 г. в Сахалинской области исследованы штаммы *S. enteritidis*, выделенные от 89 и 116 больных, что составило 52,4 и 57,9% от числа зарегистрированных. Следовательно, появилась возможность оценить значимость каждого из плазмидных типов микроба в формировании заболеваемости населения. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента. Индекс биоразнообразия Симпсона (D) рассчитан по методике P.R.Hunter и M.A.Gaston [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение плазмидной характеристики штаммов *S. enteritidis*, выделенных от 231 больного, показало, что плазмиды отсутствовали лишь у 2 (0,9±0,4%) штаммов микроба. Штаммы микроба, содержащие одну плазмиду массой 38 MDa, составили 14,8±2,4%. Соответственно остальные штаммы *S. enteritidis* (84,6±2,4%) содержали 2 — 3 плазмиды, что позволило их дифференцировать на 14 плазмидных типов. В соответствии с частотой выделения штаммов среди плазмидных типов *S. enteritidis* дифференцированы основные и редко выявляемые. В Сахалинской области основными плазмидными типами являются 38:30:2,3; 38:30; 38:2,3; 38; 38:1,4; 38:2,6:1,4; 38:26:1,4; 38:4,4 и 38:30:1,4 MDa, с которыми в 2012 — 2013 гг. связано 96,4±1,3% заболеваемости. Наиболее часто у больных выявляли штаммы микроба плазмидного типа 38:1,4 MDa, на долю которого пришлось 100 (43,3±3,2%) больных. Вторыми по частоте выявления были штаммы *S. enteritidis* плазмидных типов 38:30:2,3; 38 и 38:30 MDa соответственно у 50 (21,6±2,7%), 33 (14,3±2,3%) и 24 (10,4±2,0%) больных. Годовые различия значимости в этиологии сальмонеллеза в 2012 — 2013 гг. выявлены у двух плазмидных типов. Штаммы плазмидного типа 38:1,4 MDa достоверно чаще выявляли у больных в 2013 г. ($p < 0,05$), а штаммы плазмидного типа 38:30:2,3 MDa — в 2012 г. ($p < 0,05$). Семь редко выявляемых типов *S. enteritidis* не играли роли в формировании заболеваемости населения. Кроме того, изучены плазмидные характеристики двух штаммов *S. enteritidis*, выделенных в августе 2012 г. и в марте 2013 г. из проб бройлерного мяса, завезенного из западного субъекта России. Оба штамма относились к плазмидному типу 38:1,4 MDa.

Плазмидные типы *S. enteritidis* дифференцированы по происхождению на местные и завозные. К завозным отнесены 6 основных плазмидных типов. Штаммы плазмидного типа 38:1,4 MDa наиболее часто изолировали от больных, и к этому же типу относятся оба штамма, выделенные из завезенной в область бройлерной продукции. Также завозную природу имеют штаммы плазмидного типа 38 MDa, для которых характерно нерегулярное выделение от больных, и штаммы типов 38:2,6:1,4; 38:26:1,4; 38:4,4 и 38:30:1,4 MDa, что согласуется с их низкой этиологической значимостью. Плазмидные типы

38:30:2,3; 38:30 и 38:2,3 MDa отнесены к местным для области типам и они ежегодно играют существенную роль в этиологии сальмонеллеза. Внутригодовая динамика заболеваемости населения, обусловленная различными по происхождению плазмидными типами, показала, что в течение 2012 г. штаммы местных и завозных типов были ежемесячно представлены в заболеваемости населения, за исключением марта, когда в ее формировании участвовали местные типы, и апреля, когда от больных выделены завозные типы микроба. При этом значимость обеих категорий типов микроба в формировании заболеваемости ежемесячно варьировала.

Характер заболеваемости сальмонеллезом, вызванным *S. enteritidis*, в 2013 г. отличался от таковой в 2012 г. В январе и феврале 2013 г. в сравнении с этим же периодом 2012 г. имел место почти шестикратный рост заболеваемости населения, и 93,6% ее было зарегистрировано в Южно-Сахалинске. Вторая особенность состояла в том, что заболеваемость в основном регистрировалась среди детей в детских дошкольных учреждениях (83% заболевших). Первый случай сальмонеллеза зарегистрирован 13 января. В январе и феврале случаи сальмонеллеза выявлены в 18 детских учреждениях, из них в восьми учреждениях выявлено по 1 случаю, в пяти — по 2 — 4 случая, в трех — по 5 — 8 случаев и лишь в двух — по 12 и 14 случаев заболевания. При этом в феврале заболевания выявлялись почти ежедневно: в течение 11 дней — по 1 — 2 случая и 10 дней — по 3 — 5 случаев в разных учреждениях и в разных детских группах. Типичные вспышки сальмонеллеза пищевого происхождения в отдельных детских учреждениях не выявлены.

Плазмидный анализ штаммов *S. enteritidis*, выделенных в январе и феврале от 44 больных и дополнительно в марте от 13 больных и из одной пробы мяса цыплят бройлеров, поставляемого в детские дошкольные учреждения одним предприятием торговли, показал принадлежность их к плазмидному типу 38:1,4 MDa. Прекращение реализации продукта, контаминированного *S. enteritidis*, привело к прекращению заболеваемости детей. В апреле 2013 г. заболеваемость населения в области значительно снизилась, и случаи сальмонеллеза уже были обусловлены двумя завозными плазмидными типами микроба (38:1,4 и 38:2,6:1,4 MDa) при значительном доминировании первого из них. Начиная с мая, в формировании заболеваемости населения области стали принимать участие местные и завозные плазмидные типы *S. enteritidis*.

Штаммы *S. enteritidis*, изолированные от больных в Еврейской АО, были разделены на 2 группы: выделенные при спорадической заболеваемости (74 больных) и во время вспышек болезни (77 больных). Штаммы первой группы разделены на 10 плазмидных типов. Штаммы микроба, не содержащие плазмид, составили 5,4%, а содержащие только плазмиду 38 MDa — 18,9%. Остальные штаммы (75,7%), имеющие по 2 — 3 плазмиды, были дифференцированы на 8 плазмидных типов микроба. Часто выявляемыми были 4 плазмидных типа, но доминирующий тип среди них отсутствовал. В декабре 2012 г. из одной партии завезенных продуктов изолирован штамм *S. enteritidis* плазмидного типа 38:1,4 MDa, который нашел отражение в спорадической заболеваемости населения.

За период наблюдения имели место 2 вспышки сальмонеллеза: первая в июне 2007 г. охватила 70 жителей Биробиджана, вспышка носила пищевой характер, и фактором передачи послужили пирожные эклеры, в которые входили куриные яйца. Изучены штаммы *S. enteritidis*, выделенные от 39 больных и из 5 проб продуктов, включая пирожные эклеры. Все они относились к плазмидному типу 38:30:2,3 MDa. Причина вспышки связана с завозными

яйцами, контаминированными сальмонеллами, а также с нарушениями санитарно-противоэпидемического режима на предприятии.

Вторая вспышка сальмонеллеза возникла в ноябре 2015 г. в детском дошкольном учреждении и охватила 39 детей и двух сотрудников. Изучены штаммы *S. enteritidis*, выделенные от 36 детей и обоих сотрудников. Все они относились к плазмидному типу 38:3,0:1,4 MDa. Вспышка носила также пищевой характер. Особенность вспышки состояла в том, что первичная версия ее причины предполагала контаминацию микробом, при котором в качестве фактора передачи предполагался повар детского учреждения — носитель *S. enteritidis*. Однако анализ штаммов показал, что заболевания у детей вызвал плазмидный тип 38:3,0:1,4 MDa, а у повара выявлен микроб плазмидного типа 38 MDa. Эти данные указывали на существование разных источников инфицирования детей и повара, что нашло подтверждение при анализе спорадической заболеваемости населения. В разных районах области выявлены больные, у которых был выделен микроб плазмидных типов 38 MDa или 38:3,0:1,4 MDa. Согласно новой версии факторами передачи явились куриные яйца, использованные при изготовлении салатов, и весьма вероятно, что они же явились причиной болезни у спорадических больных.

ОБСУЖДЕНИЕ

В России обеспеченность населения субъектов РФ местной продукцией птицеводства варьирует от полной до ее отсутствия. Недостаток ее восполняется завозом из других регионов. Отсутствие в Сахалинской области производства мяса бройлеров восполнялось завозом его в январе—феврале 2013 г. из 9 птицефабрик шести субъектов РФ. Причем из продукции трех птицефабрик ранее выделяли штаммы *S. enteritidis* плазмидного типа 38:1,4 MDa. Такие поставки увеличивают риск завоза продукции, контаминированной сальмонеллами, ведут к подъему заболеваемости населения, причины которой трудно раскрыть традиционными методами. Эти же особенности отражаются и на многолетней динамике заболеваемости, для которой характерны резкие колебания ее показателей, в Сахалинской области только за 3 года — в 2,5 раза. В Еврейской АО максимальный показатель заболеваемости составил 115,0 в 2007 г., а минимальный (15,6) в 2011 г. при колебании годовых показателей в 3 — 4 раза.

Для субтипирования *S. enteritidis* разработаны генетические методы, основанные на исследовании плазмидной и хромосомной ДНК [5]. Выбор плазмидного анализа определялся тем, что данный метод характеризуется высокой дифференцирующей способностью и хорошей воспроизводимостью результатов [2], а присутствие в штаммах низкомолекулярных плазмид повышает дифференцирующую способность метода [8, 9]. В нашем исследовании основные плазмидные типы *S. enteritidis* в Сахалинской области и Еврейской АО сформированы следующими типами маркерных плазмид и их примерной молекулярной массой: p38 (57 kb), p30 (47,9 kb), p26 (42,4 kb), p4,4 (6,8 kb), p3,0 (4,6 kb), p2,6 (4,0 kb), p2,3 (3,6 kb) и p1,4 (2,1 kb). Плазмида p38 является плазмидой вирулентности, и она выявлена у 99,1% штаммов в Сахалинской области и у 97,4% штаммов в Еврейской АО. Доля штаммов микроба, у которых выявлено по 2-3 плазмиды и которые могли быть подвержены дальнейшей дифференциации, составила в Сахалинской области 84,9%, а в Еврейской АО — 75,7%. Важным для дифференцирующей способности плазмидного анализа явилось и то, что 73,6% штаммов микроба из Сахалинской области и 74,3% штаммов из Еврейской АО содержали 5 типов низкомолекулярных плазмид.

Степень гетерогенности популяций микроба по плазмидным характеристикам у больных, представленная индексом биоразнообразия Симпсона, в Еврейской АО за весь период наблюдения оказалась выше ($D=0,834$), чем в Сахалинской области ($D=0,794$). При этом индекс Симпсона, рассчитанный для штаммов, изолированных в 2011 — 2013 гг. в Сахалинской области, оставался высоким и отличался незначительно по годам. Для сравнения, в Приморском крае в течение 2010 — 2013 гг. индекс биоразнообразия Симпсона был ниже ($D=0,671$), поскольку 3 местных плазмидных типа микроба формировали свыше 80% всей заболеваемости населения.

Гетерогенность по плазмидным характеристикам свойственна популяциям *S. enteritidis* и в других странах [8, 11]. Однако как и в России [2], во всех странах выделяются 1 — 2 доминирующих плазмидных типа. В Сибирско-Дальневосточном регионе доминирующий плазмидный тип микроба выявлен во всех субъектах федерации, где население обеспечено местной продукцией птицеводства [3]. Среди исследованных нами штаммов *S. enteritidis* отсутствует доминирующий плазмидный тип микроба. Весьма вероятно, что отсутствие доминирующего плазмидного типа как особенность эпидемиологии сальмонеллеза, вызванного *S. enteritidis*, свойственна большинству субъектов Российской Федерации, где имеет место неполное обеспечение населения продукцией птицеводства, что определяется большим числом ее поставщиков.

Заболеваемость сальмонеллезом в детских учреждениях Южно-Сахалинска в январе—феврале 2013 г. по существу являлась вспышкой болезни, где общим фактором передачи служило завозное мясо цыплят бройлеров одной птицефабрики. Такими же по происхождению были и обе вспышки в Еврейской АО, возникновение которых также было связано с завозной продукцией. В данном случае плазмидный анализ штаммов *S. enteritidis* позволил дифференцировать вспышки между собой и доказать соответствие плазмидных типов микроба, выделенных из предполагаемых факторов передачи и у больных.

Таким образом, формирование заболеваемости сальмонеллезом, вызванным *S. enteritidis*, в регионах с неполным обеспечением населения местной продукцией птицеводства имеет свои особенности, и применение микробиологического молекулярно-генетического мониторинга на основе плазмидного типирования изолятов приобретает особую значимость для решения прикладных вопросов эпидемиологии и профилактики сальмонеллеза. Среди них следует выделить: возможность оценки значимости основных плазмидных типов микроба в формировании спорадической и эпидемической заболеваемости населения, дифференциацию местной и завозной заболеваемости, выявление источников и факторов передачи инфекции, установление или исключение эпидемиологических связей между случаями болезни, расшифровку вспышек сальмонеллеза. В таком виде микробиологический мониторинг действительно является информационной базой эпидемиологического надзора, позволяющей конструктивно влиять на эффективность проводимых мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Черкасский Б.А., Рожнова С.Ш., Христюхина О.А., Соловьева Н.К. Современные особенности эпидемического процесса сальмонеллезом в СССР. Журн. микробиол. 1991, 1: 32-36.
2. Шубин Ф.Н., Раков А.В., Кузнецова Н.А., Маслов Д.В., Ананьев В.Ю. Структура популяции *Salmonella enteritidis* в Приморском крае по данным плазмидного анализа. Журн. микробиол. 2006, 3 (Прил.): 28-32.

3. Шубин Ф.Н. Зоонозный сальмонеллез в России: основные аспекты проблемы. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015, 1: 28-30.
4. Braden C.R. Salmonella enterica serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. Clin. Infect. Dis. 2006, 43: 512-517.
5. Foley S.L., Lynne A.M., Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of gram-negative bacterial foodborne pathogens. Infect. Genet. Evol. 2009, 9: 430-440.
6. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 1988, 26: 2465-2466.
7. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. J. Bacteriol. 1981, 145: 1365-1373.
8. Ozdemir R.M., Acar S. Plasmid profile and pulsed-field gel electrophoresis analysis of Salmonella enterica isolates from humans in Turkey. PLoS ONE. 2014, 9: e95976.
9. Pang J.C., Chiu T.H., Chiou C.S. et al. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of Salmonella enterica serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. J. Appl. Microbiol. 2005, 99: 1472-1483.
10. Rodrigue D.C., Tauxe R.V., Rowe B. International increase in Salmonella enteritidis: a new pandemic? Epidemiol. Infect. 1990, 105: 21-27.
11. Us E., Erdem B., Tekeli A. et al. Investigation of Salmonella serotype Enteritidis isolates by plasmid profiles analysis and pulsed-field gel electrophoresis. Microbiol. Bul. 2011, 45: 210-222.

Поступила 23.06.16

Контактная информация: Шубин Феликс Николаевич, д.м.н., проф.,
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1, р.т. (423)2-441-438

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

О.А.Коленчукова^{1,2}, С.В.Смирнова¹, А.М.Лазарева¹

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОЦЕНОЗА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА ПРИ АТОПИЧЕСКОМ И ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНИУСИТАХ

¹НИИ медицинских проблем Севера, ²Сибирский федеральный университет, Красноярск

Цель. Изучение микробиоценоза слизистой оболочки носа при аллергическом риносинусите. *Материалы и методы.* Обследованы больные полипозным риносинуситом (ПРС) и атопическим риносинуситом (АРС), а также группа контроля. При постановке диагноза ПРС и АРС использованы стандартные общеклинические методы с учетом дифференцированной диагностики атопических заболеваний и ринитов. *Результаты.* Микробный состав при разных формах риносинусита имеет разную направленность, что обусловлено различными патогенетическими механизмами. Микрофлора при АРС имеет значительно расширенный диапазон и характеризовалась увеличением концентрации условно патогенных микроорганизмов, не характерных для нормофлоры. При ПРС микробный состав значительно обеднен отсутствием некоторых постоянных представителей нормофлоры, при этом количество условно патогенных бактерий было значительно выше нормы. *Заключение.* Обнаружено нарушение микробиоценоза у больных аллергическим риносинуситом, более выраженное в группе ПРС. Выделенные штаммы стафилококков у больных АРС и ПРС обладают патогенными свойствами в равных соотношениях, при этом в группе АРС процент штаммов, обладающих персистентными свойствами, выше, чем в других исследуемых группах. Это может свидетельствовать об их роли в развитии воспалительного процесса на слизистой оболочке носа.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 67—73

Ключевые слова: аллергия, полипозный риносинусит, atopический риносинусит, микробиоценоз слизистой оболочки носа

O.A.Kolenchukova^{1,2}, S.V.Smirnova¹, A.M.Lazareva¹

FEATURES OF MICROBIOCENOSIS OF NOSE MUCOUS MEMBRANE DURING ATOPIC AND POLYPOUS RHINOSINUSITIS

¹Research Institute of Medical Problems of the North, ²Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

Aim. Study of microbiocenosis of nose mucous membrane during allergic rhinosinusitis. *Materials and methods.* Patients with polypous (PRS) and atopic (ARS) rhinosinusitis were examined, as well as a control group. Standard general clinical methods taking differential diagnostics of atopic diseases and rhinitis into consideration were used for the PRS and ARS diagnosis. *Results.* Microbial content during different forms of rhinosinusitis has varying directionality that is determined by different pathogenetic mechanisms. ARS microflora has a significantly extended range and was characterized by an increase of concentration of opportunistic microorganisms not characteristic for normoflora. Microbial composition for PRS was significantly depleted by a lack of certain permanent members of microflora, whereas the quantity of opportunistic bacteria was significantly above normal. *Conclusion.* Disturbance of microbiocenosis in patients with allergic rhinosinusitis was detected, more pronounced in the PRS group. Staphylococcus strains isolated from patients with ARS and PRS possess pathogenic properties in equal ratios, wherein the percentage of strains in ARS group that have persistence properties is higher than in other studied groups. This could give evidence regarding their role in development of inflammatory process on the nose mucous membrane.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 67—73

Key words: allergy, polypous rhinosinusitis, atopic rhinosinusitis, nose mucous membrane microbiocenosis

ВВЕДЕНИЕ

Независимо от патогенетической сути аллергического риносинусита, основными диагностическими критериями его являются патологические изменения со стороны слизистой носа и его придаточных пазух: гиперреактивность и воспаление с формированием обструкции — obturационного синдрома, обратимого полностью либо частично [2, 6, 13]. Нередко течение аллергического риносинусита осложняется присоединением вторичных инфекций, вызываемых в основном бактериальными агентами. Дальнейшее развитие патологического процесса зависит от многих факторов: степени патогенности и вирулентности возбудителей заболевания, состояния общего иммунитета и местных защитных факторов слизистых оболочек носа и, как следствие, от количественного и качественного состава микробных сообществ, присутствующих на слизистой оболочке носовых ходов [4, 11, 12]. Сопоставление показателей микробиоценоза с особенностями течения воспалительного заболевания показало, что тяжесть патологического процесса зависит от степени негативных изменений микробиологических показателей. Дисбиоз можно рассматривать как фактор этиологии либо как фактор, predisposing к развитию патологического процесса. Однако без одного невозможно и другое.

Целью исследования является необходимость изучения микробиоценоза слизистой оболочки носа при аллергических заболеваниях для последующей коррекции дисбиозов в комплексной терапии заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы больные полипозным риносинуситом (ПРС, $n=58$) и больные atopическим риносинуситом (АРС, $n=98$) в возрасте от 18 до 64 лет. Группы контроля составляли практически здоровые доноры крови Красноярского краевого центра крови № 1 (контроль, $n=156$), сопоставимые по полу и возрасту. Диагностика аллергического риносинусита основывалась на комплексном обследовании больных оториноларингологом и аллергологом-иммунологом. При постановке диагноза полипозного и atopического риносинусита использованы стандартные общеклинические методы с учетом дифференцированной диагностики atopических заболеваний и ринитов.

Для оценки микрофлоры слизистой оболочки носа во время обострения заболевания проводили посев микроорганизмов на питательные дифференциально-диагностические среды (КА, ЖСА, Эндо, энтерококк-агар). Для взятия образцов патологического материала со слизистой оболочки носа и транспортировки для дальнейших исследований использовались стерильные тумферы с коммерческой транспортной средой Эймса. Посев проводили секторным методом. Инкубировали в термостате при температуре 37°C в течении 24 часов. Подсчет микроорганизмов проводили по расчетной таблице.

Для видового определения бактерий рода *Streptococcus* использовали тест на наличие каталазной активности. Каталазоотрицательные грамположительные кокки с КА пересевали на стрептококк-бульон. Для идентификации стрептококков использовали тест-систему slide strepto-kit (Биомерье, Франция). Для видовой идентификации бактерий семейства *Enterobacteriaceae* использовали агар Эндо. Колонии микроскопировали и грамотрицательные палочки пересевали на скошенный агар Олькеницкого штрихом и уколом. Для определения видов использовали системы для биохимической идентификации энтеробактерий. Определение энтерококков осуществляли при посеве на коммерческий энтерококк-агар. Для идентификации выделенных стафилококков определяли каталазную активность (отсутствует у бактерий рода *Micrococcus*), коагулазную активность в отношении плазмы кролика, образование кислот из маннита, мальтозы, сахарозы, лактозы и ферментацию глюкозы в анаэробных условиях, наличие уреазы и образование ацетилметилкарбинола-ацетоина. У стафилококков определяли патогенные (гемолиз, липаза, лецитиназа, фибринолизин, коагулаза, коллагеназа) и персистентные свойства (антилизоцимную и антиинтерферонную активность) [5].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Нормальность распределения проверялась методом Колмагорова—Смирнова. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна—Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании количественного состава микрофлоры слизистой оболочки носа при аллергических риносинуситах различного патогенеза было обнаружено значительное преобладание микроорганизмов, принадлежащих к родам *Staphylococcus* (*Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*) и *Streptococcus* (*Streptococcus pneumoniae*), а также к семейству *Enterobacteriaceae* в группе ПРС относительно контрольной группы и группы АРС (табл. 1).

Количественный состав микрофлоры слизистой оболочки носа в группе APC наблюдался на уровне контроля. При этом концентрация бактерий, относящихся к *Haemophilus influenzae*, была значительно выше по сравнению с нормой ($\leq 10^3$). В группе ПРС не обнаружено некоторых представителей условно патогенной микрофлоры (энтерококки и гемофильная палочка), которые, по данным различных исследований, выявляются на слизистой оболочке носа довольно часто.

При определении видовой принадлежности микроорганизмов, относящихся к роду, в исследуемых группах установлено увеличение общей численности штаммов *S. aureus*, относящихся к коагулазопозитивным стафилококкам (табл. 1). При этом частота встречаемости и количество коагулазо-негативных стафилококков также возросло. Выявлено большое разнообразие данных микроорганизмов: *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hyicus* и *Staphylococcus xylosum*. Представляет ин-

Таблица 1. Концентрация бактерий на слизистой оболочке носа при APC и ПРС, Ме (C₂₅-C₇₅)

Микроорганизмы, КОЕ/мл×10 ⁴	Контроль, n=156	APC, n=98	ПРС, n=58
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,5 (0,01—10,5)	15 (0,2—15)	90 (0,2—102) P ₁ =0,040
<i>S. epidermidis</i>	0,1 (0,01—10)	10 (0,1—10)	0,5 (0,1—10) P ₁ =0,021
<i>S. haemolyticus</i>	0,01 (0,01—0,1)	10 (0,01—10) P ₁ =0,039	5,5 (0,75—255) P ₁ =0,023
<i>Streptococcus</i> spp.	0,1 (0,01—0,1)	10 (0,01—100)	850 (50—900) P ₁ =0,029
<i>S. pneumoniae</i>	0,1 (0—0,1)	0,8 (0,01—0,25)	0,025 (0,01—300) P ₁ =0,012
<i>S. haemolyticus</i>	0	0,15 (0,1—0,2)	10 (0,1—15)
<i>Enterococcus</i> spp.	0	0,1 (0,001—10)	0
<i>E. faecium</i>	0	0,1 (0,01—0,5)	0
<i>E. faecalis</i>	0	0,1 (0,001—10)	0
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	0,5 (0,005—10)	0,001 (0,01—10)	100 (10—100) P ₁ =0,032
<i>H. influenzae</i>	0	28 (0,12—30)	0

Таблица 2. Частота встречаемости бактерий на слизистой оболочке носа при APC и ПРС

Микроорганизмы, %	Контроль, n=156	APC, n=218	ПРС, n=58
<i>Staphylococcus</i> spp.	35,76	68,48 P ₁ <0,001	54,10 P ₁ <0,001; P ₂ =0,033
<i>S. aureus</i>	14,71	34,63 P ₁ <0,001	54,10 P ₁ <0,001; P ₂ =0,005
<i>S. epidermidis</i>	33,53	56,03 P ₁ <0,001	55,74 P ₁ <0,001
<i>S. haemolyticus</i>	17,62	42,80 P ₁ <0,001	52,46 P ₁ <0,001
<i>Streptococcus</i> spp.	34,12	52,44 P ₁ =0,014	73,77 P ₁ <0,001; P ₂ =0,002
<i>S. pneumoniae</i>	13,5	17,07	47,54 P _{1,2} <0,001
<i>S. haemolyticus</i>	0	11,26	49,18 P _{1,2} <0,001
<i>Enterococcus</i> spp.	0	19,49 P ₁ <0,001	0
<i>E. faecium</i>	0	8,81	0
<i>E. faecalis</i>	0	11,67	0
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	27,06	37,87	52,46 P _{1,2} <0,001; P ₂ =0,039
<i>Micrococcus</i> spp.	14,71	39,83 P ₁ <0,001	57,38 P _{1,2} <0,001; P ₂ =0,013
<i>Nisseria</i> spp.	12,94	43,98 P ₁ <0,001	68,57 P _{1,2} <0,001; P ₂ =0,002
<i>M. catarrhalis</i>	16,47	46,59 P ₁ <0,001	55,74 P ₁ <0,001
<i>H. influenzae</i>	0	21,74	0

терес выявление таких стафилококков, как *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. hyicus*, *S. xylosum* у больных APC, в группе ПРС — *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. xylosum*. В контрольной группе штаммов таких видов как *S. capitis* и *S. hyicus* не обнаружено. При этом у больных ПРС видовой состав бактерий, относя-

щихся к роду *Staphylococcus*, был значительно беднее по сравнению с другими исследуемыми группами.

При изучении микрофлоры, полученной со слизистой оболочки носа, было выявлено 980 культур микроорганизмов у больных АРС и 407 у ПРС. В группе контроля выявлено 174 культуры микроорганизмов.

Анализ частоты встречаемости микроорганизмов, принадлежащих к разным родам, показал, что в группе с АРС чаще всего выделялись бактерии рода *Staphylococcus* и *Streptococcus* (*S.pneumoniae*, *S.haemolyticus*), меньший процент приходился на микроорганизмы, относящиеся к родам *Enterococcus* (*E.faecium*, *E.faecalis*), *Micrococcus* и *Nesseria* относительно группы контроля. В группе ПРС преобладали бактерии рода *Streptococcus* и семейства *Nesseria*, при этом частота встречаемости других исследуемых семейств бактерий также обнаруживалась достаточно часто по сравнению с группой больных АРС и контролем (табл. 2).

Анализ процентного состава бактерий в группе больных ПРС обнаружил достоверно высокую частоту встречаемости таких микроорганизмов, как *S.pneumoniae*, *S.haemolyticus* и *M.catarhalis* относительно АРС и контроля. Анализ частоты встречаемости бактерий, относящихся к роду *Staphylococcus*, выделенных со слизистой оболочки носа, показал высокий процент обнаружения как коагулазоположительных стафилококков, к которым относится золотистый стафилококк, так и коагулазоотрицательных, таких как *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* (табл. 2). При этом наиболее высокий процент встречаемости в группе больных АРС приходился на эпидермальный стафилококк. Процентный состав штаммов *S.aureus* в группе ПРС достоверно возрастал относительно больных АРС.

Сравнительное изучение микробного пейзажа показало, что только в 11% случаев при АРС и в 25% при ПРС были выделены монокультуры стафилококков (*S.aureus*), в остальных случаях микроорганизмы формировали ассоциации. Установлены поликомпонентные ассоциации (от 2 до 5) с преобладанием 2- и 3-компонентных — 17,5% при АРС, 32% при ПРС (*S.aureus*, *S.epidermidis*) и 12,2% при АРС, 18% при ПРС (*S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*). Анализ распределения видов внутри ассоциаций показал, что ведущими бактериями рода *Staphylococcus* являлись *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* и *S.hominis*. Обнаружение других стафилококков (*S.xylosus*, *S.cohnii*, *S.capitis*, *S.hyicus*) находилось в зависимости от соотношения основных видов.

При изучении способности продуцировать ферменты патогенности среди стафилококков в исследуемых группах получены следующие данные. Коагулазоположительных штаммов обнаружено 23% при АРС, 22,8% при ПРС в контрольной группе — 20%. Лецитиназная активность была отмечена у 27% при АРС, 28% при ПРС, в контрольной группе — 18%. Диаметр зоны действия фермента лецитиназы соответствовал $3,2 \pm 0,6$ мм, $2,3 \pm 1,6$ мм и $1,4 \pm 0,1$ мм соответственно. Фермент липаза присутствовал у 24% штаммов стафилококков у больных АРС, у 28% при ПРС, в контрольной группе обнаружен у 15% штаммов стафилококков. Диаметр липазной зоны составил $5,4 \pm 0,7$ мм, $4,7 \pm 0,9$ мм, $2,4 \pm 0,2$ мм соответственно. Фибринолиз идет следующим этапом после коагуляции плазмы. При изучении фибринолитической активности в группе АРС 47% штаммов золотистого стафилококка продуцировали данный фермент, у 60% штаммов при ПРС и в контрольной группе количество штаммов, способных его продуцировать, соответствовало 9%. Гемолитическую активность проявляли 35% стафилококков при АРС, 27,5% при ПРС, в контроле — 12%.

При этом диаметр зоны лизиса эритроцитов составил $5,4 \pm 1,2$ мм, $8,0 \pm 0,7$ мм, $3,4 \pm 0,4$ мм соответственно. При изучении коллагеназы наблюдали, что коагулазоположительные штаммы стафилококков не обладали данным ферментом, а среди коагулазоотрицательных стафилококков этот фермент наблюдался у 53% при АРС, 46,6% при ПРС, в контрольной группе процент стафилококков, способных разжижать желатину, соответствовал 27%.

Изучение персистентных свойств среди стафилококков, выделенных со слизистой оболочки носа у больных АРС, показало следующее: среди стафилококков 27% обладают антилизоцимной активностью, диаметр зоны лизиса при этом соответствовал $8,7 \pm 1,4$ мм, 17% — антиинтерферонной активностью. Диаметр зоны просветления составил $8,2 \pm 0,8$ мм. В группе больных ПРС антилизоцимная активность присутствовала у 36% штаммов бактерий рода *Staphylococcus*, диаметр зоны лизиса при этом соответствовал $9,8 \pm 1,6$ мм. Количество штаммов, обладающих антиинтерферонной активностью, соответствовало 50%. Диаметр зоны просветления составил $7,5 \pm 0,7$ мм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальный фактор остается одной из ведущих причин развития патологических процессов в околоносовых пазухах. Взаимосвязь между макроорганизмом и микрофлорой настолько велика, что часто трудно установить, что является первопричиной развития патологического состояния: изменения в организме хозяина или сдвиги в составе микрофлоры [1, 3, 7]. Микробиоценозы представляют собой целостную экологическую систему, которая сохраняется за счет постоянного динамического равновесия между микрофлорой и макроорганизмом. Таким образом, в результате исследования обнаружено при АРС и ПРС нарушение количественного состава микрофлоры — дисбактериоз слизистой оболочки носа. Установлено значительное увеличение количества стафилококков и стрептококков. При АРС выявлено повышение КОЕ штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*. Для ПРС характерно увеличение количества стафилококков, стрептококков и энтеробактерий.

При исследовании патогенных свойств штаммов стафилококков, выделенных со слизистой оболочки носа у больных АРС и ПРС, обнаружено, что практически все виды, которые предположительно являются этиопатогенетическими агентами, способны продуцировать ферменты патогенности. Наиболее вероятными возбудителями могут быть коагулазоположительные стафилококки и гемолитический и эпидермальный среди коагулазоотрицательных стафилококков. В механизмах развития дисбиозов важную роль играют факторы персистенции и колонизации, степень их экспрессии как облигатной, так и факультативной микрофлорой [5, 8, 10]. Выделенные штаммы стафилококков у больных АРС и ПРС обладают патогенными и персистентными свойствами в равных соотношениях, что вполне логично, поскольку бактериям необходимы свойства для длительного переживания в организме человека в условиях атаки со стороны иммунной системы.

Перенаселение микрофлорой слизистой оболочки носа способствует тому, что ее часть может спускаться из верхних отделов дыхательных путей в нижние — не свойственных данным микроорганизмам местах персистенции. Формирование новых микробных сообществ может изменять среду обитания и характер взаимоотношений между ассоциантами. Многие исследователи считают, что в таких условиях происходит отбор микропопуляций аутофлоры с повышенными вирулентными свойствами [6, 9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Батуро А.П., Романенко Э.Е., Леонова А.Ю., Ярцева А.С., Савлевич Е.Л., Мокроносова М.А. Доминирование *Staphylococcus aureus* в микробиоценозе полости носа у детей и взрослых с инфекционным и аллергическим ринитом. Журн. микробиол. 2015, 1: 72-74.
2. Бондарева Г.П., Терехова А.О. Роль инфекции в формировании полипозного риносинусита у больных бронхиальной астмой. Вестн. оториноларингологии. 2010, 3: 9-11.
3. Винникова Н.В. Особенности микрофлоры полости носа больных полипозным риносинуситом. Российская ринология. 2015, 1: 13-15.
4. Козлов В.С., Савлевич Е.Л. Полипозный риносинусит. современные подходы к изучению патогенеза, диагностике и лечению. Вестн. оториноларингологии. 2015, 4: 95-99.
5. Коленчукова О.А., Игнатова И.А., Смирнова С.В., Капустина Т.А., Кин Т.Н. Особенности микрофлоры слизистой оболочки носа у больных аллергическим риносинуситом. Вестн. оториноларингологии. 2008, 5: 33-35.
6. Лопатин А.С., Иванченко О.А., Сошников С.С. Сравнительное исследование эффективности различных схем лечения хронического риносинусита. Российская ринология. 2015, 2: 47-56.
7. Максимова О.В., Зайцева Е.В., Мазурина С.А., Ревякина В.А., Гервазиева В.Б. Микробиота кишечника у детей с ожирением и аллергическими заболеваниями. Журн. микробиол. 2015, 3: 53-58.
8. Максимова О.В., Гервазиева В.Б., Зверев В.В. Микробиота кишечника и аллергические заболевания. Журн. микробиол. 2014. 3: 49-60.
9. Пискунов Г.З., Абдулаев Б.А., Ким И.А. Роль нарушений внутриносовых структур в развитии полипозного риносинусита. Российская ринология. 2014, 4: 13-20.
10. Саидов М.З., Давудова Б.Х., Магомедова К.М. Современные представления об иммунопатогенезе полипозного риносинусита. Иммунология. 2010, 5: 261-269.
11. Antonicelli L., Marchetti P., Accordini S. et al. The heterogeneity hidden in allergic rhinitis and its impact on co-existing asthma in adults: A population-based survey. Allergy immunol. 2015, 168 (3): 205-212.
12. Cope E.K., Lynch S.V. Novel microbiome-based therapeutics for chronic rhinosinusitis. Curr. Allergy Asthma Rep. 2015, 15 (3): 504.
13. Jain R., Douglas R. When and how should we treat biofilms in chronic sinusitis? Curr. Opin. Otolaryngol. Head. Neck. Surg. 2014, 22 (1): 16-21.

Поступила 25.08.16

Контактная информация: Коленчукова Оксана Александровна,
660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г, р.т. (391) 228-06-83

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Л.И.Новикова¹, М.С.Петрова², В.А.Алешкин¹, Т.А.Скирда¹, А.В.Волков¹,
Н.С.Матвеевская¹, С.С.Бочкарева¹, Т.В.Синчугова¹, Р.Л.Панурина¹, М.М.Зуева¹,
М.А.Наумова¹, И.С.Воронова², С.В.Бунин², О.Ю.Борисова¹, А.С.Пименова¹*

КОМПЛЕКСНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЙ ПРЕПАРАТ В ТЕРАПИИ КОКЛЮША У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

¹Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского, ²Инфекционная клиническая больница № 1, Москва

Цель. Изучить возможность включения комплексного иммуноглобулинового препарата (КИП), обладающего специфической активностью в отношении коклюшных экзотоксинов, в состав комплексной терапии коклюшной инфекции у детей раннего возраста. *Материалы и методы.* Были обследованы две группы детей до 3 лет, больных коклюшем. Основная группа (50 человек) получала КИП per os по 1 дозе 1 — 2 раза в день в течение 5 дней, группа сравнения (34 ребенка) получала только базисную терапию. Проведена оценка клинической эффективности КИП, изучено содержание противокклюшных

антител класса G, а также общего IgE у пациентов. *Результаты.* Показана хорошая клиническая эффективность препарата, а также иммуномодулирующая активность в отношении гуморального иммунного ответа на коклюшную инфекцию. *Заключение.* Выявленное положительное влияние КИП на течение коклюша у детей обозначило принципиально новое использование этой пероральной лекарственной формы.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 73—80

Ключевые слова: коклюш, комплексный иммуноглобулиновый препарат, противокклюшный иммунитет, антитоксические IgG

L.I.Novikova¹, M.S.Petrova², V.A.Aleshkin¹, T.A.Skirda¹, A.V.Volkov¹, N.S.Matveevskaya¹, S.S.Bochkareva¹, T.V.Sinchugova¹, R.L.Panurina¹, M.M.Zueva¹, M.A.Naumova¹, I.S.Voronova², S.V.Bunin², O.Yu.Borisova¹, A.S.Pimenova¹

COMPLEX IMMUNOGLOBULIN PREPARATION FOR THERAPY OF PERTUSSIS IN YOUNG CHILDREN

¹Gabrichesky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Infectious Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russia

Aim. Study the possibility of inclusion of complex immunoglobulin preparation (CIP) possessing specific activity against pertussis exotoxins into complex therapy of pertussis infection in young children. *Materials and methods.* 2 groups of children with pertussis younger than 3 years were examined. The main group (50 individuals) received CIP *per os* — 1 dose 1 — 2 times per day for 5 days, comparison group (34 children) received only basic therapy. Evaluation of clinical effectiveness of CIP was carried out, the content of anti-pertussis class G antibodies and total IgE in patients were studied. *Results.* A good clinical effectiveness of the preparation was shown, as well as immune modulating activity against humoral immune response to pertussis infection. *Conclusion.* The detected positive effect of CIP on pertussis course in children has indicated a principally novel use of this per oral drug form.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 73—80

Key words: pertussis, complex immune globulin preparation, anti-pertussis immunity, anti-toxic IgG

ВВЕДЕНИЕ

Комплексный иммуноглобулиновый препарат (КИП), содержащий в своем составе иммуноглобулины трех основных классов — G, A и M как лекарственное средство местного введения (в виде лиофилизата для приготовления раствора для приема внутрь) внедрен в клиническую практику в 1991 г. и в настоящее время применяется в составе комплексной терапии при лечении вирусных и бактериальных кишечных инфекций как у детей, так и у взрослых [3]. Область клинического использования этой пероральной лекарственной формы ограничена преимущественно кишечными инфекциями, однако необходимо отметить, что препарат, будучи приготовлен из пула донорской крови, содержит разнообразные антитела, причем не только к патогенам кишечной группы. В препарате содержатся также антитела к возбудителям респираторных инфекций, в том числе и к факторам патогенности коклюшного микроба. Коклюш занимает важное место в детской инфектологии [6]. Несмотря на достаточность охвата детей профилактическими прививками, в настоящее время сохраняются условия, способствующие распространению

коклюша. Каждые 2 года регистрируются периодические подъемы заболеваемости, возникают очаги с распространением инфекции в детских учреждениях, наиболее высокие показатели заболеваемости отмечаются в возрасте до 1 года и у школьников [1, 6, 7]. Восприимчивость к коклюшу остается высокой как у детей раннего возраста, в том числе у новорожденных, так и у взрослых. По-прежнему коклюш является тяжелым заболеванием для детей в возрасте первых месяцев, среди которых нередки расстройства дыхания, поражение ЦНС, возможна летальность [2, 5, 6]. Особенностью иммуногенеза у детей раннего возраста являются низкие показатели сероконверсии противокклюшных антител всех классов, в том числе и IgG [5].

Доказана эффективность использования специфических иммуноглобулиновых препаратов парентерального введения в комплексной терапии коклюшной инфекции, однако в арсенале лечебных средств, применяемых при коклюше в настоящее время, указанные препараты отсутствуют [2, 4]. КИП обладает широким спектром антител, и хотя это пероральное, а не парентеральное лекарственное средство, наличие специфической противокклюшной активности позволило предположить, что препарат у больных коклюшем может оказать специфическое анитоксическое действие, а наличие антител других специфичностей поможет воздействовать на сопутствующую инфекционную патологию и препятствовать нарушению кишечной микрофлоры.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке эффективности пероральной формы КИП у детей раннего возраста, больных коклюшем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в отделении для больных раннего возраста с респираторными инфекциями в ИКБ № 1 (Москва). Были обследованы две группы больных коклюшем детей в возрасте до 3 лет. Критериями включения в исследование были: наличие коклюша у ребенка в возрасте до 3 лет, не получившего прививки против коклюша; отсутствие в терапии антибактериальных, глюкокортикоидных и иммунотропных препаратов.

Основная группа состояла из 50 пациентов, которым КИП был включен в комплексную терапию коклюшной инфекции. В группу сравнения вошли больные коклюшем, получавшие только базисную терапию (34 ребенка). Возрастное распределение в основной группе и группе сравнения выглядело следующим образом: детей 0 — 3 месяцев было 20 (40,0%) и 13 (38,2%), 4 — 6 месяцев — 10 (20,0%) и 6 (17,65%), 7 — 12 месяцев — 11 (22,0%) и 9 (26,5%), 1 — 3 лет — 9 (18,0%) и 6 (17,65%) соответственно. В основной группе коклюш протекал как моноинфекция у 33 детей (66,0%), у 12 детей (24,0%) коклюшу сопутствовала ОРВИ, у 5 — респираторная микоплазменная инфекция (10,0%). Сходное соотношение отмечалось и в группе сравнения. Коклюш как моноинфекция протекал у 20 детей (58,8%), в сочетании с ОРВИ — у 6 (17,6%), с респираторной микоплазменной инфекцией — у 8 (23,5%).

Основная и группа сравнения были сопоставимы также по тяжести заболевания, частоте выявления неблагоприятного преморбидного фона, срокам заболевания. Так, в частности, соотношение клинических форм в основной группе было следующим: тяжелые формы коклюша диагностированы у 2 (4,0%) детей, среднетяжелые — у 46 (92,0%), легкие — у 2 (4,0%); в группе сравнения тяжелые формы — у 1 (2,9%), среднетяжелые — у 30 (88,2%) и легкие — у 3 (8,8%) детей соответственно.

Для подтверждения клинического диагноза были использованы культуральный и молекулярно-генетический (ПЦР) методы.

Дети основной группы получали КИП перорально по 1 флакону (1 доза — 300 мг белка) 1 — 2 раза в день в течение 5 дней. Лечение начиналось с первых суток пребывания в стационаре вне зависимости от степени тяжести коклюшной инфекции. Лечение комплексным иммуноглобулиновым препаратом проводили на фоне общепринятой терапии (противокашлевых препаратов — синекода, фенотарбита — и препаратов, восстанавливающих бронхолегочную проходимость). В группе сравнения детям назначалась базисная терапия в том же объеме.

В исследовании были использованы несколько серий препарата «Имуноглобулиновый комплексный препарат (КИП)» (ЗАО «Иммунно-Гем», Россия), содержащих IgG и IgA к коклюшному экзотоксину и гемагглютиниру в диапазоне 180 — 250 Ед/мл и 55 — 110 Ед/мл соответственно. Содержание противококлюшных антител в сыворотках крови больных и в сериях препарата определяли методом ИФА с использованием диагностических тест-систем Ridascreen Bordetella «R-Biopharm» (Германия). Также методом ИФА определяли сывороточное содержание общего IgE («Хема», Россия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение терапевтической эффективности КИП проведено в ходе клинического наблюдения. Все больные коклюшем, в комплексе терапии которых использовали КИП, были госпитализированы в стационар в период спазматического кашля. В зависимости от сроков заболевания препарат был назначен на 2 неделе от начала болезни 13 (26,0%) больным, на 3 неделе — 29 (58,0%), на 4 — 8 (16,0%) пациентам. В группе сравнения сроки наблюдения и проведения базисной терапии были идентичными.

Сравнительная оценка эффективности КИП проводилась по основным объективным клиническим критериям, как то, сокращение числа тяжести и длительности приступов кашля, исчезновение клинических проявлений, сопровождающих тяжелые приступы кашля (задержка дыхания, цианоз лица во время кашля, рвота), улучшение самочувствия, аппетита, нормализация сна, сокращение длительности пребывания в стационаре.

Сопоставление результатов лечения в группах детей, получавших и не получавших КИП, показало его эффективность по основным указанным параметрам сравнения. Лечебный эффект КИП определялся, прежде всего,

Таблица 1. Характер кашля у детей на фоне приема КИП в зависимости от сроков назначения

Сроки болезни, количество больных	Частота приступов кашля (количество эпизодов в сутки)		p
	До приема КИП, M±m	После приема КИП, M±m	
2 неделя, n=13	22,6±0,8	7,6±1,2	p<0,05
3 неделя, n=29	22,5±1,4	8,8±1,0	p<0,05
4 неделя, n=8	12,0±1,8	7,9±2,9	p>0,05

урежением числа и облегчением спазматических приступов, улучшением самочувствия, восстановлением аппетита, сна. Клинический анализ динамики характера кашля в основной группе показал, что сокращение количества приступов к 4 — 5 дню применения КИП отмечалось у большинства детей. Эффективность КИП у детей зависела от сроков его применения. Так, в случае назначения препарата на 2 или 3 неделе болезни наблюдалось статистически значимое

уменьшение частоты приступов кашля (в 3 и в 2,6 раза соответственно), в то время как включение КИП в терапию в более поздние сроки заболевания коклюшем не давало выраженного терапевтического эффекта (табл. 1).

Сравнительный анализ продолжительности основных симптомов коклюша выявил значительные преимущества включения КИП в терапию коклюша (табл. 2).

В частности, если в основной группе приступы кашля с частотой более 25 раз в сутки сохранялись в течение $3,2 \pm 0,2$ дней, то в группе сравнения — $5,8 \pm 0,6$ дня, а приступы с частотой 15 — 25 раз в сутки — $6,3 \pm 0,4$ и $8,7 \pm 0,3$ дня соответственно ($p < 0,01$).

Существенным результатом применения КИП явилось сокращение средней длительности пребывания больных коклюшем в стационаре.

Так, если у детей, получавших КИП, она составила $8,0 \pm 0,2$ к/дня, то в группе сравнения — $12,0 \pm 0,4$ к/дней ($p < 0,01$). Сокращение сроков пребывания больных в стационаре уменьшало риск наложения острых респираторных вирусных инфекций. Как было указано выше, и в основной группе, и в группе сравнения наблюдались больные, у которых коклюш протекал в сочетании с острыми респираторными и микоплазменной инфекциями. Бронхолегочные осложнения (бронхиты) развивались только в случае микст-инфекции с ОРВИ: у 4 больных в каждой группе. В целом обращало на себя внимание более благоприятное течение сопутствующих респираторных инфекций у детей, получавших в терапии КИП.

У значительного числа больных коклюшем раннего возраста наблюдаются диспептические нарушения (срыгивания, явления метеоризма, изменение характера стула). Применение КИП приводило к исчезновению патологических примесей в стуле, снижению его частоты и улучшению консистенции. В группе сравнения у 10 (29,4%) больных в возрасте 0 — 3 месяцев диарейный синдром сохранялся.

У 5 (10%) больных коклюшем существенной регрессии клинической симптоматики на фоне терапии комплексным иммуноглобулиновым препаратом не отмечалось, что было связано с более поздним началом лечения (4 неделя от начала болезни).

У 25 детей основной группы и 19 детей из группы сравнения был изучен гуморальный ответ на коклюшную инфекцию (табл. 3). Анализ показателей противокклюшного иммунитета выявил статистически значимое нарастание антитоксических IgG в основной группе детей по сравнению с группой сравнения.

В основной группе уровень антител класса G к 19 — 21 дню болезни составили $57,1 \pm 11,2$ Ед/мл, а на 4 неделе — $108,1 \pm 39,2$ Ед/мл, тогда как в груп-

Таблица 2. Продолжительность основных клинических симптомов коклюша

Клинические симптомы	Продолжительность симптомов в днях ($M \pm m$)		p
	Основная группа (n=50)	Группа сравнения (n=34)	
Нарушение самочувствия	$2,2 \pm 0,3$	$8,2 \pm 0,7$	$p < 0,01$
Цианоз лица при кашле	$3,6 \pm 0,3$	$5,4 \pm 1,3$	$p < 0,01$
Частота приступов:			
>25 раз в сутки	$3,2 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,6$	$p < 0,01$
15—25 раз в сутки	$6,3 \pm 0,4$	$8,7 \pm 0,3$	$p < 0,01$
Рвота	$2,4 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,5$	$p < 0,05$
Снижение аппетита	$4,8 \pm 0,3$	$7,2 \pm 1,2$	$p < 0,05$
Средняя длительность пребывания в стационаре	$8,0 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,4$	$p < 0,01$

Таблица 3. Содержание IgG к коклюшным экзотоксинам у детей (3 и 4 недели коклюша, указаны средние значения в группах)

Возраст	Основная группа				Группа сравнения			
	п	3 неделя		4 неделя	п	3 неделя		4 неделя
		15—18 дни	19—21 дни	22—28 дни		15—18 дни	19—21 дни	22—28 дни
		Ед/мл		Ед/мл		Ед/мл		Ед/мл
0—3 мес.	9	20,6	42,3	119,3	4	13,5	—	—
4—12 мес.	16	31,0	56,2	165,0	15	16,5	24,4	43,4
Итого	25	27,1	57,1	108,1	19	15,6	24,4	43,4

пе сравнения в указанные сроки показатели IgG не превышали $24,4 \pm 7,0$ Ед/мл и $43,4 \pm 11,5$ Ед/мл соответственно ($p < 0,01$). Следует отметить, что у больных коклюшем детей, получавших КИП, нарастание специфического IgG на 6—7 день от начала применения препарата имело место в 90% случаев, и лишь у единичных пациентов оно отсутствовало.

В ходе исследования большое внимание уделялось выявлению нежелательных явлений от проводимой терапии. Ежедневное клиническое наблюдение и лабораторные исследования в динамике заболевания не выявили отрицательного влияния КИП на организм детей. Содержание суммарного количества IgE в крови не превышало 10 МЕ/мл (норма для детей в возрасте до 6 мес., 6—12 мес. и 1—3 года составляет 0—12, 0—30 и 0—45 МЕ/мл соответственно). Лишь у 3 детей (6,0%) обнаружены повышенные значения этого иммуноглобулина (от 60 до 180 МЕ/мл), причем как до, так и после лечения КИП. В данных случаях имело место сочетанное течение коклюша с острыми респираторными вирусными и микоплазменной инфекциями.

ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуноглобулиновые препараты занимают одно из важных мест в терапии различных инфекционных заболеваний. Известен способ лечения коклюша с помощью специфического (противококлюшного) иммуноглобулина (содержит IgG против коклюшного экзотоксина), предназначенного для внутримышечного введения, причем, препарат проявлял эффективность на ранних сроках заболевания [4]. Однако использование этого иммуноглобулина в терапии коклюша в настоящее время невозможно ввиду его отсутствия на фармацевтическом рынке России.

Комплексный иммуноглобулиновый препарат также обладает специфической активностью в отношении коклюшного токсина, связанной как с IgG, так и с IgA. При этом на основании полученных нами результатов можно констатировать, что и пероральное применение препарата эффективно при коклюше. Лечебный эффект КИП в составе комплексной терапии коклюша определялся прежде всего сокращением числа спазматических приступов кашля, а также сопутствующих тяжелых клинических проявлений (нарушение ритма дыхания, цианоз лица и слизистых во время приступа кашля, рвота). У детей, принимавших КИП, купировались диспепсические явления, отягчающие течение коклюша, за счет воздействия препарата на сопутствующую инфекционную микрофлору. На этом фоне самочувствие и поведение ребенка заметно улучшалось, восстанавливался сон и аппетит и, что имеет немаловажное значение для ребенка раннего возраста, улучшался нутритивный статус. Не зафиксировано нежелательных побочных эффектов препарата, в

частности, на уровне определения общего IgE не выявлена аллергизация организма.

Выявлена более выраженная сероконверсия антител к коклюшному токсину и филаментозному гемагглютинирующему агенту у детей, принимавших КИП. Среднее содержание IgG в основной группе, как к 3 так и к 4 неделе болезни, более чем в 2 раза превышало аналогичные показатели группы сравнения.

Необходимо также отметить преимущества применения пероральной лекарственной формы при сравнении с инъекционной, особенно у грудных детей и детей младшего возраста.

Не вызывает сомнения тот факт, что перорально введенные иммуноглобулины частично расщепляются в желудочно-кишечном тракте. Однако активностью антител обладают и фрагменты иммуноглобулинов, и не исключено, что некоторая часть иммуноглобулиновых молекул попадает в кровь в интактном виде. Таким образом, при пероральном поступлении иммуноглобулинов КИП в организм детей, больных коклюшем, не происходит массового попадания антител из препарата в кровь подобно заместительной терапии при парентеральном введении, но можно предположить, что специфические иммуноглобулины КИП, взаимодействуя с антигеном, выступают как модуляторы иммунного ответа на коклюшную инфекцию. Однако для доказательства иммуномодулирующего эффекта КИП при коклюше необходимо, во-первых, оценить терапевтическую эффективность препарата, не обладающего специфической активностью в отношении коклюшных экзотоксинов, а во-вторых, обнаружить в фекалиях детей, принимавших КИП, соответствующие иммунные комплексы (иммуноглобулины+токсин).

В ходе исследования были разработаны показания для применения КИП при коклюше у детей до 3 лет: 1) при тяжелой и среднетяжелой формах коклюша в первые 3 недели от начала болезни; 2) при сочетанном течении коклюша и острых респираторных вирусных инфекций независимо от сроков болезни; 3) при сопутствующем диарейном синдроме с целью восстановления нормальной микрофлоры кишечника.

Рекомендуемый курс приема КИП — по 1 дозе 2 раза в сутки в течение 5 дней.

Таким образом, проведенное исследование, выявившее положительное влияние комплексного иммуноглобулинового препарата на течение коклюша у детей, обозначило принципиально новое использование этой пероральной лекарственной формы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова О.Ю., Петрова М.С., Мазурова И.К., Лыткина И.Н., Попова О.П., Гадау Н.Т., Мерцалова Н.У., Захарова Н.С., Пяева А.П., Салова Н.Я., Требуных И.П., Комбарова С.Ю., Шинкарев А.С., Скачкова В.Г., Савинкова В.С., Алешкин В.А. Особенности коклюшной инфекции в различные периоды эпидемического процесса в г. Москве. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 4: 33-39.
2. Грачева Н.М., Малышев Н.А., Петрова М.С., Попова О.П., Крючкова П.С., Келли Е.И., Абрамова Е.Н. Коклюш (клиника, диагностика, лечение). Методические рекомендации. М., 2009.
3. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии. Под ред. Г.Г.Онищенко, В.А.Алешкина, С.С.Афанасьева, В.В.Поспеловой. М., ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002.
4. Петрова М.С., Попова О.П., Звонарева С.В., Маркелов В.П., Бернадская Т.А. Коклюш: современные клинико-эпидемиологические аспекты и новые подходы к терапии. Новые лекарственные препараты. 2001, 3: 13-28.
5. Петрова М.С., Попова О.П., Борисова О.Ю., Абрамова Е.Н., Варганян Р.В., Келли Е.И.

Коклюш у детей раннего возраста. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012, 6: 19-24.

6. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II. Под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой. М., БИНОМ, 2012.
7. Семенов Б.Ф., Захарова Н.С., Мазурова И.К. Подъем заболеваемости коклюшем на фоне массовой вакцинации. Гипотезы, объясняющие этот феномен. Журн. микробиол. 2003, 6: 70-73.

Поступила 07.07.16

Контактная информация: Новикова Лидия Ивановна, к.м.н.,
125212, Москва, ул.Адмирала Макарова, 10, р.т. (495)452-38-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Н.В.Башмакова, А.М.Литвинова, О.А.Кузнецова

ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТОЯНИЯ ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ ИЗ ГРУПП ВЫСОКОГО ПЕРИНАТАЛЬНОГО РИСКА В ПЕРИОД ВАКЦИНАЦИИ В РОДДОМЕ

Уральский НИИ охраны материнства и младенчества, Екатеринбург

Цель. Оценка объема иммунопрофилактической работы на этапе оказания помощи новорожденным в раннем неонатальном периоде. *Материалы и методы.* Проводилось когортное ретроспективное исследование по типу «случай-контроль», проанализировано 160 историй родов и истории развития и болезни новорожденных за период март—октябрь 2014 г. Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета статистических программ Statistica 7.0. *Результаты.* Определены основные нозологические единицы у беременных и их новорожденных детей, объем первичной вакцинации (против вирусного гепатита В, туберкулеза) в роддоме у детей с перинатальной патологией и здоровых новорожденных, причины медицинских противопоказаний. *Заключение.* Процесс вакцинации в перинатальном центре имеет свои особенности: большое количество медицинских противопоказаний и вследствие этого низкий охват первичной вакцинацией новорожденных, не превышающий 40%. Каждый ребенок требует индивидуального подхода, с учетом состояния здоровья решается вопрос о последовательности и графике прививок. Здоровые новорожденные вакцинируются согласно Национального календаря прививок, за исключением тех детей, родители которых отказываются от прививок.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 80—85

Ключевые слова: перинатальная патология, новорожденные, вакцинация

N.V.Bashmakova, A.M.Litvinova, O.A.Kuznetsova

CHARACTERISTICS OF THE CONDITION OF FULL-TERM NEWBORNS FROM THE GROUP OF HIGH PERINATAL RISK DURING VACCINATION PERIOD IN THE MATERNITY HOSPITAL

Ural Research Institute of the Protection of Maternity and Infancy, Ekaterinburg, Russia

Aim. Evaluation of the volume of immune prophylaxis work at the stage of administering aid to newborns at the early neonatal period. *Materials and methods.* Case-control type cohort retrospective study was carried out, 160 medical reports of deliveries and histories of development of illness of newborns during the period of March-October 2014 were analyzed. Statistical treatment of data was carried out using Statistica 7.0 package. *Results.* Principal nosologic units in pregnant women and their newborn children, volumes of primary vaccination (against viral hepatitis B, tuberculosis) in maternity hospitals in children with perinatal pathology and healthy newborns,

reasons for medical contraindications were determined. *Conclusion.* The process of vaccination in perinatal center has its own features: a high amount of medical contraindications and thus a low coverage of primary vaccination of newborns, not exceeding 40%. Each child requires individual approach, the question of sequence and calendar of vaccination is solved taking into consideration the health condition. Healthy newborns are vaccinated according to the national vaccination calendar except those children whose parents reject vaccination.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 80–85

Key words: perinatal pathology, newborns, vaccination

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все реже встречаются беременные женщины, у которых процесс вынашивания ребенка протекает без осложнений. Современные тенденции заболеваемости беременных женщин порождают замкнутый цикл: больная женщина — больной плод — больной ребенок [2, 9, 10]. Рост экстрагенитальной заболеваемости беременных, в определенной степени закономерный в условиях увеличения возраста рожаящих женщин, сопровождается нарастанием акушерской и перинатальной патологии — увеличением частоты позднего токсикоза, невынашивания, внутриутробного инфицирования плода. Все больше беременных женщин страдают гинекологическими заболеваниями. Инфекционно-воспалительные заболевания матери приводят к нарушению иммунологической реактивности их новорожденных детей. Существенное влияние на рост заболеваемости новорожденных оказывают болезни эндокринной системы матерей, катастрофически увеличилась частота анемии, патологии почек, системы кровообращения. Широкое применение вспомогательных репродуктивных технологий представляет собой дополнительные факторы риска неблагоприятных перинатальных исходов [3, 7, 11].

Модернизация модели здравоохранения предполагает сохранение жизни каждого новорожденного, высокое качество оказания медицинской помощи в родовспомогательных учреждениях, а также профилактику социально-значимых болезней. Вакцинопрофилактика является важным звеном в процессе пребывания новорожденного ребенка в роддоме. Тактика проведения иммунопрофилактики новорожденных детей, особенно с отклонениями в состоянии здоровья, требует осмысления с точки зрения возможностей современной иммунологии и изменения сроков вакцинации, так как дети с перинатальной патологией считаются группой риска по неэффективной вакцинации и развитию осложнений [1, 4, 5]. С другой стороны, перенос вакцинации против гепатита В и туберкулеза с раннего неонатального периода на постнатальный период влечет за собой риск инфицирования каждой из этих инфекций, профилактика которых в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок должна быть реализована в первые дни жизни ребенка и в условиях родильного дома [6, 8].

Цель работы — оценить объем иммунопрофилактической работы на этапе оказания помощи новорожденным в раннем неонатальном периоде. Дать характеристику состояния новорожденных из групп высокого риска в период вакцинации в условиях перинатального центра 3 уровня.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами исследования послужили истории родов, развития и болезни новорожденных. В ходе когортного ретроспективного исследования по типу «случай-контроль» оценивались следующие параметры: соматическое

здоровье матери, течение беременности, гестационный возраст ребенка, антропометрические данные, характеристика при рождении, условия выписки, охват прививками, диагноз по МКБ при выписке и т.п. Проанализировано 160 историй родов и истории развития и болезни новорожденных за период март—октябрь 2014 г., статистическая обработка данных проведена с помощью пакета статистических программ Statistica 7.0. Для сравнения групп использовался t-критерий Стьюдента. Статистически значимые различия определялись при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 160 женщин 86 (53,7%) вынашивали беременность в возрасте 26 — 35 лет, 43 (26,9%) женщины были в возрасте 15 — 25 лет, 31 (19,3%) женщина — старше 36 лет. Для 50 женщин (31,3%) это была первая беременность, у 44 женщин (27,5%) — вторая, у 23 женщин (14,4%) — третья, у 43 женщин (26,9%) — четвертая и более беременность.

Для 72 женщин (45,0%) это были первые роды, для 58 (36,3%) — вторые, для 25 женщин (15,6%) — третьи, четвертые роды были у 4 женщин, и одна женщина родила в шестой раз.

В зарегистрированном браке состояли 124 женщины (77,5%), у остальных брак был не зарегистрирован.

По течению беременности было отмечено, что 65 женщин (40,6%) во время беременности перенесли ОРВИ, у 33 беременных (20,6%) были проявления кольпита, маловодие было в 30 случаях (18,8%), угроза прерывания беременности в ранних сроках — у 20 женщин (12,5%), в поздних сроках — у 13 женщин (8,1%), угроза преждевременных родов отмечена у 11 беременных (6,9%), у 5 женщин (3,1%) во время беременности проводилось оперативное лечение, в 4 случаях — кистэктомия, в 1 случае — миомэктомия.

Следует отметить, что 21 (13,1%) женщина имела в анамнезе невынашивание, регрессирующую беременность, бесплодие, у 13 пациенток (8,1%) данная беременность была достигнута с помощью высокотехнологичных репродуктивных технологий (ВРТ).

По основным нозологическим единицам было преобладание хронических заболеваний урогенитального тракта — 26 случаев (16,2%), пороки и хронические заболевания сердца были в 19 случаях (11,9%), генетическая тромбофилия — у 16 пациенток (10,0%), аналогичное количество пациенток было с нарушениями жирового обмена, 16 — являлись носителями вируса простого герпеса и цитомегаловирусной инфекции, микоплазмоз, уреоплазмоз и хламидиоз отмечен у 8 женщин. Хроническая внутриматочная инфекция отмечена в 11 случаях (6,9%), хронические аллергические заболевания имели 10 беременных (6,3%).

Течение настоящей беременности осложнилось присоединением гестационного сахарного диабета у 66 пациенток (41,3%), хронической фетоплацентарной недостаточностью у 38 женщин (23,7%), анемии у 26 беременных (16,3%), преэклампсия во время беременности была у 16 женщин (10,0%), нарушения маточно-плацентарного кровотока отмечались у 12 беременных (7,5%), синдром задержки развития плода в 10 случаях (6,3%).

Всем родильницам проводилось флюорографическое обследование легких в условиях послеродового отделения, при этом у 1 из них был выявлен активный туберкулезный процесс.

Скрининг на носительство HBsAg прошли все беременные, носителей среди них не выявлено.

Новорожденные были разделены на 4 группы в зависимости от патологии матери: 1 группа — 38 новорожденных от матерей с гестационным сахарным диабетом; 2 группа — 39 новорожденных от матерей, имеющих инфекционный процесса урогенитального тракта; 3 группа — 28 детей от матерей с сочетанием гестационного сахарного диабета и инфекционного процесса урогенитального тракта; 4 группа — 55 новорожденных от матерей, не имевших в анамнезе развития гестационного сахарного диабета и инфекционных процессов урогенитального тракта (контрольная группа).

Все дети родились доношенными в сроке гестации 37 — 42 недели. Средняя масса тела при рождении $3404,2 \pm 592,5$ г, рост — $51,1 \pm 2,6$ см (данные параметры по группам не отличались).

Доля детей от оперативных родов составила 54,4% (87 детей), причем, во второй группе оперативным путем были проведены 15 родов — 38,5%, что достоверно меньше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Среди всех детей родились 77 (48,1%) мальчиков, девочек — 83 (51,9%).

При клинической оценке состояния новорожденных на первой минуте жизни было установлено, что состояние гипоксии легкой степени тяжести перенесли 130 новорожденных (81,3%), причем, оценка по шкале Апгар на первой минуте жизни составила $6,9 \pm 0,66$, на пятой минуте — $7,9 \pm 0,49$.

Без признаков асфиксии родились 26 (16,3%) детей, разницы между группами не наблюдалось. Стоит отметить, что обвитие пуповиной (как правило, нетугое обвитие шеи) зафиксировано у 50 новорожденных (31,3%).

На 3 сутки после рождения домой выписаны 36 детей (22,5%), на 4 сутки — 60 детей (37,5%), с 5 по 7 сутки домой выписаны 46 детей (28,8%).

В дальнейшем в наблюдении и лечении в условиях отделения патологии новорожденных и недоношенных детей нуждались 18 детей (11,3%).

На момент выписки из перинатального центра всего 33 ребенка (20,6%) имели статус «здоров», причем, 19 детей (57,6%) из контрольной группы, 13 детей (39,4%), рожденных от матерей с инфекцией урогенитального тракта (2 группа), 1 ребенок (3,0%) от матери с гестационным сахарным диабетом (1 группа).

У остальных новорожденных ранний неонатальный период имел патологическое течение: так, синдром новорожденного от матери с гестационным сахарным диабетом отмечен у 55 детей — 34,4% (1 и 3 группы); гипоксические нарушения центральной нервной системы установлены у 32 детей (20,0%), причем, 14 случаев (43,7%) — у детей из группы сравнения ($p < 0,05$). Неонатальная желтуха установлена у 25 новорожденных (15,6%), врожденная анемия отмечалась у 13 детей (8,1%), столько же случаев транзиторной гипогликемии. В 3 случаях в первые сутки после рождения лабораторно и клинически был установлен диагноз внутриутробной инфекции — пневмонии.

Все новорожденные, согласно Национальному календарю профилактических прививок, подлежат вакцинации против гепатита В в первые 24 часа после рождения, вакцинация против туберкулеза проводится на 3 — 7 сутки жизни.

Что касается вакцинации новорожденных против вирусного гепатита В и туберкулеза рассматриваемых групп в условиях перинатального центра, то вакцинацию в первые сутки против вирусного гепатита В получили 119 новорожденных (74,4% от подлежащих), у 38 детей (23,7%) мамы отказались от вакцинации, в 3 случаях (1,9%) по состоянию детей вакцинация была противопоказана (2 ребенка с диагнозом респираторного дистресс-синдрома,

ишемически-гипоксического поражения ЦНС, 1 ребенок — с признаками гемолитической болезни).

Наибольшая доля привитых против вирусного гепатита В в 1 группе — 32 ребенка (84,2%) и в 3 группе — 28 детей (82,1%). Достоверно большее число отказов от вакцинации в контрольной группе детей (34,5% от подлежащих вакцинации новорожденных).

Против туберкулеза вакцинация проводилась на 3 — 7 сутки жизни новорожденных вакциной БЦЖ. Из 160 новорожденных против туберкулеза были привиты 74 ребенка (46,3% от подлежащих), отказались от вакцинации своих детей 27 женщин (16,9%), медицинские отводы имели 40 детей (25,0% от подлежащих вакцинации), 19 детей (11,8%) не были вакцинированы против туберкулеза по причине ранней выписки из перинатального центра. Стоит отметить, что от вакцинации против вирусного гепатита В родители отказывались чаще, чем от вакцинации против туберкулеза.

Среди причин медицинских отводов от вакцинации против туберкулеза при выписке домой из перинатального центра большую долю занимает врожденная анемия — 13 случаев (32,5%), гематологические нарушения были у 5 детей — 12,5%, ринит был у 2 — 5%, у одного ребенка были явления тяжелой асфиксии, и у одного ребенка медицинский отвод был связан с дообследованием на предмет развития внутриутробной инфекции. Дети, переведенные в отделения патологии новорожденных и недоношенных (18 новорожденных), по клиническому состоянию не были привиты.

Наибольшая доля вакцинированных против туберкулеза детей была в 1 группе — 21 новорожденный (55,2%) и во 2 группе — 19 новорожденных (48,7%). Наибольшую долю медицинских отводов имели дети 3 группы (10 новорожденных — 35,7% от подлежащих). Дети, выписанные с диагнозом «здоров» (33 ребенка), в 75,7% были привиты против вирусного гепатита В и в 78,8% против туберкулеза, не привитыми остались дети с отказами матерей от вакцинации.

Что касается полного объема вакцинации (против вирусного гепатита В и туберкулеза) в перинатальном центре, то обе прививки получили 59 новорожденных (36,9% от подлежащих), только против гепатита В были привиты 60 новорожденных (37,5%), только против туберкулеза привиты 15 новорожденных (9,3%). Без вакцинации в перинатальном центре остались 26 новорожденных (16,3%).

Достоверно больше детей получили обе прививки в 1 группе — 20 (52,6%) новорожденных. Во 2 группе таких детей было 13 (33,3%), в 3 группе только 9 новорожденных (32,1%) получили две прививки. Большая доля непривитых новорожденных в перинатальном центре была в контрольной группе детей (13 новорожденных; 23,7%), в 1 группе таких детей было 5 — 13,2%, во 2, 3 группах по 4 новорожденных — 10,3 и 14,3% соответственно.

Стоит отметить, что мониторинг беременных с гестационным сахарным диабетом позволил контролировать уровень глюкозы в крови и проводить корректирующую терапию (диета, инсулинотерапия), дети этих пациенток имели меньшее количество медицинских отводов и в большей степени подлежали вакцинации против вирусного гепатита В и туберкулеза.

Разнообразие патологии у женщин до и во время беременности определяет нарастающее количество детей из групп риска, с осложненным течением раннего неонатального периода. Таким образом, процесс вакцинации в перинатальном центре имеет свои особенности: большое количество медицинских противопоказаний, и вследствие низкий охват первичной вакцинацией ново-

рожденных (против вирусного гепатита В и туберкулеза), не превышающий 40%.

Результаты проведенного анализа показывают, что дети с патологическим течением периода адаптации подлежат тщательному отбору на вакцинацию в условиях перинатального центра. Каждый ребенок требует индивидуального подхода с учетом состояния здоровья, и согласно этому решается вопрос о последовательности и графике прививок.

Большинство здоровых новорожденных вакцинируются согласно Национальному календарю прививок, за исключением тех детей, родители которых отказываются от прививок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксенов А.Н., Бочарова И.И., Башакин Н.Ф., Троицкая М.В., Якубина А.А., Букина М.Ю., Будыкина Т.С. Диагностика внутриутробных инфекций у новорожденных в раннем неонатальном периоде. Российский медицинский журнал. 2015, 1: 36-39.
2. Бочарова И.И., Аксенов А.Н., Башакин Н.Ф. Итоги и перспективы научных исследований по проблеме внутриутробной инфекции новорожденных. Российский вестник акушера-гинеколога. 2007, 5: 60-63.
3. Бурумкулова Ф., Петрухин В. Гестационный сахарный диабет: эндокринологические и акушерские аспекты. Врач. 2012, 9: 2-5.
4. Камаева Н.Г., Чугаев Ю.П., Гринберг Л.М., Камаев Е.Ю. Роль медицинских и социальных факторов в развитии костных осложнений при противотуберкулезной вакцинации. Сибирское медицинское обозрение 2011, 6: 62-64.
5. Краснопрошина Л.И., Севастьянова Т.А., Аксенова В.А., Серова Т.А., Бишева И.В., Сходова С.А., Зверев В.В. Роль иммунодефицитов в развитии осложнений при вакцинации детей БЦЖ-вакциной. Журн. микробиол. 2013, 6: 50-55.
6. Леви Д.Т., Позднякова А.С. Клинико-иммунологическая оценка состояния здоровья детей в период проведения вакцинации против туберкулеза. Российский педиатрический журнал. 2010, 4: 29-31.
7. Логугова Л.С., Петрухин В.А., Бочарова И.И., Бурумкулова Ф.Ф., Гурьева В.М., Аксенов А.Н., Башакин Н.Ф., Троицкая М.В., Павлович И.В., Мусорина Л.Н. Мониторинг новорожденных, родившихся у матерей с гестационным сахарным диабетом. Российский вестник акушера-гинеколога. 2013, 2: 89-94.
8. Санакоева Л.П. Клинико-иммунологическая оценка БЦЖ-вакцинового процесса и формирования противотуберкулезного иммунитета (клинико-экспериментальное исследование): Автореф. дис. д-ра мед наук. Пермь, 2007.
9. Стародубова В.И., Михайлова Ю.В., Иванова А.Е. Здоровье населения России в социальном контексте 90-х годов: проблемы и перспективы. М., Медицина, 2003.
10. Учайкин В.Ф., Шамшева О.В. Руководство по клинической вакцинологии. М., ГЭОТАР-Медиа, 2006.
11. Victoria J. P., Ofer Levy. Developmental biology of the innate immune response: implications for neonatal and infant vaccine development. *Pediatr. Res.* 2009, 65 (5 2): 98R-105R.

Поступила 05.07.16

Контактная информация: Кузнецова Ольга Алексеевна,
620028, Екатеринбург, ул.Репина, 1, р.т. (343) 371-87-68

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Е.П.Начарова¹, С.М. Харит¹, Ю.В. Лобзин¹, Н.И.Брико²

ПРИНЦИПЫ МОНИТОРИНГА НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ СОБЫТИЙ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ В РОССИИ И В МИРЕ

¹НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург, ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Показана разница в терминологии, принятой в нашей стране и зарубежом, для обозначения заболеваний поствакцинального периода. Представлен анализ существующих регламентирующих документов в РФ по вопросу регистрации неблагоприятных событий в поствакцинальном периоде и системы регистрации, принятой во многих странах мира и рекомендованной ВОЗ. В Российской Федерации согласно документам Роспотребнадзора обязательной регистрации подлежат только отдельные состояния (поствакцинальные осложнения). Согласно рекомендациям ВОЗ должны регистрироваться все неблагоприятные события в течение 1 месяца после вакцинации. Обобщение этих данных позволяет выявить взаимосвязь этих состояния с вакцинацией или доказать ее отсутствие.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 86—96

Ключевые слова: поствакцинальный период, неблагоприятные события, поствакцинальные осложнения, интеркуррентные заболевания, вакцинация

E.P.Nacharova¹, S.M.Kharit¹, Yu.V.Lobzin¹, N.I.Briko²

PRINCIPLES OF MONITORING OF ADVERSE EVENTS AFTER VACCINATION IN RUSSIAN FEDERATION AND THE WORLD

¹Research Institute of Childrens' Infections, St. Petersburg, ²Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Difference in terminology accepted in our and foreign countries for designating disease of post-vaccination period is shown. Analysis of the existing regulating documents in Russian Federation regarding registration of adverse events in post-vaccination period and system of registration accepted in many countries of the world and recommended by WHO is presented. In Russian Federation in accordance with the documents of the Federal Service of Surveillance for Protection of Consumers Rights and Human Welfare only certain conditions (post-vaccinal complications) are subject to registration. In accordance with WHO recommendations all adverse events taking place 1 month after the vaccination must be registered. Summarization of these data allows to detect interconnection between these conditions and vaccination or prove the lack thereof.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 86—96

Key words: post-vaccinal period, adverse events, post-vaccinal complications, inter-current diseases, vaccination

Еще в 1974 году ВОЗ сформулировала основные принципы массовой вакцинопрофилактики для эффективного контроля за важнейшими инфекционными заболеваниями. Снижение заболеваемости до спорадического или нулевого уровня возможно при охвате вакцинацией не менее 95%

населения, что требует государственных мер контроля проведения вакцинации. Данные цели в настоящее время достигнуты для таких заболеваний, как полиомиелит, дифтерия, столбняк. Планируется элиминация кори и краснухи к 2020 году. Начало XXI века характеризовалось массовым внедрением новых вакцин: конъюгированная пневмококковая, против ротавирусной и папилломавирусной инфекции, четырехвалентная конъюгированная менингококковая, вакцина против менингококка В [7, 9, 30, 39]. Однако снижение заболеваемости инфекциями привело к парадоксальному эффекту — ослаблению приверженности вакцинации, что может привести к эпидемическому неблагополучию, как было с эпидемией дифтерии в конце XX века, ростом заболеваемости коклюшем, корью в 2012 — 2015 гг. [35, 49]. Так, заболеваемость корью в России в 2012 и 2013 гг. составила 1,47 и 1,67 на 100 000 населения соответственно, в то время как в 2010 году она составляла 0,09 на 100 000, а в 2008 году — 0,02 на 100 000 [1, 3, 8]. Существуют и другие печально известные исторические примеры последствий отказа от массовой вакцинации на определенных территориях: вспышка коклюша в Японии в 1970-х годах, кори на Гаити в 2000-х, эпидемические вспышки кори на Американском континенте в 1990-х годах и последние годы, возникновение вспышек полиомиелита в Азербайджане, Туркменистане и Грузии в 1980-х годах, в 1990-х в Чеченской республике и в 2010 в Таджикистане [9]. Одной из причин возврата инфекций является снижение уровня привитости за счет антипрививочного настроения в обществе и даже у медицинских работников, связанного с неуверенностью в безопасности вакцин. Увеличение числа используемых вакцин создает необходимость тщательного мониторинга возникающих нежелательных явлений и осложнений [16]. Решение данного вопроса имеет не только медицинское, но и социально-экономическое значение и требует тесной кооперации медицинского сообщества, органов государственной власти и гражданского общества [10, 20, 21, 27, 40, 41].

Объективная оценка безопасности вакцин представляется весьма трудной из-за сложности установления причинно-следственной связи между проведением прививки и развитием конкретного заболевания или осложнения; необходимости единства терминологии при учете нежелательных явлений в разных странах; неизученности патогенетических механизмов их развития, а также возможности отсроченного во времени развития [2, 11, 13, 17, 31, 43]. В настоящее время в международной медицинской практике для регистрации изменений в состоянии здоровья после применения лекарственных препаратов, в том числе вакцин, используют термин *adverse effect* — неблагоприятное событие. Неблагоприятным событием (НС) могут быть минимальные изменения в состоянии здоровья, отклонения в результатах лабораторных анализов и заболевания, в том числе, послужившие причиной смерти пациента. НС могут иметь очевидную причинно-следственную связь с использованием препарата (данное событие хорошо известно, его связь с применением препарата подтверждена статистически, имеются данные о биологических механизмах развития НС), возможную (существуют данные относительно взаимосвязи между использованием препарата и НС, однако они недостаточны), неопределенную (связь либо не определялась, либо данные противоречивы) или быть не связанными с использованием препарата (доказано отсутствие причинно-следственной связи).

Связь с введенной вакциной определяется на основании критериев, предложенных еще в 1991 году ВОЗ: доказана временная взаимосвязь развития

с разгаром вакцинального процесса, имеется дозозависимая взаимосвязь, раскрыты биологические механизмы развития неблагоприятного события, данное состояние может быть воспроизведено в эксперименте, произведен учет альтернативных причин и статистически доказана их несостоятельность, рассчитана сила ассоциации заболевания с прививкой методом определения относительного риска, при прекращении использования вакцины неблагоприятное событие не регистрируется.

По тяжести выделяют серьезные и несерьезные неблагоприятные события. Серьезные неблагоприятные события (НС) подлежат обязательной регистрации. К ним относятся следующие состояния, развивающиеся в течение месяца после прививки (в некоторых случаях и позже): летальный исход; состояние, угрожающее жизни; заболевание, потребовавшее госпитализации; длительное нарушение состояния здоровья; инвалидизация, а также внутриутробные аномалии или пороки развития у плода при проведении вакцинации у матери. Связанные с вакцинацией НС развиваются крайне редко, имеют спорадический характер и не должны рассматриваться как основание для отказа от массовой вакцинации населения. Такие НС как лимфадениты, абсцессы, аллергические сыпи, фебрильные судороги встречаются с известной частотой. Так, лимфаденит, остейт и диссеминированная БЦЖ-инфекция регистрируются с частотой соответственно 1:1000 — 1:10 000, 1:3000 — 1:100 000 и 1:1 000 000. При использовании вакцины от кори, краснухи и паротита возможно развитие фебрильных судорог (1:30 000), тромбоцитопения (1:30 000), тяжелые аллергические реакции (1:100 000), энцефалит (1:1 000 000) [2]. Систематический обзор, объединивший результаты большого количества исследований и опубликованный в 2014 году, также подтвердил безопасность использования вакцин. Тем не менее, авторы отмечают, что, хотя поствакцинальные осложнения наблюдаются достаточно редко, в части случаев они могут иметь серьезный характер, и это обуславливает необходимость тщательного изучения их патогенеза с целью разработки эффективных мер профилактики и лечения [34].

Редкость развития НС требует тщательного мониторинга течения поствакцинального периода у больших групп населения, мирового сотрудничества и интеграции в этой области, стандартизации учета и терминологии. Кроме того, высокая частота использования вакцин в детском возрасте приводит к тому, что ребенок первого года жизни практически постоянно находится в поствакцинальном периоде и любые заболевания или отклонения в здоровье могут быть неправомерно расцениваться как связанные с проведенной вакцинацией. В связи с этим, эксперты ВОЗ рекомендуют регистрировать неблагоприятные события, возникающие в течение 1 месяца после проведения вакцинации, что позволяет накопить значительный фактический материал для проведения анализа безопасности отдельных вакцин [34].

Существуют разные варианты систем регистрации НС. В настоящее время в мире используются две системы постмаркетингового мониторинга безопасности вакцин — пассивная регистрация и активный надзор. Пассивная регистрация представляет собой систему спонтанных (необязательных) сообщений, которая формируют базу данных, используемую для последующего анализа и принятия решений о связи неблагоприятного события с вакцинацией. Активный надзор — обязательное выявление и регистрация всех неблагоприятных событий с расследованием каждого случая и установлением причинно-следственной связи с вакцинацией. Различие системы регистрации

и мониторинга течения поствакцинального периода в разных странах существенно затрудняет сравнение и получение обобщенных данных о безопасности конкретной вакцины [15, 26, 36, 47].

В большинстве стран мира действует система спонтанных сообщений, в некоторых странах она сочетается с активным мониторингом, который считается более эффективным [20, 33]. Интересный пример преимуществ активного мониторинга всех НС был получен в Сингапуре. В период с 2010 по 2012 гг. авторами было проанализировано более 56 000 случаев госпитализации детей с вероятными или возможными НС. Результаты исследования показали, что 98% являются легкими и не представляют серьезной опасности для здоровья. В то же время, введение системы мониторинга позволило впервые продемонстрировать, что использование вакцины БЦЖ приводит к 5-кратному увеличению риска развития регионарного лимфаденита и направить соответствующую информацию службам здравоохранения и производителям вакцины [44].

Одна из первых пассивных систем была создана в 1990 году в США — Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) — система спонтанных сообщений, направленная на регистрацию всех событий поствакцинального периода с целью дальнейшего анализа и получения подтверждений или опровержений об их связи с проведенной вакцинацией [24, 42, 47]. Работа VAERS основана на приеме сообщений о любых подозреваемых неблагоприятных событиях после введения любой вакцины, зарегистрированной и лицензированной к применению на территории США, и представляет собой классическую систему пассивного наблюдения. Сообщения принимаются от любых лиц (вакцинированных, родителей вакцинированных детей, опекунов, среднего медицинского персонала и врачей) и могут быть посланы любым способом (по электронной или обычной почте, по факсу). Работа системы основана на еженедельном анализе поступающей указанными способами информации, ее сортировке и последующей статистической обработке. Данные VAERS лишены личных идентификаторов и доступны общественности (<http://www.vaers.org>).

По данным William E. et al. в США в 2001 году было зарегистрировано 5420 случаев НС после вакцинации от коклюша, 290 случаев после вакцинации от гемофильной палочки типа В у детей до 5 лет, 226 случаев после вакцинации от эпидемического паротита, 108 случаев после вакцинации от кори и единичные при использовании вакцин от дифтерии, краснухи и столбняка. Общее число в течение года составило 6095. При сравнении с данными о частоте заболеваемости населения в довакцинальную эпоху (дифтерия — 175 тыс. случаев в год, корь — более 500 тыс. случаев, эпидемический паротит и коклюш — около 150 тыс. случаев, полиомиелит — 16 тыс., столбняк — 1314 случаев), а также с учетом снижения заболеваемости после введения вакцинации на 97,9 — 99,9%, преимуществва вакцинации, даже с учетом риска развития НС, становятся очевидными [46].

Данной системе также присущи и все недостатки, характерные для систем пассивного мониторинга, в частности, получение непроверенных и ложных сообщений, а также данных от лиц без специального медицинского образования. В то же время, отдельные случаи НС могут не вноситься в систему. Данные, полученные VAERS, в настоящее время активно используются для мониторинга безопасности иммунобиологических препаратов американским центром по контролю за заболеваниями — Centers for Disease Control and Prevention (CDC), управлением по санитарному надзору за качеством пищевых

продуктов и медикаментов — Food and Drug Administration (FDA) и другими, в том числе, общественными организациями [42, 47].

Работа VAERS позволила выявить взаимосвязь тромбоцитопении и вакцинации против гепатита В, гепатита А, гриппа, гемофильной и пневмококковой инфекции, кори, краснухи, паротита, полиомиелита, ветряной оспы, бешенства. Случаи госпитализации с тромбоцитопенией после иммунизации MMR-вакциной составляли от 3 до 4 случаев из 100 тыс. вакцинированных [48]. С момента развертывания большой кампании по иммунизации населения вакциной против вируса папилломы человека зафиксировано несколько случаев брахиальных плекситов, однако зависимости от вакцинации не выявлено. VAERS описывает около 120 случаев брахиальных плекситов после проведения вакцинаций другими вакцинами [47]. Также с началом вакцинации подростков квадριвалентной рекомбинантной вакциной против вируса папилломы человека и квадριвалентной менингококковой конъюгированной вакциной (MCV4) увеличилось число сообщений о синкопальных состояниях среди девушек в возрасте от 11 до 18 лет. При сравнении данных 2002 и 2007 гг. исследователи пришли к выводу, что количество женщин и детей с синкопальными состояниями после вакцинации выросло с 61,1 до 77,5% и с 47,3 до 62% соответственно. Однако статистически частота развития синкопе после вакцинаций и других инъекций оказалось идентичным, что позволило изменить первичный вывод о связи с вакцинацией и сделать доклад о том, что синкопе ассоциированы с эмоциональной и болевой реакцией на инъекцию [19]. В то же время, в странах, где используется система обязательных сообщений, например, в Австралии, синкопальные состояния рассматриваются как одно из наиболее частых НС поствакцинального периода [29]. Значительный интерес представляют также данные о частоте развития НС после вакцинации от сибирской язвы. Анализ введения более 6 млн доз вакцины в период с 1990 по 2007 гг. позволил выявить 4753 сообщения о развитии неблагоприятных явлений, которые в большинстве случаев (90%) были несерьезными, реже носили серьезный характер, в том числе отмечены летальные исходы (25 случаев смерти — 0,5%). Подавляющее большинство несерьезных НС были представлены местными реакциями в виде гиперемии кожи в месте введения вакцины, сохраняющейся в течение 5 — 10 дней, расцененными как связанные с вакцинацией. В то же время, анализ случаев летальных исходов продемонстрировал высокую вариабельность причин смерти — инфаркт миокарда, суицид, боковой амиотрофический склероз, онкологические заболевания, системная красная волчанка и другие и отсутствие связи летальных исходов с проведением вакцинации [38]. Многолетние наблюдения и большой объем данных позволили VAERS высказать предположение, что снижение слуха у детей после проведения вакцинации живой аттенуированной вакциной от кори и паротита (MMCV) является, вероятно, НС, однако частота его развития крайне низка и составляет не более одного случая на 6 — 8 млн доз вакцины [14].

В нашей стране применяется система активного надзора с подачей экстренных извещений через систему эпидемиологических бюро. Используется при постановке диагноза клиническая классификация, утвержденная в методических рекомендациях и указаниях Минздрава РФ. В поствакцинальном периоде выделяют: нормальные вакцинальные реакции (или нормальный вакцинальный процесс), под которыми понимают известные, стереотипные клинические и лабораторные изменения, связанные со специфическим

действием той или иной вакцины (частота их развития описана в инструкции к каждому медицинскому иммунобиологическому препарату) [2, 5, 6,].

Общие нормальные реакции (повышение температуры, слабость, головная боль, симптомы интоксикации, реакция со стороны тропных органов и систем при использовании живых вакцин). При повышении температуры тела до 37,5° реакция расценивается как слабая, от 37,6 до 38,5° — средней силы, выше 38,6° — сильные. Срок возникновения общих реакций совпадает с разгаром вакцинального процесса.

Нормальной местной реакцией (например, боль или отек в месте введения) считают, если отек, гиперемия, уплотнение вокруг места инъекции не превышает 8 см в диаметре. Местные реакции могут возникать сразу после введения вакцины.

Клинические расстройства, возникающие после проведения профилактической прививки и несвойственные обычному течению вакцинального процесса, имеющие с прививкой временную связь, расследуют как возможные поствакцинальные осложнения (ПВО) [2, 5, 6]. В соответствии с Федеральным законом от 17 сентября 1998 г. № 157-ФЗ «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней» к поствакцинальным осложнениям относят тяжелые и (или) стойкие нарушения состояния здоровья вследствие профилактических прививок: аллергические (местные и общие); осложнения с поражением нервной системы; редкие осложнения. В соответствии с методическими указаниями (МУ) [5]: любые заболевания, совпавшие с прививкой по времени, но не имеющие с ней этиопатогенетической связи расцениваются как осложненное течение поствакцинального периода. Регистрация заболеваний, расцененных как осложнение, в нашей стране осуществляется методом активного надзора согласно нормативным документам и законодательным актам Министерства Здравоохранения РФ. Основными задачами мониторинга являются: надзор за безопасностью МИБП в сфере их применения в практическом здравоохранении; выявление и регистрация ПВО, возникших в результате применения МИБП; определение характера и частоты ПВО для каждого применяемого препарата; выявление факторов риска развития (демографических, климатогеографических, социально-экономических, экологических, индивидуальных) ПВО после применения МИБП.

Регистрация заболеваний, подозрительных на ПВО, осуществляется медицинской организацией, осуществляющей прививочную деятельность, и информация направляется в департамент (управление) здравоохранения и ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии. Далее эти данные поступают в территориальные управления Роспотребнадзора и в настоящее время Росздравнадзора. Оценка качества мониторинга производится на основании своевременности, полноты и точности регистрации, оперативности эпидемиологического расследования после регистрации осложнения, эффективности мер, принятых после регистрации осложнения. По данным городской службы санэпиднадзора Санкт-Петербурга в 1999 году осложнения на прививки регистрировали при использовании вакцины АКДС — 1 случай на 12 287 прививок, противокоревой вакцины — 1:35 301 (все случаи — энцефалиты), вакцины против эпидемического паротита — 1:33 745, при использовании вакцины против полиомиелита поствакцинальных осложнений зарегистрировано не было [4, 11].

Несмотря на имеющиеся рекомендации регистрировать только случаи безусловных осложнений, перечисленных в МУ [5], имеется Постановление Правительства РФ от 02.08.1999 № 885 «Об утверждении перечня пост-

вакцинальных осложнений, вызванных профилактическими прививками, включенными в национальный календарь профилактических прививок, и профилактическими прививками по эпидемическим показаниям, дающих право гражданам на получение государственных единовременных пособий», обязывающее регистрировать целый ряд заболеваний, развившихся у привитых, которые, возможно, и не имеют связи с вакциной. В перечне этих заболеваний есть как ПВО, предусмотренные к регистрации МУ, так и заболевания, связь которых с вакцинацией не установлена.

В соответствии с данным постановлением регистрации подлежат: анафилактический шок; тяжелые генерализованные аллергические реакции (рецидивирующий ангионевротический отек — отек Квинке, синдром Стивена-Джонсона, синдром Лайела, синдром сывороточной болезни и т.п.); энцефалит; вакциноассоциированный полиомиелит; поражения центральной нервной системы с генерализованными или фокальными остаточными проявлениями, приведшими к инвалидности: энцефалопатия, серозный менингит, неврит, полиневрит, а также с клиническими проявлениями судорожного синдрома; генерализованная инфекция, остеоит, остит, остеомиелит, вызванные вакциной БЦЖ; артрит хронический, вызванный вакциной против краснухи.

Постановление Правительства РФ № 885 принципиально позволяет учитывать все серьезные состояния, требующие госпитализации, и летальные исходы, что принципиально соответствует международным требованиям, однако в практическом здравоохранении осуществляется регистрация только осложнений, определенных МУ [5]. Что приводит к кардинальным отличиям от международных подходов.

В течение длительного времени, согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ от 29.07.1998 № 230 «О повышении готовности органов и учреждений Госсанэпидслужбы России к работе в чрезвычайных ситуациях», ведущим учреждением нашей страны, осуществлявшим расследование случаев ПВО, являлся ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича» Минздравсоцразвития России (ГИСК). В соответствии с Распоряжением Правительства РФ от 17 ноября 2010 г. № 2058-р и Приказом Минздравсоцразвития РФ от 13 декабря 2010 г. № 1102 с 1 апреля 2011 г. данное учреждение присоединено к ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздравсоцразвития РФ (НЦЭСМП) с формированием Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов (ЦЭК МИБП). С 2010 года регистрация НС передана в Росздравнадзор и введена система и терминология международного фармакологического надзора при учете НС после применения любых лекарственных препаратов, в том числе вакцин. При развитии НС, как и в системе международного надзора, рекомендуется определить, связано ли оно со свойствами самого иммунобиологического препарата, программными ошибками, индивидуальными особенностями организма привитого пациента. На возможную связь с качеством вакцины указывает развитие идентичных НС у лиц, привитых разными медицинскими работниками, при использовании вакцин одной серии или выпущенных одним производителем. К программным ошибкам относят нарушение правил введения препарата, температурного режима хранения или транспортировки вакцины. Индивидуальные особенности пациента могут включать аллергические реакции в анамнезе, иммунодефицитное состояние, тяжелые хронические заболевания.

Статистические данные по частоте одних и тех же заболеваний у привитых и непривитых лиц указывают на отсутствие связи между вакцинацией и НС [12].

В нашей стране в отличие от многих стран мира затруднена статистическая оценка связи НС с вакцинацией, в связи с тем, что мы не имеем статистики многих фоновых состояний (частота фебрильных и афебрильных судорог, тех или иных аллергических реакций и т.д. у разных групп населения).

На сегодняшний день в РФ система регистрации вакцин регламентируется Федеральным законом от 12.04.2010 N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». К применению допускаются вакцины, прошедшие регистрацию, которая включает экспертизу нормативной документации, доклинические и клинические испытания вакцины, выдачу фирме регистрационного удостоверения с внесением лекарственного препарата (вакцины) в Государственный реестр лекарственных средств. К регистрации в России принимаются только вакцины, зарегистрированные в стране-изготовителе или имеющие экспортную лицензию национального органа контроля страны-экспортера.

Важность постмаркетингового мониторинга за НС при использовании отечественных и зарубежных вакцин определяется тем, что на стадии клинических и предрегистрационных исследований возможно выявить НС, возникающие с частотой 1 на 1000 доз вакцины. Таким образом, результативность системы активного постмаркетингового надзора в РФ невелика. Согласно письму главного санитарного врача 01/11140-1-32 от 31.08.2011 «О регистрации поствакцинальных осложнений в Российской Федерации в 2010 году», основанного, в том числе, на данных формы учета номер 2, введенной Федеральным законом Российской Федерации от 29 ноября 2007 года № 282-ФЗ «Об официальном статистическом учете и системе государственной статистики в Российской Федерации», за 2010 г. зарегистрировано только 11 случаев СНС, что значительно отличается от частоты регистрации с помощью системы спонтанных сообщений, а общее число рекламаций составило 639. К примеру, в США ежегодно регистрируется более 6000 сообщений о НС и не менее 376 случаев подлежат компенсации. По данным Американского центра по контролю за заболеваниями с 2006 по 2014 гг. было сделано более 2,5 миллиардов доз вакцин и 3389 сообщений о неблагоприятных событиях расследовались в суде. Показано, что на каждый 1 миллион доз вакцин у 1 человека регистрируется СНС, которое подлежит компенсации [37]. Исходя из разницы численности населения в США и РФ расчетное число ежегодных сообщений о СНС в нашей стране должно составлять не менее 2800. Кроме того, с 2010 года не публикуются данные о структуре НС, зарегистрированных после введения тех или иных вакцин и их клинических проявлений.

Появление новых технологий позволило разработать эффективные методики мониторинга НС с использованием электронной почты и смартфонов. Примером подобной системы является система Vaxtracker, концепция которой была разработана в 2011 году, а сама система в экспериментальном режиме работала в течение 2012 года в Австралии. В основе функционирования системы Vaxtracker лежит мониторинг поствакцинального периода у привитых детей посредством рассылки электронных сообщений с использованием электронной почты или смартфонов родителей, или опекунов привитых детей. Пилотные исследования системы, апробированные при вакцинации против гриппа, показали, что на активные запросы отвечают 57 — 61% респондентов, что позволяет сформировать репрезентативную выборку

для оценки частоты и характера НС [18]. Сходные данные были получены и A. Leeb et al.: на SMS-сообщения отвечает более 70% респондентов в течение 2 часов после получения, что позволяет рассматривать данный метод как высокоэффективный в отслеживании неблагоприятных явлений поствакцинального периода [32].

Современные системы мониторинга, активные и пассивные, позволяют тщательно отслеживать безопасность использования вакцинных препаратов, выявлять новые ПВО, быстро реагировать на поступление некачественной серии вакцин от конкретного производителя. Однако многие авторы отмечают одно важное преимущество систем спонтанных сообщений: вовлеченность общественности, что может сыграть решающую роль в поддержании доверия к системе обеспечения безопасности и контроля качества вакцинных препаратов [25, 45].

Представленный анализ показывает, что на сегодняшний день в нашей стране для улучшения оценки безопасности вакцин система активного надзора должна быть модернизирована, возможно, с помощью расширения использования спонтанных сообщений, современных технологий и внедрения международной терминологии. Это позволит получить объективные статистические данные о частоте и связи НС с конкретными вакцинами, выявить редкие и крайне редкие НС, разработать меры их профилактики, повысить приверженность вакцинации у населения и у самих медицинских работников.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев К. И. Корь: что впереди — ликвидация инфекции или эпидемия? Медицинская сестра. 2012, 7: 9-13.
2. Лакоткина Е.А., Харит С.М., Черняева Т.В. и др. Поствакцинальные осложнения (клиника, диагностика, лечение, профилактика): Пособие для практического врача. М., 2004.
3. Лыткина И.Н., Заволжских А.М. Современные особенности эпидемиологии коревой инфекции в условиях мегаполиса. Педиатрия. 2013, 1: 15-17.
4. Львова И.И., Фельдблюм И.В., Корюкина И.П. и др. Мониторинг событий поствакцинального периода. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2004, 5: 2-14.
5. Методические указания МУ 3.3.1.1123-02 3.3.1. Вакцинопрофилактика. Мониторинг поствакцинальных осложнений и их профилактика. Методические указания (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 26.05.2002). http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_100503/.
6. Методические указания МУ 3.3.1879-04. Расследование поствакцинальных осложнений (утв. главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.2004). <http://www.hrsa.gov/vaccinecompensation/data/statisticsreport.pdf>.
7. Семенов Б.Ф., Лябис О.И., Михайлова Н.А. Основные этапы развития вакцинологии и вакцинопрофилактики. Вакцины и вакцинация: Национальное руководство. Под ред. В.В. Зверева, Б.Ф. Семенова, Р.М. Хаитова. М., ГЭОТАР-Медиа, 2011, с. 18-25.
8. Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г., Цвиркун О.В. и др. Причины роста заболеваемости корью в России в период элиминации инфекции. Педиатрия. 2013, 1: 9-14.
9. Учайкин В.Ф., Шамшева О.В. Вакцинопрофилактика: настоящее и будущее. М., 2006.
10. Харит С.М. Вакцинопрофилактика: проблемы и перспективы. Журн. инфектологии. 2009, 1 (1): 61-65.
11. Харит С.М., Черняева Т.В., Лакоткина Е.А. Структура заболеваний поствакцинального периода (анализ наблюдений за 40 лет). Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 2 (51): 64-69.
12. Ясинский А.А. Законодательные аспекты вакцинопрофилактики. Вакцины и вакцинация: Национальное руководство. Под ред. В.В. Зверева, Б.Ф. Семенова, Р.М. Хаитова. М., ГЭОТАР-Медиа, 2011, с. 826-831.

13. Ясинский А.А., Михеева И.В. Безопасность иммунизации. Вакцины и вакцинация: Национальное руководство. Под ред. В.В. Зверева, Б.Ф. Семенова, Р.М. Хаитова. М., ГЭОТАР-Медиа, 2011, с. 137-162.
14. Asatryan A., Pool V., Chen R.T. et al. Live attenuated measles and mumps viral strain-containing vaccines and hearing loss: Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), United States, 1990 — 2003. *Vaccine*. 2008, 26 (9): 1166-1172.
15. Bonhoeffer J., Zimbrunn B., Heininger U. Reporting of vaccine safety data in publications: systematic review. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 2005, 14 (2): 101-106.
16. Boyd S.D., Jackson K.J. Predicting vaccine responsiveness. *Cell. Host. Microbe*. 2015, 17 (3): 301-307.
17. Boyman O., Comte D., Spertini F. Adverse reactions to biologic agents and their medical management. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014, 10 (10): 612-627.
18. Cashman P., Moberley S., Dalton C. et al. Vaxtracker: Active on-line surveillance for adverse events following inactivated influenza vaccine in children. *Vaccine*. 2014, 32 (42): 5503-5508.
19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Syncope after vaccination — United States, January 2005–July 2007. *MMWR*. 2008, 57 (17): 457-460.
20. Crawford N.W., Clothier H., Hodgson K. et al. Active surveillance for adverse events following immunization. *Expert. Rev. Vaccines*. 2014, 13 (2): 265-276.
21. Fine P. Science and society: vaccines and public health. *Public Health*. 2014, 128 (8): 686-692.
22. Global Advisory Committee on Vaccine Safety (GACVS); WHO secretariat. Global safety of vaccines: strengthening systems for monitoring, management and the role of GACVS. *Expert. Rev. Vaccines*. 2009, 8 (6): 705-716.
23. Greenwood B. The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philos Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2014, 369 (1645): 20130433.
24. Haber P., Iskander J., Walton K. et al. Internet-based reporting to the vaccine adverse event reporting system: a more timely and complete way for providers to support vaccine safety. *Pediatrics*. 2011, 127 (Suppl. 1): 39-44.
25. Halsey N.A., Edwards K.M., Dekker C.L. et al. Algorithm to assess causality after individual adverse events following immunizations. *Vaccine*. 2012, 30 (39): 5791-5798.
26. Huang Y.L., Moon J., Segal J.B. A comparison of active adverse event surveillance systems worldwide. *Drug Saf.* 2014, 37 (8): 581-596.
27. Jarrett C., Wilson R., O'Leary M. et al. Strategies for addressing vaccine hesitancy — A systematic review. *Vaccine*. 2015, 33 (34): 4180-4190.
28. Jones P.G., Cowan G., Gravendyck M. et al. Regulatory requirements for vaccine authorisation. *Rev. Sci. Tech.* 2007, 26 (2): 379-393.
29. Lawrence G., Gold M.S., Hill R. et al. Annual report: surveillance of adverse events following immunisation in Australia, 2007. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 2008, 32 (4): 371-387.
30. Leca M., Bornet C., Montana M. et al. Meningococcal vaccines: Current state and future outlook. *Pathol. Biol. (Paris)*. 2015, 63 (3): 144-151.
31. Lee C.J., Lee L.H., Lu C.H. Safety monitoring in vaccine development and immunization. *Acta Paediatr. Taiwan*. 2006, 47 (1): 7-13.
32. Leeb A., Regan A.K., Peters I.J. et al. Using automated text messages to monitor adverse events following immunisation in general practice. *Med. J. Aust.* 2014, 200 (7): 416-418.
33. Lopalco P.L., Johansen K., Ciancio B. Monitoring and assessing vaccine safety: a European perspective. *Expert. Rev. Vaccines*. 2010, 9 (4): 371-380.
34. Maglione M.A., Das L., Raaen L. et al. Safety of vaccines used for routine immunization of U.S. children: a systematic review. *Pediatrics*. 2014, 134 (2): 325-337.
35. McNeil M.M., Gee J., Weintraub E.S. et al. The Vaccine Safety Datalink: successes and challenges monitoring vaccine safety. *Vaccine*. 2014, 32 (42): 5390-5398.
36. Muehlhans S., Richard G., Ali M. et al. Safety reporting in developing country vaccine clinical trials—a systematic review. *Vaccine*. 2012, 30 (22): 3255-3265.
37. National Vaccine Injury Compensation Program Data Report — March 1, 2016.
38. Niu M.T., Ball R., Woo E.J. et al. Adverse events after anthrax vaccination reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), 1990-2007. *Vaccine*. 2009, 27 (2): 290-297.
39. Perez N., Giaquinto C., Du Roure C. et al. Rotavirus vaccination in Europe: drivers and barriers. *Lancet Infect. Dis.* 2014, 14 (5): 416-425.

40. Rappuoli R., Pizza M., Del Giudice G. et al. Vaccines, new opportunities for a new society. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2014, 111 (34), 6: 12288-12293.
41. Schuster M., Eskola J., Duclos P. et al. Review of vaccine hesitancy: Rationale, remit and methods. *Vaccine.* 2015, 33 (34): 4157-4160.
42. Shimabukuro T.T., Nguyen M., Martin D. et al. Safety monitoring in the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). *Vaccine.* 2015, pii: S0264-410X(15)00982-2.
43. Soriano A., Neshet G., Shoenfeld Y. Predicting post-vaccination autoimmunity: who might be at risk? *Pharmacol. Res.* 2015, 92: 18-22.
44. Thoon K.C., Soh S.B., Liew W.K. et al. Active surveillance of adverse events following childhood immunization in Singapore. *Vaccine.* 2014, 32 (39): 5000-5005.
45. Tozzi A.E., Asturias E.J., Balakrishnan M.R. et al. Assessment of causality of individual adverse events following immunization (AEFI): a WHO tool for global use. *Vaccine.* 2013, 31 (44): 5041-5046.
46. William S.E., Barlow Ph.D., Robert L. Davis et al. The risk of seizures after receipt of whole-cell pertussis or measles, mumps, and rubella vaccine. For the Centers for Disease Control and Prevention Vaccine Safety Datalink Working Group. *The New England Journal of Medicine.* 2001, 345: 656-661.
47. Williams S.E., Klein N.P., Halsey N. et al. Overview of the Clinical Consult Case Review of adverse events following immunization: Clinical Immunization Safety Assessment (CISA) network 2004-2009. *Vaccine.* 2011, 29 (40): 6920-6927.
48. Woo E.J., Wise R.P., Menschik D. et al. Thrombocytopenia after vaccination: case reports to the US vaccine adverse event reporting system, 1990 — 2008. *Vaccine.* 2011, 29: 1319-1323.
49. Yaqub O., Castle-Clarke S., Sevdalis N. et al. Attitudes to vaccination: a critical review. *Soc. Sci. Med.* 2014, 112: 1-11.

Поступила 16.06.16

Контактная информация: Начарова Елена Петровна, к.м.н.,
197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 9, р.т. (815)234-60-04

© И.В.ГЛАДЫШЕВА, С.В.ЧЕРКАСОВ, 2017

И.В.Гладышева, С.В.Черкасов

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОРИНЕБАКТЕРИЙ РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА ЖЕНЩИН

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург

Проанализированы данные литературы и результаты собственных экспериментальных исследований по биологическим свойствам коринебактерий репродуктивного тракта женщин. Дана общая характеристика микроорганизмов. Представлено 20 видов коринебактерий: *C. amycolatum*, *C. aquaticum*, *C. aurimucosum*, *C. bovis*, *C. glucuronolyticum*, *C. coyleae*, *C. freneyi*, *C. jeikeium var. genitalium*, *C. jeikeium var. pseudogenitalium*, *C. lipophiloflavum*, *C. kutscheri*, *C. minutissimum*, *C. nigricans*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. renale*, *C. striatum*, *C. tuberculostearicum* (lipophile) (includes most CDC group G-2 strains), *C. xerosis*, *C. urealyticum*. Рассмотрены механизмы и факторы, обеспечивающие коринебактериям возможность существования в вагинальном биотопе независимо от микрoэкологического состояния — наличие высокой резистентности к факторам врожденного иммунитета (лизозиму, комплементу, иммуноглобулинам), pH зависимая адгезия к фибронектину и к вагинальным эпителиоцитам. Описана роль фибронектина в адгезии бактерий к вагинальным эпителиальным клеткам. Показано, что экзометаболиты коринебактерий, подавляя каталазу условно патогенных микроорганизмов-симбионтов, способствуют максимальной реализации антагонистической активности вагинальных пероксидпродуцирующих лактобацилл, непосредственно оказывая влияние на численность и структуру популяции бактерий за счет подавления прироста и биопленкообразования. Приведенные материалы свидетельствуют о существенной роли коринебактерий в реализации физиологического феномена — колонизационной резистентности и позволяют нам рассматривать эти микроорганизмы как неотъемлемую часть нормальной микробиоты репродуктивного тракта женщины.

Ключевые слова: *Corynebacterium* spp., факторы персистенции, фибронектин, вагинальные эпителиоциты, адгезия, антагонистическая активность, репродуктивный тракт женщины, колонизационная резистентность

I.V.Gladysheva, S.V.Cherkasov

PHYSIOLOGICAL FEATURES OF CORYNEBACTERIA OF FEMALE REPRODUCTIVE TRACT

Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

Literature data and results of authors' research on biological properties of corynebacteria of reproductive tract of women are analyzed. General characteristics of microorganisms is given. 20 species of corynebacteria are presented: *C. amycolatum*, *C. aquaticum*, *C. aurimucosum*, *C. bovis*, *C. glucuronolyticum*, *C. coyleae*, *C. freneyi*, *C. jeikeium* var. *genitalium*, *C. jeikeium* var. *pseudogenitalium*, *C. lipophiloflavum*, *C. kutscheri*, *C. minutissimum*, *C. nigricans*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. renale*, *C. striatum*, *C. tuberculostearicum* (lipophile) (includes most CDC group G-2 strains), *C. xerosis* and *C. urealyticum*. Mechanisms and factors ensuring the ability of corynebacteria to exist in vaginal biotope regardless of microecological condition — the presence of high resistance to factors of innate immunity (lysozyme, complement, immunoglobulins), pH-dependent adhesion to fibronectin and vaginal epitheliocytes — are examined. The role of fibronectin in adhesion of bacteria to vaginal epithelial cells is described. Corynebacteria exometabolites are shown to facilitate maximal realization of antagonistic activity of vaginal peroxide-producing lactobacilli by suppressing catalase of opportunistic microorganisms-symbionts, that directly influences the quantity and structure of bacterial population by suppressing growth and biofilm-formation. The materials provided give evidence on the significant role of corynebacteria in realization of physiological phenomenon — colonization resistance and allow us to examine these microorganisms as an integral part of normal microbiota of woman reproduction tract.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 96–107

Key words: *Corynebacterium* spp., persistence factors, fibronectin, vaginal epitheliocytes, adhesion, antagonistic activity, woman reproductive tract, colonization resistance

Род *Corynebacterium* spp., известный также как дифтероиды, или коринеформы, объединяет разнообразную группу микроорганизмов, занимающих различные биотопы тела человека. Обычно данный род микроорганизмов рассматривают в качестве возбудителей дифтерии и дифтериеподобных заболеваний у человека [10, 23, 39, 47]. В зависимости от биологических особенностей разные виды коринебактерий способны поражать кожу и внутренние органы, особенно у пожилых людей, пациентов с иммуносупрессией или мультиорганной патологией. Многие из них становятся причиной септического артрита и остеомиелита, инфекций при протезировании, заболеваний мочеполовой системы, эндокардитов, пневмоний [24, 25, 34, 46]. Наряду с тем, что микроорганизмы рода *Corynebacterium* играют роль в развитии инфекции у человека, в последнее время появляются сведения о важной роли отдельных представителей данной группы микроорганизмов в формировании микробиоценозов различных биотопов тела человека. Накопленный фактический материал относительно антагонистической активности коринебактерий по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам, открытие у них способности к продукции бактериоцинов, бактериоцинподобных субстанций, биосурфактантов позволило в последние годы взглянуть на коринебактерии с противоположных позиций [27, 40, 45]. Все больше появляется

сведений об участии микроорганизмов рода *Corynebacterium* spp. в поддержании колонизационной резистентности различных биотопов тела человека [2, 12, 13, 18]. Отдельные штаммы коринебактерий рекомендуют использовать в качестве пробиотических микроорганизмов [20, 22, 36]. Кроме того, ведутся исследования по применению коринебактерий в качестве иммуномодуляторов при иммунотерапии опухолей [33].

В вагинальном биотопе непатогенные коринебактерии встречаются у женщин независимо от возраста и микрoэкологического состояния биотопа. У девочек до наступления пубертатного периода непатогенные коринебактерии наряду с эпидермальным стафилококком составляют основную долю — 80% всей вагинальной микробиоты [9]. В период полового созревания, когда в вагинальном биотопе преобладают лактобациллы, количество непатогенных коринебактерий снижается, но, вместе с тем, они составляют большую часть среди других микроорганизмов. Их количество также возрастает у беременных и родильниц [12, 13]. Коринебактерии обнаруживаются и при различных дисбиотических состояниях репродуктивного тракта женщин [6, 16, 19]. Несмотря на высокую частоту встречаемости коринебактерий в вагинальном биотопе, вопрос об их роли среди исследователей до сих пор остается дискуссионным.

В обзоре мы обобщили данные литературы и результаты собственных исследований относительно биологических свойств коринебактерий, выделенных из репродуктивного тракта женщин, и попытались оценить их роль в занимаемом биотопе.

Коринебактерии относятся не только к традиционно трудноизолируемой, но и труднодифференцируемой, сложной в таксономическом отношении, группе микроорганизмов [21]. По данным литературы в вагинальном биотопе

Видовой спектр микроорганизмов рода *Corynebacterium* spp., выделенных из репродуктивного тракта женщин

Виды	Литературный источник
<i>C.amycolatum</i>	[1, 16, 17]
<i>C.aquaticum</i>	[7, 12, 13]
<i>C.aurimucosum</i>	[52]
<i>C.bovis</i>	[12, 13, 17]
<i>C.glucuronolyticum</i>	[10, 28]
<i>C.coyleae</i>	[17, 29]
<i>C.freneyi</i>	[30]
<i>C.jejikeium</i> var. <i>genitalium</i>	[8, 12, 13]
<i>C.jejikeium</i> var. <i>pseudogenitalium</i>	[8, 12, 13, 32]
<i>C.lipophiloflavum</i>	[31]
<i>C.kutscheri</i>	[8, 13]
<i>C.minutissimum</i>	[1, 12, 13, 15, 17]
<i>C.nigricans</i>	[49]
<i>C.pseudodiphtheriticum</i>	[13, 17]
<i>C.pseudotuberculosis</i>	[13, 16]
<i>C.renale</i>	[8, 13, 17]
<i>C.striatum</i>	[16, 17]
<i>C.tuberculostearicum</i> (lipophile) (includes most CDC group G-2 strains)	[35]
<i>C.xerosis</i>	[6–8, 10, 13, 16]
<i>C.urealyticum</i>	[1, 10, 17]

было выделено около 20 видов непатогенных коринебактерий (табл.).

Коринебактерии имеют форму прямых или слегка изогнутых палочек с заостренными иногда булавовидными концами 0,3 — 0,8×1,5 — 8,0 мкм; характерными признаками этих бактерий являются полиморфизм — наличие, помимо типичных палочек, длинных, коротких, ветвящихся форм [14]. Как правило, одиночные или в парах, часто V-образной конфигурации либо в стопках (палисад) из нескольких параллельно лежащих клеток. Грамположительные, хотя некоторые клетки окрашиваются неравномерно (вид «четок»). Внутри клеток, как правило, образуются метакроматиновые гранулы поли-

метафосфата. Неподвижные, неспорообразующие, некислотоустойчивые, каталазоположительные. По типу дыхания одни из них — облигатные аэробы, другие — факультативные анаэробы либо строгие анаэробы. Оптимальная температура для роста большинства видов 35 — 37°C, для некоторых видов оптимальное значение рН 4,3 — 4,5, для других рН 7,6 — 7,8. Для выращивания используют сывороточные среды и среды с теллуридом калия: кровяно-теллуридовые, сывороточно-теллуридовые, для некоторых видов необходимо наличие в среде Твин-80. В зависимости от видовой принадлежности, коринебактерии на средах образуют колонии круглые, выпуклые, гладкие (редко шероховатые), матовые или слегка блестящие, сероватые, беловато-кремовые до светло-желтых, желтые; некоторые штаммы образуют черный пигмент [47]. Костюковская О.Н. и др. [8] и Мартикайнен З.М. [12] классифицировали коринебактерии, выделенные из репродуктивного тракта женщин, независимо от микробиологического статуса, на макрокоринеформы и микрокоринеформы. Макрокоринеформы образуют чаще средние и крупные колонии диаметром 1 — 4 мм, непрозрачные, серые или кремовые (иногда желтоватые), чаще с неровными, нередко ажурными краями и выпуклым в виде шарика центром, диаметром 0,5 мм, матовые, сухие, ломкие, крошащиеся (R-формы) или серые, гладкие с ровными краями и белым выпуклым центром, блестящие, влажные, немного вязкие (S-формы). Микрокоринеформы — мелкие, диаметром 0,5 — 1,0 мм, белого и серого цвета с серебристым оттенком, выпуклые с ровными краями. Макрокоринеформы авторы отнесли к представителям нормальной резидентной микрофлоры влагалища. Типичными представителями по данным Мартикайнен З.М. были *S. aquaticum* и *S. minutissimum*. Микрокоринеформами условно обозначали *S. genitalium* и *S. pseudogenitalium*.

Коринебактерии — хемоорганотрофы. Основной конечный продукт у большинства видов при сбраживании глюкозы — L(+) — молочная кислота. Также коринебактерии при сбраживании мальтозы, галактозы, лактозы, сахарозы, маннита, ксилозы продуцируют уксусную, муравьиную, пропионовую, пировиноградную, янтарную кислоты и следы этанола [29, 51]. Пропионовую кислоту продуцируют *S. amycolatum*, *S. glucuronolyticum*. Коринебактерии *S. minutissimum*, *S. striatum*, *S. matruchotii* ферментируют эскулин [29]. Виды *S. renale*, *S. urealyticum* обладают наличием фермента уреазы [24].

Первоначальной ступенью колонизации вагинального биотопа коринебактериями является адгезия. Способность прикрепляться к поверхности эукариотических клеток макроорганизма обеспечивает их сохранение в биотопе и реализацию своих биологических свойств при взаимодействии с макроорганизмом.

При изучении адгезивной активности коринебактерий, выделенных из репродуктивного тракта женщин, на клетках вагинального эпителия было установлено, что штаммы, выделенные как у здоровых женщин (*S. aquaticum* и *S. jeikeium* var. *genitalium*), так и у женщин с воспалительными заболеваниями влагалища (*S. kutscheri* и *S. jeikeium* var. *genitalium*) обладали небольшой адгезивной активностью. Штаммы *S. aquaticum*, *S. jeikeium* var. *genitalium*, *S. vitrumen*, *S. minutissimum* и *S. xerosis*, выделенные у рожениц, обладали высокой адгезивной активностью к клеткам вагинального эпителия [13]. Автор предположила, что, вероятно, в раннем послеродовом периоде на фоне восстановления вагинального микробиоценоза происходит усиление рецепторной активности клеток коринеформных и нокардиоподобных бактерий, которое необходимо для осуществления полноценной колонизации вагиналь-

ного биотопа. Возрастание адгезивной активности также может быть связано с активизацией процессов взаимодействия поверхностных бактериальных структур с комплементарными им рецепторами на клетках вагинального эпителия. Нами была выявлена зависимость адгезивной способности коринебактерий к вагинальным эпителиоцитам от микроэкологического состояния биотопа. В условиях нормоценоза были выделены коринебактерии, обладающие низкой, средней и высокой адгезивной способностью. При микроэкологических нарушениях преобладали в основном низкоадгезивные штаммы коринебактерий, при отсутствии высокоадгезивных [4].

Нами описана фибронектинсвязывающая способность у вагинальных изолятов коринебактерий. К фибронектину адгезировались 100% штаммов, выделенных у здоровых женщин, и 66,7% штаммов, выделенных у женщин с микроэкологическими нарушениями. При этом коэффициент адгезии у штаммов, выделенных у здоровых женщин, был достоверно выше. Наиболее выраженной способностью связывать фибронектин человека обладали штаммы *S. minutissimum*, *S. amycolatum*, выделенные у здоровых женщин. Минимальной адгезивной способностью обладал штамм *S. afermentans*, выделенный при микроэкологических нарушениях. Было показано, что адгезия коринебактерий к фибронектину зависела от уровня pH и достигала наиболее высоких показателей при низких значениях этого фактора. При этом адгезивная способность коринебактерий к фибронектину под влиянием температуры, ультрафиолетового облучения, трипсина, маннозы и хлорамфеникола достоверно снижалась. Учитывая подавление адгезии у коринебактерий протеазами (в частности трипсином), хлорамфениколом — ингибитором синтеза белка и углеводами (маннозой), мы высказали предположение о том, что у исследуемых штаммов медиаторами адгезии выступают адгезины белковой природы, возможно, лектины, что предполагает наличие адгезии коринебактерий к различным структурам на поверхности вагинального эпителия [3]. Полученные результаты легли в основу разработки «Способа усиления адгезии бактерий к вагинальным эпителиоцитам», основанного на предварительной обработке эпителиоцитов фибронектином [5].

Способность коринебактерий адгезироваться к вагинальным эпителиоцитам и связывать белки межклеточного матрикса, в частности, фибронектин, характеризует их как высокоадгезивные микроорганизмы. Данное свойство позволяет коринебактериям конкурировать за сайты адгезии с условно патогенными микроорганизмами и существовать в вагинальном биотопе как в условиях нормо-, так и патоценоза.

С одной стороны, высокую адгезивную способность коринебактерий к белкам межклеточного матрикса можно расценить как фактор патогенности, так как известно, что специфичность такого рода адгезии позволяет штаммам бактерий не только выживать в микробиоценозах, но и проявлять свои патогенные свойства. Так, выявлен фибронектин связывающий белок у *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes*, играющий ключевую роль в персистенции данных микроорганизмов и развитии инфекций у человека [38, 42]. С другой стороны, увеличение способности связывания фибронектина у вагинальных непатогенных штаммов коринебактерий при низких значениях pH может играть роль в поддержании колонизационной резистентности вагинального биотопа. Сходные данные были получены при изучении адгезии вагинальных лактобацилл к фибронектину [41, 44]. Важно, что коринебактерии, как и лактобациллы, благодаря продукции органических кислот, сами поддерживают низкий уровень pH [29].

Существование коринебактерий в вагинальном биотопе определяется способностью ими секретировать различные субстанции, направленные на инактивацию факторов местного иммунитета хозяина.

Одинцова О.В. [13], исследуя антилизоцимную (АЛА) и антикомплементарную активность (АКА) коринеформных бактерий, выделенных от здоровых женщин, родильниц и женщин с воспалительными процессами влагалища неспецифической этиологии, показала, что данными свойствами обладают следующие виды: *C. aquaticum*, *C. jeikeium* var. *genitalium*, *C. kutscher*, *C. xerosis*, *C. jeikeium* var. *pseudogenitalium*, *C. minutissimum* и *C. pseudodiphtheriticum*. Культуры с АЛА чаще встречались у больных и родильниц. При этом средний уровень выраженности признака был невысоким и незначительно отличался во всех группах наблюдения. Распространенность и выраженность АКА были высокими независимо от состояния вагинального микробиоценоза. Автор предположила, что низкая частота АЛА среди культур, выделенных от здоровых женщин, и высокая частота АЛА культур, полученных от родильниц, в сочетании с малой выраженностью данного признака может определяться как необходимый фактор для закрепления коринеформ в качестве резидентной микрофлоры. В то же время, высокая частота встречаемости культур с АКА среди коринеформных бактерий в сочетании с высокой выраженностью признака отражает адаптационные способности данных микроорганизмов и способствует длительной персистенции коринеформных бактерий в вагинальном микробиоценозе.

Константинова О.Д. [7] описала высокую распространенность АЛА и АКА у клинических изолятов вагинальных коринебактерий, выделенных как у здоровых женщин, так и у женщин с эндометритами. В популяционной структуре *Сorynebacterium* spp. были представлены клоны с различной выраженностью указанных признаков.

В наших исследованиях [3, 17] также была выявлена высокая распространенность антилизоцимной и антикомплементарной активности среди клинических изолятов коринебактерий. Причем распространенность признаков не зависела от микрoэкологического состояния биотопа, при котором исследуемые микроорганизмы были выделены. Уровень выраженности антилизоцимной активности у штаммов, выделенных при дисбиозе, был выше по сравнению со штаммами, выделенными от здоровых женщин. Уровень выраженности антикомплементарной активности у коринебактерий, выделенных как у здоровых женщин, так и у женщин с микрoэкологическими нарушениями был высоким.

К секретлируемым факторам, обеспечивающим сохранение коринебактерий во влагалище женщин, следует отнести антииммуноглобулиновый признак, характеризующий способность коринебактерий быть устойчивыми к факторам врожденного иммунитета человека.

Антииммуноглобулиновая активность у клинических изолятов коринебактерий, выделенных у женщин с острыми кольпитами, впервые была описана Харсевой Г.Г. и др. [16]. Данным свойством обладали виды *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. amycolatum*, *C. pseudotuberculosis*. Уровень антииммуноглобулиновой активности коринебактерий по отношению к IgM и IgA составил 100% для всех исследованных штаммов, IgG: 56,1 — 69,7%. Автор также выявила наличие ДНКазной активности у трех штаммов *C. amycolatum* и *C. xerosis*, выделенных из цервикального канала.

Рассматривая роль экзоклеточно секретлируемых факторов, обеспечивающих выживание коринебактерий в вагинальном биотопе, следует отметить

бактериальную каталазу. Благодаря секреции каталазы коринебактерии способны противостоять перексиду водорода, вырабатываемому клетками иммунной системы хозяина и представителями нормофлоры [15].

Высокая устойчивость коринебактерий к лизоциму и комплементу макроорганизма, продукция каталазы, выраженная антииммуноглобулиновая активность в отношении IgM и IgA, а также продукция ДНКазы отражает их адаптивный потенциал и, вероятно, определяет возможность сохранения во влажной среде микробиоценозе как при различных микроэкологических состояниях биотопа, так и при различных физиологических состояниях женщины.

Колонизируя вагинальный биотоп, коринебактерии взаимодействуют с другими членами микробного сообщества. Их выделяют в ассоциациях с *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Escherichia coli*, а также с *Candida albicans*, *S. aureus*, *Gardnerella vaginalis*, *Klebsiella pneumoniae* и *Neisseria* spp. [12, 16].

Анализ литературных источников выявил противоречивые данные об антагонистической активности коринебактерий.

В серии опытов Мартикайнен З.М. [12] *in vitro* по выявлению возможного антагонизма между штаммами коринебактерий и штаммами *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *G. vaginalis*, *K. pneumoniae*, выделенных из влагалища, а также референс-штаммами показала, что ни в одном случае не было отмечено задержки роста тест-микробов. Автор предположила, что коринебактерии *in vitro* не проявляют антагонистических свойств по отношению к другим представителям вагинального микробиоценоза. Харсева Г.Г. [16] при исследовании межбактериальных взаимодействий также установила, что штаммы *C. non diphtheriae*, выделенные из цервикального канала, не обладали антагонистическим действием в отношении *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Однако Одинцова О.В. [13] опровергла данное утверждение. По данным автора различные виды коринебактерий проявляли антагонистическую активность по отношению к *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*, независимо от микроэкологического состояния биотопа. Изменялась только частота и выраженность угнетения прироста тест-культур. У здоровых женщин антагонистически-активные штаммы преобладали среди доминирующих видов. Штаммы *C. kutscheri* в 50% случаев вызывали угнетение роста *K. pneumoniae*. *C. jeikeium* var. *genitatum* и *C. aquaticum* в основном проявляли антагонизм в отношении *E. coli*, *C. xerosis* в отношении *S. aureus* и *E. faecalis*. У женщин в раннем послеродовом периоде возрастала численность штаммов-антагонистов к *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*. Антагонистическую активность проявляли *C. aquaticum*, *C. jeikeium* var. *genitatum*, *C. minutissimum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. renale*. У женщин с воспалительными заболеваниями влагалища неспецифической этиологии наибольшее количество антагонистически активных штаммов зарегистрировано по отношению к *E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* и *P. vulgaris*. Наиболее выраженной антагонистической направленностью обладали виды *C. minutissimum*, *C. kutscheri*, *C. jeikeium* var. *genitatum*.

Нами выявлено разнонаправленное влияние экзометаболитов коринебактерий на прирост планктонной культуры и биопленкообразование у *E. coli* и *S. aureus*. Модификация биологических свойств условно патогенных микроорганизмов

экзометаболитами коринебактерий напрямую зависела от микроэкологического состояния биотопа. Коринебактерии, выделенные у здоровых женщин, незначительно стимулировали прирост планктонной культуры *E. coli*, при этом подавляли прирост *S. aureus*. Коринебактерии, выделенные при микроэкологических нарушениях, наоборот, подавляли прирост планктонной культуры *E. coli*, при этом незначительно стимулировали его у *S. aureus*. Значительное подавление биопленкообразования *E. coli* и *S. aureus* было выявлено преимущественно экзометаболитами коринебактерий, выделенными у здоровых женщин [3].

Способность коринебактерий подавлять прирост планктонной культуры и биопленкообразование условно патогенных микроорганизмов может быть связано с продукцией ими бактериоцинов, бактериоцин-подобных субстанций и биосурфактантов. Полученные результаты не противоречат исследованиям других авторов. Kwaszewska A. et al. [40] определили наличие бактериоцин-подобной субстанции у 90% исследуемых коринебактерий, выделенных с кожи пациентов. Спектр ее активности охватывал грамположительные бактерии. Dalili D. et al. [27] описали липопептид Coryxin у *S. xerosis* NS5, изолированной из локтевой ямки здорового человека, который существенно подавлял адгезивную способность и биопленкообразование *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, *E. coli* и *P. aeruginosa*.

Помимо собственного антагонистического действия, коринебактерии обладают непрямой антагонизмом по отношению к условно патогенным микроорганизмам. В данном случае речь идет о способности коринебактерий усиливать действие антибактериальных факторов как врожденного иммунитета хозяина, так и доминирующих микроорганизмов — пероксидпродуцирующих лактобацилл.

Известно, что основная роль в поддержании колонизационной резистентности вагинального биотопа принадлежит доминирующим микроорганизмам лактобациллам. При этом один из механизмов ее реализации у них заключается в продукции пероксида водорода. Хотя последняя и является бактерицидным фактором, тем не менее, возможно образование гидроксильного радикала в реакции Фентона, обладающего более выраженным антибактериальным действием, что экспериментально установлено А.В. Сгибневым [15]. Однако аллохтонные микроорганизмы благодаря наличию каталазы способны предотвратить действие активных форм кислорода, разрушая перекись водорода и тем самым препятствуя образованию гидроксильного радикала. Поэтому весьма существенной оказывается роль коринебактерий, обладающих ингибиторным действием на каталазную активность аллохтонных бактерий.

В то же время, коринебактерии оказывают влияние на продукцию цитокинов вагинальными эпителиоцитами. Изучая эпителиально-бактериальные взаимодействия Е.А. Кремлева [11] обнаружила, что изменение экспрессии цитокинов при взаимодействии эпителиоцитов с коринебактериями в эксперименте *in vitro* было во многом аналогично результатам взаимодействия с лактобациллами: умеренная стимуляция продукции IL-8, IL-6, IL-1 β и подавление продукции TNF- γ . Кроме того, под влиянием метаболитов вагинальных эпителиоцитов происходило повышение антагонистической активности коринебактерий по отношению к *S. aureus* и *E. coli*, что было выше по сравнению с влиянием эпителиоцитов на антагонистическую активность лактобацилл.

Характеризуя межбактериальные взаимодействия коринебактерий в ваги-

нальном биотопе, следует отметить, что данные микроорганизмы обладают широким набором биологических характеристик, определяющих как их антагонистические взаимоотношения с условно патогенными микроорганизмами, так и симбиотические взаимодействия с представителями нормофлоры. Вероятно, это не только определяет сохранение коринебактерий в условиях нормо- и патоценоза, но и является одним из ключевых факторов поддержания колонизационной резистентности репродуктивного тракта женщин.

В настоящее время имеются немногочисленные работы, посвященные изучению непатогенных коринебактерий организма человека, хотя это таксономически и биологически разнообразная группа микроорганизмов, составляющих значительную часть микробиоты человека. Привычные подходы рассматривать данные микроорганизмы как возбудителей инфекционных заболеваний не дают возможность в целом оценить их роль в норме и при патологии хозяина. Благодаря широкому внедрению в научную практику современных методов исследования, в том числе и молекулярно-генетических, был обнаружен ряд новых видов коринебактерий и их биологических свойств. Подробно изучается антагонистическая активность коринебактерий по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам. Способность коринебактерий к продукции бактериоцинов, бактериоцин-подобных субстанций и биосурфактантов становится одним из главных аспектов в рассмотрении данной группы микроорганизмов как потенциальных пробиотических культур [20, 22, 27, 36, 37].

Примером могут служить непатогенные коринебактерии, выделенные с кожи, со слизистой конъюнктивы, уретры, верхних дыхательных путей, где в целом они рассматриваются не только как представители резидентной микрофлоры, но и как главные микроорганизмы, участвующие в поддержании колонизационной резистентности данных биотопов [22, 26, 43, 48, 50, 53]. Штаммы *Corynebacterium accolens* рекомендуют для санации слизистой носа от *Streptococcus pneumoniae* [22], а *C. pseudodiphtheriticum* — для элиминации *S. aureus* [37].

По-видимому, результаты исследований относительно непатогенных коринебактерий, выделенных из других биотопов, можно экстраполировать и на репродуктивный тракт женщин. Проведенный нами анализ литературных источников показал, что данные микроорганизмы обладают высоким адаптационным потенциалом, что позволяет им существовать как в репродуктивном тракте здоровых женщин, так и у женщин с неспецифическими инфекционными заболеваниями влагалища, кольпитами, аднекситами, эндометритами [1, 7, 16, 19]. На наш взгляд, выделение непатогенных коринебактерий при микробиологических нарушениях еще не свидетельствует о том, что именно они стали этиологическим фактором этих нарушений. Необходимо отметить, что есть таксономические и штаммовые различия, и только детальные молекулярно-генетические исследования биологических свойств коринебактерий с определением маркеров патогенности помогут решить задачу дифференцировки их как представителей резидентной микрофлоры или возбудителей инфекции.

Таким образом, анализ современной литературы и данных собственных исследований об антагонистической активности коринебактерий, а также симбиотических взаимодействиях с организмом хозяина и лактобациллами свидетельствует о существенной роли коринебактерий в реализации физиологического феномена — колонизационной резистентности и позволяет нам рассматривать эти микроорганизмы как неотъемлемую часть нормальной микробиоты репродуктивного тракта женщины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдалкин М.Е., Абдалкина Е.Н. Нарушения микробной экологии при неспецифических вульвовагинитах: роль эпидермального стафилококка и коринебактерий. Современные проблемы науки и образования. 2011, 3; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=4670>.
2. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург, 2007.
3. Гладышева И.В. Характеристика коринебактерий в ассоциативном симбиозе репродуктивного тракта женщин. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Оренбург, 2015.
4. Гладышева И.В., Черкасов С.В. Роль фибронектина в адгезии коринебактерий к вагинальным эпителиоцитам. Журн. микробиол. 2014, 6: 64-72.
5. Гладышева И.В., Черкасов С.В., Бухарин О.В. Способ усиления адгезии бактерий к вагинальным эпителиоцитам. № RU 2580247, 10.04.2016.
6. Ивандеева О.И. Особенности репродуктивного здоровья и микроценоза влагалища при метаболической синдроме. Пути коррекции: Автореф. дисс. канд. мед. наук. Самара, 2009.
7. Константинова О.Д. Микробиологические подходы к диагностике и лечению воспалительных заболеваний придатков матки неспецифической этиологии. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Оренбург, 2004.
8. Костюковская О.Н., Гладкая Е.А. Идентификация недифтерийных бактерий рода *Corynebacterium* и определение их антибиотикочувствительности. Клин. лаб. диагн. 1992, 9 — 10: 29-31.
9. Кохрейдзе Н.А., Кравченко М.Е. Становление вагинальной микрофлоры в возрастном аспекте. Журн. детская больница. 2002, 3: 45-47.
10. Краева Л.Л., Манина Ж.Н., Ценева Г.Я., Радченко А.Г. Этиологическая значимость *Corynebacterium non diphtheriae* у больных с различной патологией. Журн. микробиол. 2007, 5: 3-7.
11. Кремлева Е.А. Роль эпителиально-бактериальных взаимодействий в ассоциативном симбиозе репродуктивного тракта женщин. Автореф. дисс. д-ра мед. наук. Оренбург, 2013.
12. Мартикайнен З.М. Коринебактерии женских гениталий. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 1996.
13. Одинцова О.В. Коринеподобные и нокардиоподобные бактерии как компонент вагинального микробиоценоза. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Пермь, 2002.
14. Определитель бактерий Берджи. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит и др. (ред.). М., Мир, 1997.
15. Сгибнев А.В. Регуляция активности бактериальной каталазы в межмикробных взаимодействиях. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Оренбург, 2002.
16. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Гасретова Т.Д., Мамычева Н.И., Голованова Н.А. Персистентные свойства *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующие в Ростовена-дону и Ростовской области. Журн. микробиол. 2012, 3: 13-17.
17. Черкасов С.В., Гладышева И.В. Антибиотикорезистентность коринеформных бактерий репродуктивного тракта женщин. Антибиотики и химиотерапия. 2010, 55 (9 — 10): 45-49.
18. Черкасов С.В., Гладышева И.В., Бухарин О.В. Симбиотические взаимодействия вагинальных коринебактерий и лактобацилл в реализации окислительных механизмов антагонизма. Журн. микробиол. 2012, 6: 13-16.
19. Шаталова А.Ю. Вульвовагинаты, вызванные условно-патогенными микроорганизмами, у пациенток репродуктивного возраста: этиология, клиника, диагностика и терапия. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 2011.
20. Шмелева Е.А. Способ получения пробиотического бактериального препарата, содержащего структурные компоненты микробной клетки. № RU 2230113, 10.06.2004.
21. Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. J. Clin. Microbiol. 2012, 50 (10): 3152-3158.
22. Bomar L., Brugger S.D., Yost B.H. *Corynebacterium accolens* releases antipneumococcal free fatty acids from human nostril and skin surface triacylglycerols. MBio. 2016, 7 (1): e01725-15. doi: 10.1128/mBio.01725-15.
23. Both L., Collins S., de Zoysa A. et al. Molecular and epidemiological review of toxigenic

- diphtheria infections in England between 2007 and 2013. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53 (2): 567-572.
24. Cappuccino L., Bottino P., Torricella A., Pontremoli R. Nephrolithiasis by *Corynebacterium urealyticum* infection: literature review and case report. *J. Nephrol.* 2014, 27(2): 117-25. doi: 10.1007/s40620-014-0064-1.
 25. Cazanave C., Greenwood-Quaintance K.E. et al. *Corynebacterium* prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50 (5): 1518-1523.
 26. Cogen A.L., Nizet V., Gallo R.L. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br. J. Dermatol.* 2008, 158 (3): 442-55. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x.
 27. Dahili D., Amini M., Faramarzi M.A. et al. Isolation and structural characterization of Coryxin, a novel cyclic lipopeptide from *Corynebacterium xerosis* NS5 having emulsifying and anti-biofilm activity. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2015, 1 (135): 425-432. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.005.
 28. Devriese L.A., Riegel P., Hommez J. et al. Identification of *Corynebacterium glucuronolyticum* strains from the urogenital tract of humans and pigs. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38 (12): 4657-4659.
 29. Funke G.A. et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria — a review. *Clin. Microbiol.* 1997, 10: 125-159.
 30. Funke G., Frodl R. Comprehensive study of *Corynebacterium freneyi* strains and extended and emended description of *Corynebacterium freneyi* Renaud, Aubel, Riegel, Meugnier, and Bollet 2001. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46 (2): 638-643.
 31. Funke G., Hutson R. A., Hilleringmann M. et al. *Corynebacterium lipophiloflavum* sp. nov. isolated from a patient with bacterial vaginosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 150: 219-224.
 32. Furness G., Sambury S., Evangelista A.T. *Corynebacterium pseudogenitalium* sp. nov. Commensals of the human male and female urogenital tracts. *Invest Urol.* 1979, 16 (4): 292-295.
 33. Gao S., Liu C., Qu S. et al. Non-cell *Corynebacterium parvum* generated by nanotechnology: a promising immunomodulator with less sideeffects. *Int. Immunopharmacol.* 2007, 7 (10): 1334-1342.
 34. Hagemann J.B., Essig A., Herrmann M. et al. Early prosthetic valve endocarditis caused by *Corynebacterium kroppenstedtii*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2015, 305 (8): 957-959. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.10.003.
 35. Hinic V., Lang C., Weisser M. et al. *Corynebacterium tuberculostearicum*: a potentially misidentified and multiresistant *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50 (8): 2561-2567. doi: 10.1128/JCM.00386-12.
 36. Karlyshev A.V., Melnikov V.G. Draft Genome Sequence of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* Strain 090104 «Sokolov». *Genome Announc.* 2013, 1 (6): e00921-13.
 37. Kiryukhina N.V., Melnikov V.G., Suvorov A.V. et al. Use of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* for elimination of *Staphylococcus aureus* from the nasal cavity in volunteers exposed to abnormal microclimate and altered gaseous environment. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2013, 5 (4): 233-238. doi: 10.1007/s12602-013-9147x.
 38. Kreikemeyer B., Oehmcke S., Nakata M. et al. *Streptococcus pyogenes* Fibronectin-binding protein F2. Expression profile, binding characteristics, and impact on eukaryotic cell interactions. *J. Biol. Chem.* 2004, 279: 15850-15859.
 39. Konrad R., Hörmansdorfer S., Sing A. Possible human-to-human transmission of toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015, 21 (8): 768-771. doi: 10.1016/j.cmi.2015.05.021
 40. Kwaszewska A., Szewczyk E.M. Production of antibacterial substances by resident corynebacteria isolated from human skin. *Med. Dosw. Mikrobiol.* 2007, 59: 251-257.
 41. McMillan A., Macklaim J.M., Burton J.P. et al. Adhesion of *Lactobacillus iners* AB-1 to Human fibronectin: a key mediator for persistence in the vagina? *Reprod. Sci.* 2013, 20 (7): 791-796.
 42. Mongodin E., Bajolet O., Cutrona J. et al. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect. Immun.* 2002, 70: 620-630.
 43. Montagnini Spaine D., Mamizuka E.M., Pereira Cedenho A. et al. Microbiologic aerobic studies on normal male urethra. *Urology.* 2000, 56 (2): 207-210.
 44. Nagy E., Froman G., Mardh P-A. Fibronectin binding of *Lactobacillus* species isolated from women with and without bacterial vaginosis. *J. Med. Microbiol.* 1992, 37: 38-42.

45. Nakano H., Tomita F., Yamaguchi K. et al. Corynecin (chloramphenicol analogs) fermentation studies: selective production of Corynecin I by *Corynebacterium hydrocarboclastus* grown on acetate. *Biotechnol. Bioeng.* 1977, 19 (7): 1009-1018.
46. Nishiyama A., Ishida T., Ito A., Arita M. Bronchopneumonia caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Intern. Med.* 2013, 52 (16): 1847.
47. Santos L.S., Sant'anna L.O., Ramos J.N. et al. Diphtheria outbreak in Maranh o, Brazil: microbiological, clinical and epidemiological aspects. *Epidemiol. Infect.* 2015, 143 (4): 791-798. doi: 10.1017/S0950268814001241.
48. Scharschmidt T.C., Fischbach M.A. What lives on our skin: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. *Drug Discov. Today Dis. Mech. Drug Discov.* 2013, 10 (3 – 4). pii: e83-e89.
49. Shukla S.K., Bernard K.A., Harney M. et al. *Corynebacterium nigricans* sp. nov.: proposed name for a black-pigmented *Corynebacterium* species recovered from the human female urogenital tract. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41 (9): 4353-4358.
50. Thiel H.J., Schumacher U. Normal flora of the human conjunctiva: examination of 135 persons of various ages. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 1994, 205 (6): 348-357.
51. Tong J., Liu C., Summanen P.H. et al. *Corynebacterium pyruviciproducens* sp. nov., a pyruvic acid producer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010, 60 (Pt 5): 1135-1140.
52. Trost E. et. al. Complete genome sequence and lifestyle of black pigmented *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975 (formerly *C. nigricans* CN-1) isolated from a vaginal swab of a woman with spontaneous abortion. *BMC Genomics.* 2010, 5 (11): 91. doi: 10.1186/1471-2164-11-91.
53. Uehara Y., Nakama H., Agematsu K. et al. Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium* sp. *J. Hosp. Infect.* 2000, 44 (2): 127-133.

Поступила 25.08.16

Контактная информация: Гладышева Ирина Вячеславовна,
460000, Оренбург, ул. Пионерская, 11, р.т. (3532)77-54-17

© Г.Г.ХАРСЕЕВА, Н.А.ВОРОНИНА, 2017

Г.Г.Харсеева, Н.А.Воронина

КОРИНЕБАКТЕРИИ: ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Ростовский-на-Дону государственный медицинский университет

В обзоре рассмотрены особенности структуры бактериальной клетки коринебактерий: охарактеризован верхний слой, сложноорганизованная клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, нуклеоид. Подробно описано строение верхнего слоя, содержащего пили (фимбрии), микрокапсулу, поверхностные белки — PS-2, DIP1281, белок 67-72p (гемагглютинин), порины, сиалидазу (нейраминидазу). Эти компоненты инициируют способность коринебактерий к последовательному взаимодействию с клетками хозяина с последующей колонизацией. Представлено подробное описание строения и функций структур клеточной стенки — корд-фактора, представляющего собой второй барьер проницаемости; арабиногалактана, пептидогликана, липоманнана и липоарабиноманнана. Рассмотрено строение и функции цитоплазматической мембраны как основного диффузного барьера клеток, цитоплазмы и генома коринебактерий. Представлены различные молекулярно-генетические методы для идентификации и дифференциации близкородственных видов коринебактерий.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 107—114

Ключевые слова: коринебактерии, пили (фимбрии), поверхностные белки, корд-фактор, пептидогликан, нуклеоид

CORYNEBACTERIUM: FEATURES OF THE STRUCTURE OF THE BACTERIAL CELL

Rostov-on-Don State Medical University, Russia

In a review of the features of the bacterial cells are *Corynebacterium* structure: characterized by an upper layer, highly organized cell wall, cytoplasmic membrane, cytoplasm, nucleoid. Described in detail the structure of the upper layer containing pili (fimbriae), microcapsule surface proteins — PS-2, DIP1281, 67-72r protein (hemagglutinin), porins, sialidase (neuraminidase). These components are the ability to initiate a serial of *Corynebacterium* work with the host cell, followed by colonization. It submitted a detailed description of the structure and functions of cell wall structures — cord factor, which is a second barrier permeability; arabinogalactan, peptidoglycan, lipomannan and lipoarabinomannan. The structure and function of the cytoplasmic membrane as the main diffusion barrier cell cytoplasm and the genome of *Corynebacterium*. Presented different molecular genetic methods for the identification and differentiation of closely related species of *Corynebacterium*.

Zh.Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 107—114

Key words: *Corynebacterium*, pili (fimbriae), surface proteins, cord-factor, peptidoglycan, nucleoid

Коринебактерии — мелкие овоиды, коккоподобные или короткие прямые палочки, грамположительные, способные образовывать рудиментарные ветви, но не мицелий. Располагаются в микропрепаратах в виде частокола из нескольких параллельно лежащих клеток. Коринебактерии кислотнеустойчивы, спор и капсул не образуют, обычно неподвижны [4].

В структуре бактериальной клетки выделяют верхний слой, сложноорганизованную клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, цитоплазму и ядерную субстанцию — нуклеоид. По данным электронной микроскопии, клеточная оболочка имеет слоистую организацию и содержит цитоплазматическую мембрану, толстый электронно-плотный (пептидогликан), электронно-прозрачный (корд-фактор) и тонкий внешний слой [10, 25]. Структура клеточной оболочки коринебактерий напоминает типичный вид таковой у микобактерий [10, 15, 30].

Верхний слой содержит пили (фимбрии), микрокапсулу, поверхностные белки — PS-2, DIP1281, белок 67-72p (гемагглютинин), порины, сиалидазу (нейраминидазу).

Пили (фимбрии) — белковые нити, ковалентно связанные с пептидогликаном, расположены на поверхности коринебактерий [26, 28, 38], среди представителей семейства Corynebacteriaceae впервые обнаружены у *Corynebacterium renale* [23, 24, 35, 38]. Строение пилей коринебактерий изучено на модели *Corynebacterium diphtheriae*. Геном типового штамма *C. diphtheriae* NCTC13129, относящегося к эпидемическому клону *Rossija/Sankt-Peterburg*, представлен тремя различными кластерами: spaABC, spaDEF, spaHGI. Каждый кластер кодирует синтез фимбрий соответствующих типов SpaA, SpaD и SpaH, представленных основными белками SpaA, SpaD и SpaH, формирующими ось фимбрий [15, 37]. Помимо основных белков в состав пилей входят и другие (малые) субъединицы: SpaB, SpaC, SpaF, SpaG и SpaI. SpaB равномерно распределяется вдоль стержня пили, а SpaC, SpaF и SpaG

— на его конце [10, 32]. Кластеры генов, кодирующих каждый тип фимбрий, содержат гены сортаз (srt-surface protein sorting). Эти транспептидазы специфически катализируют ковалентное связывание фимбриальных протеинов между собой, а основание фимбрий — с клеточной стенкой бактерий. Для такого связывания в С-концевом участке молекулы белка имеется специфический сайт с аминокислотной последовательностью LPxTG (где «x» обозначает любую аминокислоту). Сортаза расщепляет данную последовательность и связывает белок с определенной аминокислотной группой другого мономера, образуя, таким образом, полимерную основу фимбрий. Для катализируемого сортазами «заякоривания» белка в клеточной стенке важную роль играет располагающийся следом за LPxTG-участком гидрофобный мембранный домен, а также концевая часть молекулы с положительным зарядом. Фиксация белка в клеточной стенке наступает в результате сортазозависимого расщепления LPxTG-последовательности между треонином (Т) и глицином (G) с последующим связыванием остатка треонина с аминокислотной группой пептидогликана [10, 15, 16]. SpaA-тип фимбрий кодируется кластером генов spaA-srtA-spaB-spaC. Структурная основа пилы SpaA-типа состоит из большой SpaA-субъединицы, на боковой поверхности которой располагается малая субъединица SpaB, а на кончике пилы находится другая малая субъединица SpaC. Подобным образом устроены SpaD- и SpaH-пилы. Большие субъединицы являются структурными компонентами пилей, а малые — функциональными [10], которые играют ключевую роль в адгезии [10, 24] и инициируют взаимодействие возбудителя с клетками хозяина, обуславливая последующую колонизацию [6].

Микрокапсула — слизистое образование, выявляемое только при электронной микроскопии; имеет липидную природу, прочно связана с остальными слоями клеточной стенки, выявляется как у неповрежденных, так и частично лизированных клеток [1].

Поверхностные белки коринебактерий разнообразны и многофункциональны. PS-2 белок образует поверхностный слой наружной мембраны некоторых коринебактерий. У *Corynebacterium glutamicum* PS-2 белок имеет молекулярную массу около 63 кДа. При электронной микроскопии выявлена его упорядоченная кристаллическая гексагональная структура и определенная степень изменчивости у различных штаммов *C. glutamicum* [10].

Белок DIP1281 — представитель NlpC/P60 группы — большого надсемейства, объединяющего несколько различных групп белков [5, 39]. Обуславливает адгезию, встречается у бактерий, бактериофагов, РНК-вирусов, эукариот, а также различных представителей коринебактерий (*C. diphtheriae*, *Corynebacterium efficiens*, *C. glutamicum* и *Corynebacterium jeikeium*) [31]. Мутации DIP1281 вызывают изменение белковых структур клеточной поверхности и формирование цепей бактерий. DIP1281 не является ключевым фактором при отделении пептидогликанового слоя делящихся бактерий: разрушение цепей не снижает жизнеспособность бактерий.

Белок 67-72p (гемагглютинин) — нефимбриальный поверхностный белок, кодирующийся геном DIP0733, обнаружен у штаммов *C. diphtheriae*, лишенных фимбрий, *Corynebacterium pseudodiphtheriae*, *Corynebacterium xerosis*. Белок 67-72p способен распознавать и специфически связываться с эритроцитами человека, обуславливая их гемагглютинацию и давая тем самым возбудителю возможность распространяться по всему организму через кровь [36]. Белок

67-72p способен связываться и с клетками Her-2 [29], что может блокироваться анти-67-72p IgG. Установлена отрицательная корреляция между способностью *S.diphtheriae* к адгезии на клетках линии Her-2 и эритроцитах: штамм с низкой гемагглютинирующей активностью показал высокие темпы адгезии к Her-2 клеткам, и наоборот. Белок 67-72p способствует также инвазии *S.diphtheriae* в клетки Her-2 и индуцирует их апоптоз [29].

Порины — каналообразующие белки, способствующие транспорту питательных веществ в клетку. Коринебактериальные порины функционально эквивалентны таковым грамотрицательных бактерий, но имеют совершенно иную структуру, представляя собой мультимерные α -спиральные субъединицы. Порины *S.glutamicum* представлены несколькими каналообразующими белками: PorA, PorB, PorC и PorH [10, 12, 21]. Их гомологи были найдены у *Corynebacterium callunae*, *S.diphtheriae*, *S.efficiens* и *Corynebacterium amycolatum* [10, 14].

Сиалидаза (нейраминидаза) — белковый фермент, представляющий собой гликозилгидролазу. Внеклеточная сиалидаза (экзосиалидаза) обнаружена у *S.diphtheriae*. Установлена взаимосвязь синтеза дифтерийного токсина, продукции сиалидазы и углеводного состава поверхности клетки *S.diphtheriae* с концентрацией железа в среде [10].

Клеточная стенка почти всех видов коринебактерий имеет сложное строение и включает в свой состав корд-фактор, арабиногалактан, пептидогликан, липоманнан, липоарабиноманнан.

Корд-фактор (фактор жгутообразования) представлен миколовыми кислотами (коринемиколатами), основой его является токсичный гликолипид — 6,6-димиколат трегалозы [10, 18, 40]. Формирует второй барьер проницаемости, эквивалентный наружной мембране грамотрицательных бактерий, что является главной особенностью коринебактерий, нокардий и микобактерий. Эффективность этого барьера обусловлена содержащейся в нем миколовой кислотой [19]. Внутренняя часть слоя миколовой кислоты коринебактерий сформирована, главным образом, миколовыми кислотами, связанными с арабиногалактаном; во внешнем слое преобладают трегалоза и глицерин-эстерифицированные миколовые кислоты и незначительное количество свободных миколовых кислот [18, 40].

Арабиногалактан — гетерополисахарид, состоящий из D-арабинозы и D-галактозы. Арабиногалактан у *S.glutamicum* состоит только из арабинозы и галактозы, у *S.amycolatum* и *S.xerosis* дополнительно содержит глюкозу [9, 33]. У *S.glutamicum* чередующиеся сшитые остатки D-галактозы образуют линейную цепочку примерно из 30 сахарных долей, сшитых с пептидогликаном. Арабиногалактан обеспечивает ковалентную связь не только с пептидогликаном, но и с наружной мембраной [4, 10].

Пептидогликан. Как и у других бактерий, гликановую часть макромолекулы пептидогликана составляют чередующиеся β -1,4-связанные N-ацетилглюкозаминовые и N-ацетиловые единицы мурамовой кислоты. Образование поперечных связей между различными полимерами гликана происходит через пептидные связи. Пептидогликан у *Corynebacterium bovis*, *S.pseudodiphthericum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium ulcerans* и *S.xerosis* сшит напрямую; межпептидные мостики, которые можно обнаружить у других грамположительных бактерий, отсутствуют.

Сложная архитектура пептидогликана коринебактерий обеспечивает ригидность их клеточной оболочки и форму клеток [10, 20].

Липоманнан (ЛМ) и липоарабиноманнан (ЛАМ). У коринебактерий, как и у других прокариот, липидный бислой клеточной оболочки не симметричен. Причиной асимметрии является введение гликоконъюгатов в ее внешний слой [13]. Производные ЛМ и ЛАМ обнаружены у различных видов коринебактерий, причем распределение ЛМ- и ЛАМ-подобных веществ видоспецифично. Так, у *S. glutamicum* доминируют ЛМ-подобные молекулы, у *S. xerosis* и *S. amycolatum* — преимущественно ЛАМ-подобные вещества, тогда как у *S. diphtheriae* обнаружено практически равное распределение ЛМ- и ЛАМ-производных [10, 27].

Цитоплазматическая (или плазматическая) мембрана (ЦПМ) — основной диффузный барьер клеток, отделяющий цитоплазму от окружающей среды. ЦПМ коринебактерий состоит из фосфолипидов, собранных в липидный бислой, который дополнительно содержит другие полярные липиды, жирные кислоты (насыщенная пальмитиновая и ненасыщенная деценовая кислоты) и большое разнообразие белков. Такая структура ЦПМ необходима для реализации процессов переноса и биоэнергетики клетки [10]. Основными фосфолипидами ЦПМ являются фосфатидилглицерол, дифосфатидилглицерол и фосфатидилинозитол. Состав жирных кислот может существенно изменяться в зависимости от условий окружающей среды (низкая температура или наличие остатка углерода).

Жирные кислоты синтезируются путем последовательных циклов многоступенчатой реакции [34]. Описано два различных типа синтеза жирных кислот (fatty acid synthesis) (FAS), которые основаны на их общем составе. При реализации типа FAS-I задействован крупный многофункциональный белковый комплекс, типа FAS-II — минимум семь функциональных областей, необходимых для синтеза жирных кислот.

Протеины FAS-I обнаружены у представителей семейства *Corynebacteriaceae*, в том числе, и *S. diphtheriae*, *S. glutamicum* и *S. efficiens* содержат гены, кодирующие два комплекса протеинов типа FAS-I: FAS-IA и FAS-IB. У *S. glutamicum* FAS-IA играет ключевую роль, а FAS-IB — менее важен. Однако для мутантных штаммов, не имеющих FAS-IB, характерна измененная структура жирных кислот, включая и миколовые кислоты, что свидетельствует о необходимости наличия FAS-IB у штаммов коринебактерий дикого типа [34]. *S. glutamicum* содержит гены, кодирующие не только FAS-I, но и FAS-II [34], которые принимают участие в удлинении цепочек миколовой кислоты и у микобактерий. Тип FAS-II, обычно обнаруживаемый у бактерий, отсутствует у других коринебактерий, в частности, у *S. diphtheriae* [10].

Цитоплазма клеток коринебактерий представлена мелко-гранулярным компонентом с зонами повышенной плотности размером 20 — 40 нм (рибосомы, полисомы). В различных частях клеток обнаруживают значительное количество внутрицитоплазматических мембранных структур, расположенных в непосредственной близости от плазмолеммы и сохраняющих с ней анатомическую связь [1]. Цитоплазма коринебактерий содержит липиды, крахмал [33]. На электронограммах коринебактерий видны достаточно крупные и многочисленные включения — полиметафосфаты (гранулы волютина или Бабеша-Эрнста диаметром 0,18-0,20 мкм), имеющие разрыхленную цен-

тральную часть и плотную осмиофильную периферию. Такие гранулы расположены вблизи нуклеоида или на концах клеток и являются резервуаром клеточной энергии [1, 2].

Геном (нуклеоид). В ультратонких срезах коринебактерий нуклеоид представлен небольшой, достаточно дифференцированной осмиофобной зоной, в которой располагаются тяжи, образованные слипшимися нитями ДНК [1]. Последовательность генома коринебактерий штамма NCTC 13129 *C. diphtheriae* биотипа *gravis* не отличается от таковой у *C. glutamicum* и *C. efficiens*. Геном представлен кольцевой двуцепочечной молекулой ДНК и содержит 2389 генов, из которых 2272 кодируют белки [11]. Помимо ДНК, в клетке коринебактерий имеется вторая нуклеиновая кислота — рибонуклеиновая (РНК), которая, в отличие от ДНК, состоит из одной цепи, имеет сахар рибозу вместо дезоксирибозы и урацил вместо тимина. Основная масса РНК связана с белком в форме маленьких частиц или рибосом, которые являются центрами синтеза белка. Помимо рибосомальной РНК (рРНК), в цитоплазме бактерии находится еще информационная РНК (иРНК, или мРНК), осуществляющая функцию переноса генетической информации от ДНК к полисомам. Рибосомные РНК (рРНК) — консервативные элементы бактерий. 16S рРНК входит в состав малой, а 23S рРНК — в состав большой субъединицы рибосом. Определение последовательности генов 16S рРНК является основой геносистематики, что используется в качестве эталона для идентификации и установления степени родства коринебактерий [7].

При идентификации и дифференциации близкородственных видов коринебактерий в настоящее время применяют различные молекулярно-генетические методы (ПЦР, секвенирование генов 16S рРНК и *groB*). В составе ДНК гомология генов фосфолипазы D (PLD) штаммов *C. pseudotuberculosis* и *C. ulcerans* составляет 80%, гомология по аминокислотному и антигенному соотношению — 87% [17].

Ген *groB* — универсальный ген для филогенетического анализа и отличия близкородственных видов, а также идентификации неизвестных штаммов и семейств микроорганизмов в случаях, когда выявление последовательности генов 16S рРНК дает неоднозначные ответы. Частичное или полное определение последовательности генов *groB* наиболее широко используется для определения видов коринебактерий [8]. Определение полной последовательности *groB*-гена и области гена с высокой степенью полиморфизма (гипервариабельная область) позволяет более точно идентифицировать большинство видов коринебактерий [3, 8, 22].

ЛИТЕРАТУРА

1. Заболотных М.В., Колычев Н.М., Трофимов И.Г. Фенотипические формы *Corynebacterium pseudotuberculosis* и их основные свойства. Современные проблемы науки и образования. 2012, 4: 72-76.
2. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н. Руководство по медицинской микробиологии. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. М., Медицина, 2013.
3. Alatoon A.A., Cazanave C.J., Cunningham S.A. et al. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 2012, 50: 160-163.
4. Alderwick L.J., Radmacher E., Seidel M. et al. Deletion of *Cg-emb* in corynebacteriaceae

- leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of Cg-ubiA results in an arabinan-deficient mutant with a cell wall galactan core. *J. Biol. Chem.* 2005, 280 (37): 32362-32371.
5. Anantharaman V., Aravind L. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biology.* 2003, 4 (2): 11.
 6. Barocchi M.A., Ries J., Zogaj X. et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006, 103 (8): 2857-2862.
 7. Bernard K.A., Funke G. *Corynebacterium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Electronic resource) Ed. by William B. Whitman. New York, John Wiley & Sons, Ltd, Published Online: 18 mar. 2015. Mode of access: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm_00026/full. doi: 10.1002/9781118960608.gbm_00026 (24.04.2015).
 8. Bernard K.A. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50 (10): 3152-3158.
 9. Brown J.M., Frazier R.P., Morey R.E. et al. Phenotypic and genetic characterization of clinical isolates of CDC coryneform group A-3: proposal of a new species of *Cellulomonas*, *Cellulomonas denverensis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43 (4): 1732-1737.
 10. Burkovski A. Cell envelope of *Corynebacteria*: structure and influence on pathogenicity. *ISRN Microbiol.* 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/935736>.
 11. Cerdeño-Tárraga A.M., Efstratiou A., Dover L.G. et al. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic. Acids. Res.* 2003, 31 (22): 6516-6523.
 12. Costa-Riu N., Burkovski A., Krämer R. et al. PorA represents the major cell wall channel of the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 2003, 185 (16): 4779-4786.
 13. Daffé M. The cell envelope of corynebacteria. *In: Eggeling L., Bott M. (ed.). Handbook of Corynebacterium glutamicum.* Boca Raton, Fla, USA, Taylor & Francis, 2005.
 14. Dörner U., Schiffler B. et al. Identification of a cell-wall channel in the corynemycolic acid-free Gram-positive bacterium *Corynebacterium amycolatum*. *International Microbiology.* 2009, 12 (1): 29-38.
 15. Dramsi S., Trieu-Cuot B. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Res. Microbiol.* 2005, 156 (3): 289-297.
 16. Eggeling L., Gurdyal S.B., Alderwick L. Structure and synthesis of the cell wall. *In: Corynebacteria.* A. Burkovski (ed.). Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2008, P. 267-294.
 17. Funke G., von Graevenitz A., Clarridge J.E. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997, 10 (1): 125-159.
 18. Gande R., Dover L.G., Krumbach K. The two carboxylases of *Corynebacterium glutamicum* essential for fatty acid and mycolic acid synthesis. *J. Bacteriol.* 2007, 189 (14): 5257-5264.
 19. Gebhardt H., Meniche X., Tropis M. The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in *Corynebacteriaceae*. *Microbiol.* 2007, 153 (5): 1424-1434.
 20. Hansmeier N., Chao T.C., Kalinowski J. et al. Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. *Proteomics.* 2006, 6 (8): 2465-2476.
 21. Hüntner P., Costa-Riu N., Palm D. et al. Identification and characterization of PorH, a new cell wall channel of *Corynebacterium glutamicum*. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes.* 2005, 1715 (1): 25-36.
 22. Khamis A., Raoult D., B. La Scola. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42 (9): 3925-3931.
 23. Kuamazawa N., Yanagawa R. Chemical properties of the pili of *Corynebacterium renale*. *Infect. Immun.* 1972, 5 (1): 27-30.
 24. Mandlik A., Swierczynski A. Pili in gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.* 2008, 16 (1): 33-40.

25. Marienfeld S., Uhlemann E.M., Schmid R. et al. Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wal. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1997, 72 (4): 291-297.
26. Mattos-Guaraldi A.L., Formiga L.C.D., Pereira G.A. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbes Infect*. 2000, 2 (12): 1507-1512.
27. Mishra A.K., Krumbach K., Rittmann D. Lipoarabinomannan biosynthesis in *Corynebacteriaceae*: the interplay of two $\alpha(1-2)$ -mannopyranosyltransferases MptC and MptD in mannan branching. *Mol. Microbiol*. 2011, 80 (5): 1241-1259.
28. Mishra A.K., Das A., Cisar J.O. Sortase catalyzed assembly of distinct heteromeric fimbriae in *Actinomyces naeslundii*. *J. Bacteriol*. 2007, 189: 3156-3165.
29. Moreira L.O., Mattos-Guaraldi A.L., Andrade A.F.B. et al. Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to epithelial cells. *Arch Microbiol*. 2008, 19 (5): 521-530.
30. Niederweis M., Danilchanka O., Huff J. et al. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol*. 2010, 18 (3): 109-116.
31. Ott L., Höller M. et al. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC Microbiology*. 2010, 10 (1): 2-10.
32. Ott L., Höller M., Rheinlaender J. et al. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells. [Electronic resource]. *BMC Microbiology*. 2010, Vol.10. Article 257. Mode of access: doi:10.1186/1471-2180-10-257. — 14.03.15.
33. Paviour S., Musaad S., Roberts S. et al. *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis. *Clin. Infect. Dis*. 2002, 35 (11): 1434-1440.
34. Radmacher E., Alderwick J., Besra G.S. Two functional FAS-I type fatty acid synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*. 2005, 151 (7): 2421-2427.
35. Rheinlaender J., Gräbner A., Ott L. et al. Contour and persistence length of *Corynebacterium diphtheriae* pili by atomic force microscopy. *Eur. Biophys. Journal*. 2012, 41 (6): 561-570.
36. Sabbadini P.S., Assis M.C., Trost E. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in Hep-2 cells. *Microbial Pathogenesis*. 2012, 52 (3): 165-176.
37. Ton-That H., Schneewind O. Assembly of pili in Gram-positive bacteria. *Trends Microbiol*. 2004, 12 (5): 228-234.
38. Ton-That H., Schneewind O. Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Microbiol*. 2003, 50 (4): 1429-1438.
39. Tsuge Y., Ogino H., Teramoto H. et al. Deletion of cgR_1596 and cgR_2070, encoding NlpC/P60 proteins, causes a defect in cell separation in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol*. 2008, 190 (24): 8204-8214.
40. Yang Y., Shi F., Tao G. et al. Purification and structure analysis of mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol*. 2012, 150 (2): 235-240.

Поступила 11.07.16

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

РОЛЬ КВОРУМ-СЕНСИНГ В РЕГУЛЯЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Представлены материалы в отношении кворум-сенсинга, который является главным регулятором межклеточных коммуникаций у холерных вибрионов. Передача информации между отдельными вибрионами осуществляется посредством аутоиндукторов. Их взаимодействие с регуляторными белками способствует активации генов, участвующих в образовании биопленки холерных вибрионов, которая обеспечивает их выживание и распространение.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 115—119

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

S.V.Titova, L.P.Alekseeva

THE ROLE OF QUORUM-SENSING IN REGULATION OF FORMATION OF BIOFILMS BY *VIBRIO CHOLERAE*

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

Materials regarding quorum-sensing that is the main regulator of inter-cellular communications in *V.cholerae* are presented. Information transmission between separate vibrios is executed via autoinductors. Their interaction with regulatory proteins facilitates gene activation that take part in formation of biofilms of *V.cholerae* which ensures their survival and spread.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 115—119

Key words: *V.cholerae*, biofilm, environment, pathogenicity factors

Для сообщения между собой в окружающей среде и в организме человека холерные вибрионы также, как и другие бактерии, используют процесс кворум-сенсинга, который обеспечивает межклеточные коммуникации *V.cholerae*, регулируя экспрессию нескольких фенотипов, в том числе, формирование биопленки, продукцию факторов вирулентности, подвижность, питательные потребности в ответ на изменение плотности клеток [6, 19, 21]. Регуляция осуществляется в результате продукции малых молекул-аутоиндукторов, легко диффундирующих через клеточную стенку возбудителя и связывающихся с регуляторными белками бактерии. Аутоиндукторы осуществляют передачу информации между отдельными клетками бактерий, принадлежащих не только одному, но и разным родам и семействам [11].

Кворум-сенсинг *V.cholerae* включает внеклеточные сигнальные молекулы-аутоиндукторы CAI-1 (S-3-гидрокситридекан-4-она) и связанный с мембраной рецептор CqsS (двухкомпонентная сенсорная гистидинкиназа), которая узнает CAI-1, а фосфорилированный каскад CqsS — >LuxU — >LuxO осуществляет передачу информации, заложенной в CAI-I. Этот каскад спо-

способствует дальнейшей передаче сигналов, что влечет за собой изменение экспрессии регулятора транскрипции *NarR*. В то же время, двухкомпонентная система *VarS-VarA*, действуя на каскад $CqsS \rightarrow LuxU \rightarrow LuxO$, который располагается перед *NarR*, регулирует уровень его экспрессии. Ее влияние на кворум-сенсинг зависит от малых РНК, которые регулируют метаболизм углерода и интегрируют сенсорные сигналы о наличии питательных веществ в окружающей среде [13, 19].

Исследования, проведенные *Y. Wei et al.* [21], показали, что *CAI-1* ингибирует первоначальное аутофосфорилирование двухкомпонентной сенсорной гистидинкиназы (*CqsS*) и последующие этапы фосфопереноса, а фосфатазная активность *CqsS* не регулируется *CAI-1*. При связывании с *CqsS* молекула *CAI-1* вызывает конформационное изменение, приводящее к недоступности *His194* в белке *CqsS* для каталитического домена *CqsS*. Установлено, что мутанты *CqsS* с измененной специфичностью узнавания лигандов эффективно регулируются соответствующими им модифицированными лигандами, что согласуется с моделью двух состояний регуляции лигандами гистидинкиназ [21].

Было также обнаружено, что две химические сигнальные системы, кворум-сенсинг и 3'5'-циклическая дигуаниловая кислота (ц-ди-ГМФ, синтезируемая дигуанилатциклазами, содержащими *GGDEF* домен), аутоиндукторы которых контролируют изменение в образе жизни бактерий, в частности, образования биопленок холерными вибрионами, оказывая при этом противоположное действие на этот процесс. Оказалось, что кворум-сенсинг подавляет, а ц-ди-ГМФ активирует процесс формирования биопленок. Показано, что белок *NarR* контролирует транскрипцию 14 генов, кодирующих группу белков, которые синтезируют и разрушают ц-ди-ГМФ. Видимо, холерные вибрионы получают сигналы о бактериальном сообществе с помощью внеклеточных аутоиндукторов кворум-сенсинга и внутриклеточную информацию посредством ц-ди-ГМФ для регуляции процесса формирования биопленок [9, 20].

Различные сигналы, поступающие из окружающей среды, регулируют экспрессию сигналов кворум-сенсинга. При высокой плотности клеток у холерных вибрионов включается несколько путей передачи сигналов системы кворум-сенсинга, ведущих к активации основного регулятора белка *NarR*, который затем репрессирует гены регулона вирулентности, гены формирования биопленки и активирует продукцию протеаз. Идентифицирован также регулятор транскрипции *VqmA*, который активирует экспрессию гена *narR* при низкой плотности клеток. Белок *VqmA* повышает уровень транскрипции гена *narR*. При этом белок *VqmA* регулирует транскрипцию гена *narR*, непосредственно связываясь с его промотором, а экспрессия гена *vqmA* регулируется и полностью зависит от плотности клеток в среде [8].

Помимо известного регулятора кворум-сенсинга *LuxU* у бактерий, относящихся к роду *Vibrio*, был обнаружен другой важный регулятор кворум-сенсинга — *AphA*, функционирующий также при низкой плотности клеток. Результаты компьютерного анализа показали, что три гена — *ahpA*, *qrr4* и *oraR* — являются непосредственными мишенями регулятора *AphA* [17].

Молекулы, которые активируют кворум-сенсинг у холерных вибрионов, потенциально способны контролировать их патогенность. Идентифицировано 11 молекул, активирующих кворум-сенсинг холерных вибрионов: восемь из

них являются антагонистами рецепторов, а три — антагонистами LuxO, который регулирует общий каскад кворум-сенсинга [13, 14].

Поедание простейшими организмами является основным фактором гибели вибрионов в воде. В экспериментах с инфузориями *Paramecium caudatum* их взаимоотношения с холерными вибрионами характеризуются как хищник — жертва, где инфузории выступают в роли хищника [3]. В свою очередь, вибрионы используют хитиновые панцири ракообразных в качестве питательных веществ. Взаимодействие *V. cholerae* с хитином осуществляется на разных иерархических уровнях. К ним относятся метаболические и физиологические реакции клеток: хемотаксис, размножение клеток, индукция компетентности, формирование биопленок, круговорот питательных веществ [15]. При этом метаболизировать хитин могут все представители семейства *Vibrionaceae*, содержащие ген хитиназы (*chiA*) [7].

Изучены ферменты хитинолитического комплекса холерного вибриона, такие как хитиназа и N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза, играющие важную роль в сохранении, выживании, питании и формировании новых форм возбудителя в окружающей среде [1, 2].

Глобальный регулятор кворум-сенсинга *HapR* играет важную роль в обеспечении устойчивости бактерий к поеданию: индуцирует формирование биопленки, повышая уровень экспрессии полисахарида (VPS), что ускоряет переход от гладкого к ругозному морфологическому типу колоний с последующим образованием биопленки. Исследования, проведенные S. Sun et al. [8], показали, что штаммы дикого типа наиболее устойчивы к поеданию, мутанты с повышенным уровнем продукции полисахарида — менее устойчивы, но более устойчивы, чем мутанты по кворум-сенсингу. Было установлено, что кворум-сенсинг участвует в обеспечении устойчивости к поеданию преимущественно на стадии зрелой биопленки. Для формирования зрелой биопленки вибрионам необходима продукция компонентов внеклеточного матрикса, к которым относятся экзополисахарид и белки матрикса. Формирование биопленки положительно регулируется регуляторами транскрипции *VpsR* и *VpsT* и отрицательно — регулятором транскрипции системы кворум-сенсинга *HapR*, а также регуляторным комплексом — цАМФ-рецепторный белок (ЦРБ) [5, 18]. Секретия внеклеточных полимерных веществ в виде экзополисахарида (EPS) связывает бактериальные сообщества воедино. Клетки, продуцирующие EPS, обладают селективными преимуществами в сравнении со штаммами, не продуцирующим EPS [12]. Исследования этих авторов показали, что EPS-продуцирующие клетки лишены способности к распространению в новые места обитания. Следовательно, у бактерий существует выбор между преимуществом местной конкуренции и способностью к распространению.

Установлено, что приобретение генетического материала посредством естественной компетентности и трансформации между бактериями происходит в верхнем отделе кишечника и на поверхности хитина, где индуцируется программа осуществления трансформации — горизонтального переноса генов. Естественная компетентность способствует поглощению свободной ДНК и ее рекомбинации в бактериальном геноме. Хитин играет важную роль в развитии природной компетентности бактерий, необходимой для преобразований у некоторых видов рода *Vibrio*. Исследования, проведенные G. Suckow et al. [16], показали, что в процессе этих преобразований на уровне

поглощения ДНК холерный вибрион не различает ее как видоспецифическую структуру. Однако при этом наблюдалась положительная корреляция между кворум-сенсингом и естественной трансформацией. Показано, что именно видоспецифическая сигнальная молекула CAI-1 играет главную роль в природной компетентности, необходимой для появления вибрионов с приобретенными генами [16].

По мнению M. Lo Scudato et al. [10], несмотря на то, что хитиновые поверхности необходимы, их одних недостаточно для индукции компетентности. В процессе компетентности участвуют главные регуляторы кворум-сенсинга — TfoX и HarR, а также два дополнительных регуляторных пути — катаболитная репрессия и кворум-сенсинг. Они и являются компонентами регуляторной сети, осуществляющей регуляцию естественной компетентности. Изучение связи между индукцией хитином и кворум-сенсингом выявило, что белок HarR специфично связывается с промотором гена *qstR*, что указывает на роль белка HarR как активатора гена *qstR*, а белок QstR подавляет индуцируемую хитином активность белка TfoX, являющегося регулятором кворум-сенсинга. Можно сказать, что белок OstR необходим для экспрессии небольшой, но, тем не менее, значимой подгруппы генов компетентности [10].

В биопленках, состоящих из смешанных видов бактерий, образованных на хитиновых поверхностях, холерные вибрионы также приобретают естественную компетентность и поглощают внеклеточную ДНК. Показано, что транскрипция гена компетентности *comEA* и поглощение ДНК бактерий индуцируют CAI-1 и AG-2, а также аутоиндукторы других представителей вибрионов, образующих совместно с *V. cholerae* биопленку [4].

Таким образом, система кворум-сенсинга контролирует групповое поведение холерных вибрионов: обеспечивает формирование биопленок в кишечнике человека и в окружающей среде, создает селективное преимущество патогенным вибрионам, способствуя их распространению и естественной трансформации.

Установлено, что кворум-сенсинг — это особый вид регуляции экспрессии холерных вибрионов, зависимый от плотности популяции бактерий. Процесс кворум-сенсинга включает низкомолекулярные сигнальные молекулы, аутоиндукторы, способные диффундировать через бактериальную клеточную стенку и связываться с регуляторными белками. По мере роста популяции бактерий и достижения ими критического уровня аутоиндукторы взаимодействуют с регуляторными белками, и это приводит к активации генов, в том числе таких факторов, как вирулентность и образование биопленки. Благодаря кворум-сенсингу холерные вибрионы получают возможность координированно контролировать экспрессию генов во всем сообществе. Функциональная система кворум-сенсинга обеспечивает бактериям значительное преимущество в выживании как в организме людей, так и в окружающей среде, в частности, биопленках, образующихся как в кишечнике, так и на хитиновых поверхностях водных животных и растений, где возбудитель приобретает естественную компетентность для поглощения внеклеточной ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С. Некоторые свойства N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы холерного вибриона. Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии. Ростов-на-Дону, 2014, 27: 105-108.

2. Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Водопьянов С.О. Изучение хитинолитического комплекса холерного вибриона сероварианта O139. Биотехнология. 2010, 1: 32-40.
3. Титова С.В. Взаимоотношения холерных вибрионов с представителями планктона водоемов средних широт в условиях эксперимента: Автореф. дис. канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 2000.
4. Antonova E.S., Hammer B.K. Quorum-sensing autoinducer molecules produced by members of a multispecies biofilm promote horizontal gene transfer to *Vibrio cholera*. FEMS Microbiol. Lett. 2011, 322(1): 68-76.
5. Fong J.C., Yildiz F.H. Interplay between cAMP-CRP and c-di-GMP signaling in *Vibrio cholerae* biofilm formation. J. Bacteriol. 2008, 190 (20): 6646-6659.
6. Hammer B.K., Bassler B.L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholera*. Mol. Microbiol. 2003, 50 (1): 101-104.
7. Hunt D.E., Gevers D., Vahora N.M. et al. Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. Appl. Environ. Microbiol. 2008, 74 (1): 44-51.
8. Liu X., Beyhan S., Lim B. et al. Identification and characterization of a phosphodiesterase that inversely regulates motility and biofilm formation in *Vibrio cholera*. J. Bacteriol. 2010, 192 (18): 4541-4552.
9. Liu Z., Hsiao A., Joelsson A., Zhu J. The transcriptional regulator VqmA increases expression of the quorum-sensing activator HapR in *Vibrio cholera*. J. Bacteriol. 2006, 188 (7): 2446-2453.
10. Lo Scudato M., Blokesch M. A transcriptional regulator linking quorum sensing and chitin induction to render *Vibrio cholerae* naturally transformable. Nucleic Acids Res. 2013; 41(6): 3644-3658.
11. Miller J., Miller M.C., Nielsen A.T. et al. vpsA- and luxO-independent biofilms of *Vibrio cholera*. FEMS Microbiol. Lett. 2007, 275 (2): 199-206.
12. Nadell C.D., Bassler B.L. A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholera* biofilms. PNAS USA. 2011, 108 (34): 14181-14185.
13. Ng W.L., Perez L., Cong J. et al. Broad spectrum pro-quorum-sensing molecules as inhibitors of virulence in vibrios. PLoS Pathog. 2012, 8 (6): e1002767.
14. Perez L.J., Ng W.L., Marano P. et al. Role of the CAI-1 fatty acid tail in the *Vibrio cholerae* quorum sensing response. J. Med. Chem. 2012, 55 (22): 9669-9681.
15. Pruzzo C., Vezzulli L., Colwell R.R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. Environ. Microbiol. 2008, 10 (6): 1400-1410.
16. Suckow G., Seitz P., Blokesch M. Quorum sensing contributes to natural transformation of *Vibrio cholerae* in a species-specific manner. J. Bacteriol. 2011, 193 (18): 4914-4924.
17. Sun F., Zhang Y., Wang L. et al. Molecular characterization of direct target genes and cis-acting consensus recognized by quorum-sensing regulator AphA in *Vibrio parahaemolyticus*. PLoS One. 2012, 7 (9): 44210.
18. Sun S., Kjelleberg S., McDougald D. Relative contributions of *Vibrio* polysaccharide and quorum sensing to the resistance of *Vibrio cholerae* to predation by heterotrophic protists. PLoS One. 2013, 8 (2): e56338.
19. Tsou A.M., Liu Z., Cai T. et al. The VarS/VarA two-component system modulates the activity of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing transcriptional regulator HapR. Microbiology. 2011, 157 (Pt 6): 1620-1628.
20. Waters C.M., Lu W., Rabinowitz J.D. et al. Quorum sensing control biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic Di-GMP levels and repression of vpsT. J. Bacteriol. 2008, 190 (7): 2527-2536.
21. Wei Y., Ng W.L., Cong J. et al. Ligand and antagonist driven regulation of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing receptor CqsS. Mol. Microbiol. 2012, 83 (6): 1095-1108.

Поступила 04.08.16

Контактная информация: Алексеева Людмила Павловна, д.б.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. Горького, 117/40, р.т. (863)240-27-03

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ ЗА 2016 ГОД

- Алешкин В.А., Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г., Цвиркун О.В., Шульга С.В., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А.* Проблемы на пути достижения элиминации кори в Российской Федерации. V, 29—34.
- Альева М.Х., Зверев С.Я., Фельдблюм И.В., Носкова Е.Ю., Канина А.О., Маркович Н.И.* Ассоциация некоторых однонуклеотидных полиморфизмов генов системы апоптоза с риском развития колоректального рака в российской популяции. V, 72—80.
- Арутюнов Ю.И.* Чума: случаи инфицирования людей в природных очагах США и сложность их выявления. VI, 94—100.
- Ахматова Н.К., Хоменков В.Г., Волкова Е.В., Ахматова Э.А., Семочкин И.А., Перепанова Т.С., Зверев В.В.* Бактериальные лизаты *Escherichia coli* стимулируют продукцию дефензинов нейтрофилами периферической крови. IV, 50—55.
- Балмасова И.П., Сепиашвили Р.И., Малова Е.С.* Молекулярная биология вируса гепатита В и иммунопатогенез хронического вирусного гепатита В. II, 119—126.
- Балмасова И.П., Аристанбекова М.С., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И.* Механизмы взаимодействия вирусных возбудителей у больных, коинфицированных вирусами иммунодефицита человека и гепатита С. V, 101—109.
- Брико Н.И., Миндлина А.Я., Полибин Р.В.* Состояние и перспективы развития кадрового потенциала профессорско-преподавательского состава в области эпидемиологии. V, 122—126.
- Будченко А.А.* Эффективность тест-систем для диагностики мелиоидоза и сапа на основе реакции пассивной гемагглютинации и твердофазного иммуноферментного анализа. IV, 86—95.
- Буварцева Н.П., Антюганов С.Н., Семенко О.В., Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Куличенко А.Н., Мезенцев В.М.* Эпизоотолого-эпидемиологическое районирование территории Северо-Кавказского федерального округа по степени неблагополучия по сибирской язве с использованием программы Arc GIS10. III, 19—24.
- Бухарин О.В., Чайникова И.Н., Перунова Н.Б.* Ширококов В.П. (ред.). Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. IV, 125—126.
- Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Андрющенко С.В.* Межмикробное распознавание «свой-чужой» в паре «доминант-ассоциант» пробиотических штаммов *Escherichia coli* M-17 и *Escherichia coli* ЛЭГМ-18. III, 3—9.
- Бухарин О.В., Челтаченко 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.* Микросимбиоз кишечника у детей с реактивным артритом. VI, 41—48.
- Бывалов А.А., Дудина Л.Г., Литвинец С.Г., Мартинсон Е.А.* Иммунохимическое изучение рецепции бактериофага чумного Покровской. IV, 16—21.
- Воробьев Д.В., Соломка В.С., Плахова К.И., Дерябин Д.Г., Кубанов А.А.* NG-MAST генотипирование штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, выделенных на территории Российской Федерации в 2012—2015 годах. IV, 42—50.
- Вишневская О.Н., Рыбальченко О.В., Ларионов И.В., Орлова О.Г., Марков А.Г.*

- Сравнительный анализ плотных контактов эпителия тощей кишки крыс при действии липополисахарида и холерного токсина. II, 3—9.
- Гаврилов С.Н., Скачкова Т.С., Шипулина О.Ю., Савочкина Ю.А., Шипулин Г.А., Малеев В.В.* Современные молекулярно-генетические методы, используемые для этиологической диагностики сепсиса. II, 91—99.
- Ганковская Л.В., Хелминская Н.М., Молчанова Е.А., Свитич О.А.* Роль факторов врожденного иммунитета в патогенезе пародонтита. II, 100—107.
- Гапон М.Н., Терновская Л.Н.* Выявление степени микрoэкологических нарушений кишечника на основе расчета локального антиоксидантного индекса. II, 80—84.
- Гендон Ю.З.* Возможность предсказания пандемий гриппа. III, 113—120.
- Довгополок Е.С., Пузырева Л.В., Сафонов А.Д., Мордык А.В., Тюменцев А.Т., Левахина Л.И., Калачева Г.А.* Эпидемическая ситуация по ВИЧ-инфекции в Сибирском федеральном округе в 2014 году. II, 37—41.
- Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Даровских С.Н., Комарова И.А., Вдовина Н.В., Мезенцева Е.А., Никушкина К.В.* Особенности модифицирующего действия низкоинтенсивных электромагнитных излучений природного и техногенного происхождения на жизнеспособность и функциональный статус нейтрофильных гранулоцитов. V, 11—17.
- Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Сорокин В.М.* N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза холерных вибрионов. II, 41—48.
- Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Романова Л.В., Титова С.В.* Хитиноподобный комплекс *Vibrio cholerae*: состав и роль в персистенции. V, 94—101.
- Дугаржапова З.Ф., Бадмаев Н.Б., Такайшвили В.Е., Кравец Е.В., Цыдытов Б.З., Очиров О.Н., Аюржанаев А.А., Содномов Б.В., Малаткина Б.Б., Зверева О.А., Шахаева О.П., Булотов К.В., Ханхареев С.С., Чеснокова М.В., Балахонов С.В.* Экологическое и микробиологическое обследование неблагополучных по сибирской язве территорий Республики Бурятия. IV, 22—28.
- 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. VI, 85—93.
- Жебрун А.Б., Калинина О.В.* Вирусный гепатит С: эволюция эпидемического процесса, эволюция вируса. I, 102—112.
- Жуков В.А., Кокорев С.В., Рогожкина С.В., Мельников Д.Г., Терентьев А.И., Ковальчук Е.А., Вахнов Е.Ю., Борисевич С.В.* Термостабильность как прогностический показатель сохранности таблетированной живой эмбриональной оспенной вакцины (ТЭОВак) в процессе хранения. II, 56—62.
- Жукова Л.И., Рафеенко Г.К., Горodin В.Н., Ванюков А.А.* Клинико-эпидемиологическая характеристика лихорадки Западного Нила в Краснодарском крае. II, 74—80.
- Зайцев Е.М., Поддубиков А.В., Брицина М.В., Озерецковская М.Н., Мерцалова Н.У., Бажанова И.Г.* Профили цитокинов у мышей при иммунизации АКДС-вакциной с бесклеточным коклюшным компонентом. VI, 49—53.
- Захарова Ю.В.* Факторы адгезии бифидобактерий. V, 80—87.
- Исаева О.В., Кичатова В.С., Карлсен А.А., Солонин С.А., Дмитриев П.Н., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.* Многолетняя динамика распространения генотипов вируса гепатита С в Московском регионе. IV, 35—42.
- Караваяев В.С., Олейникова Е.С., Азаев М.Ш., Беклемишев А.Б.* Иммунохимический анализ рекомбинантного химерного полипептида OspC_{gar+afz} изолятов *Brucella garinii* и *B. afzelii*. III, 37—44.

- Клюева С.Н., Шуковская Т.Н., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Кузнецова Е.М., Волох О.А.* Оценка стимулирующего влияния биогенного амина серотонина на капсулоподобное вещество *Francisella tularensis*. IV, 9—16.
- Колесников А.В., Козырь А.В., Шемякин И.Г., Лисицкая Л.А., Марьин М.А., Рябко А.К., Дятлов И.А.* Синтетическая биология как инструмент для разработки инновационных вакцин для профилактики бактериальных инфекций. IV, 105—115.
- 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., Прохватилова Е.В.* Идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза на основе принципов полифазного таксономического подхода. VI, 25—34.
- Костинов М.П., Лукачев И.В.* Возможности усовершенствования вакцинопрофилактики в современной России. IV, 60—65.
- Костинов М.П., Шмитько А.Д., Соловьева И.Л., Сависько А.А., Полищук В.Б., Рыжов А.А., Черданцев А.П.* Необходима ли третья доза вакцины против кори — взгляд иммунолога. V, 88—94.
- Кравцов А.Л.* Роль нейтрофильных внеклеточных ловушек при особо опасных бактериальных инфекциях. IV, 95—104.
- Крыжановская О.А., Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Маянский Н.А.* Спектр антибиотикорезистентности и распространенность ОХА-карбапенемаз среди штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных у пациентов хирургических и реанимационных отделений в Москве. I, 40—45.
- 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. VI, 54—60.
- Курбонов К.М., Саторов С.С., Симонова Е.Г., Филатов Н.Н.* Современные эпизоотолого-эпидемиологические особенности бруцеллеза в Республике Таджикистан. III, 31—37.
- 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. VI, 19—25.
- Лисицкая Л.А., Колесников А.В., Козырь А.В., Шемякин И.Г., Рябко А.К., Красавцева О.Н., Дятлов И.А.* Белки и другие возможные носители для создания конъюгированных вакцин: свойства и применение. IV, 115—124.
- Лопухов П.Д., Брико Н.И., Халдин А.А., Цапкова Н.Н., Лупашко О.В.* Папилломавирусная инфекция: основные характеристики, клинические проявления, вакцинопрофилактика. I, 71—78.
- Лужнова С.А., Юшин М.Ю., Воронков А.В., Осыченко С.А., Габитова Н.М., Юртаева Е.А.* Экспериментальное исследование специфической активности производного 1,3-диазинона-4 соединения ПЯТd1 in vivo. V, 18—22.
- Малецкая О.В., Тибилев А.Г., Прислегина Д.А., Газиева Г.К., Отараева Н.И., Волюнкина А.С., Савельев В.Н., Лямкин Г.И., Зайцев А.А., Куличенко А.Н.* Эпидемиологические особенности вспышки норовирусной инфекции в Республике Северная Осетия-Алания. II, 69—74.
- Маркина О.В., Максименко Е.В., Маркин Н.В., Селянская Н.А., Шелухович А.И., Мазрухо А.Б., Борисенко Н.И.* Изучение состава экстрактов растений, об-

- ладающих антимицробным эффектом в отношении *Vibrio cholerae* El Tor, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. I, 63—66.
- Маркин В.А., Пантюхов В.Б. Лихорадка Эбола. VI, 116—125.
- Маркушин С.Г., Свитич О.А., Кинкулькина А.Р., Коптяева И.Б., Лисовская К.В. Механизмы аттенуации холодоадаптированного штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2). II, 49—56.
- Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Исаева О.В. Случай завоза вируса гепатита E 4 генотипа в Россию. III, 64—69.
- Мочалкин П.А., Мочалкин А.П., Степанов Е.Г., Фарвазова Л.А., Попов Н.В. Эпидемиологическая дифференциация природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом Республики Башкортостан. III, 24—31.
- Никитин А.Я., Носков А.К., Баландина Т.П. Заболеваемость населения инфекциями, передающимися *Ixodes persulcatus*, на севере и юге Иркутской области. VI, 34—40.
- 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. I, 89—101.
- Оноприенко Н.Н., Аронова Н.В., Павлович Н.В. Роль различных антигенных препаратов *Francisella tularensis* в формировании реакции аллергии у человека и животных. I, 22—29.
- Оспельникова Т.П., Носейкина Е.М., Гайдерова Л.А., Еришов Ф.И. Терапевтический потенциал препаратов альфа интерферонов при социально-значимых заболеваниях человека вирусной этиологии. V, 109—121.
- Останкова Ю.В., Семенов А.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Любимова Н.Е., Петрова О.А., Ананьина Ю.В., Петров Е.М. Типирование штаммов *Leptospira* spp. на основе 16S рРНК. I, 35—39.
- Останкова Ю.В., Семенов А.В., Файзуллаев Х.Н., Казакова Е.И., Козлов А.В., Мусабаяев Э.И., Тотолян Арег А. Молекулярно-биологические маркеры гепатита В у пациентов с фиброзом/циррозом печени в Узбекистане. V, 34—43.
- Панфёрова Ю.А., Фрейлихман О.А., Токаревич Н.К., Карпенко С.Ф., Галимзянов Х.М. Сравнение диагностической эффективности методов детекции *Soxiella burnetii* в крови больных лихорадкой Ку на основе амплификации фрагментов гена 16S рРНК (стандартная ПЦР) и гена *groEL* (ПЦР в режиме реального времени). III, 70—74.
- Печелюлько А.А., Тараканова Ю.Н., Дмитриев А.Д., Массино Ю.С., Сегал О.Л., Лавров В.Ф., Дмитриев Д.А. Анализ эффективности использования IgY кур в сэндвич-методе тестирования HBsAg. III, 44—51.
- Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Буркальцева М.В., Крылов С.В., Каплан А.М., Чеснокова Е.Н., Польшаков О.А., Ворошилова Н.Н., Михайлова Н.А., Зверев В.В., Крылов В.Н. Новый подход к составлению смесей бактериофагов для антибактериальной терапии. V, 3—11.
- Покровский В.И. Г.Г. Онищенко, А.Н. Куличенко (ред.). XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры 2014 года в г. Сочи. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Тверь, Триада-Х, 2015, 575 с., 500 экз. I, 113—114.
- Полищук В.Б., Рыжов А.А., Костинов М.П., Магаршак О.О., Шмитько А.Д., Лукачев И.В., Васильева Г.В., Благовидов Д.А., Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Карчевская Н.А. Состояние противокорревого иммунитета у пациентов листа ожидания трансплантации легких. IV, 55—60.

- Попова П.Ю., Микшис Н.И.* Перспективы разработки живых рекомбинантных сибиреязвенных вакцин на основе условно патогенных и непатогенных микроорганизмов. I, 79—89.
- Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Шапошникова Л.И., Котенев Е.С., Дубянский В.М., Волюнкина А.С., Лисицкая Я.В., Самарина И.В., Пеньковская Н.А., Евстафьев И.Л., Товпицец Н.Н., Цапко Н.В., Белова О.А., Агапитов Д.С., Самодед Т.Н., Надольный А.А., Коваленко И.С., Якунин С.Н., Шварсалон Н.К., Зинич Л.С., Тихонов С.Н., Лямкин Г.И., Жарникова И.В., Евченко Ю.М.* Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекциям в Крымском федеральном округе в 2014—2015 гг. II, 62—69.
- Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Дубянский В.М., Рязанова А.Г., Прислегина Д.А., Шапошникова Л.И., Манин Е.А., Юничева Ю.В., Василенко Л.Е., Агапитов Д.С., Савельев В.Н., Дегтярев Д.Ю., Герасименко Е.В., Лазаренко Е.В., Жильцова А.Ю., Волюнкина А.С., Котенев Е.С., Савельева И.В., Хачатурова А.А., Кузнецова И.В., Жарникова И.В., Евченко Ю.М., Зайцев А.А., Антоненко А.Д., Оробей В.Г.* Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в регионе г.-к. Сочи по опасным и природно-очаговым инфекционным болезням в 2015 году. III, 74—80.
- Попова А.Ю., Топорков А.В., Липницкий А.В., Половец Н.В., Викторов Д.В.* Распространение в мире особо опасных микозов. III, 120—126.
- Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Любасовская Л.А., Муравьева В.В., Ильина Е.Н., Сухих Г.Т.* Масс-спектрометрия в микробиологической практике Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии. I, 52—58.
- Пузырева Л.В., Сафонов А.Д.* Инфекции, вызванные вирусом Эпштейна-Барра, у ВИЧ-инфицированных пациентов. VI, 108—116.
- Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Вишневская О.Н., Капустина В.В., Потокин И.Л., Лаврикова В.В.* Особенности формирования бактериальных биопленок в условиях космического полета. VI, 3—10.
- Савилов Е.Д., Малов С.И., Малов И.В., Gantulga D., Мирошниченко И.А., Erdenebayar N., Орлова Л.С., Nyamadawa P., Dulguun B.* Эпидемиологические проявления вирусного гепатита С у представителей европеоидной и монголоидной рас. I, 9—17.
- Савилов Е.Д., Астафьев В.А., Винокурова М.К., Огарков О.Б., Жданова С.Н., Алексеева Г.И., Кравченко А.Ф.* Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Дальневосточном федеральном округе и Республике Саха (Якутия). IV, 28—34.
- Савилов Е.Д., Колесников С.И., Брико Н.И.* Коморбидность в эпидемиологии — новый тренд в исследованиях общественного здоровья. IV, 66—75.
- Саркисян Н.Г., Ганковская Л.В., Тузанкина И.А., Свитич О.А., Ронь Г.И., Шершнев В.Н., Колядина О.Н., Долгих М.А.* Ассоциация полиморфных маркеров в генах врожденного иммунитета у больных пародонтитом и воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей. I, 67—71.
- Селянская Н.А., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д., Водяницкая С.Ю., Веркина Л.М., Непомнящая Н.Б.* Типирование штаммов *Vibrio cholerae* не O1/не O139, изолированных в Ростовской области в 2014 году. I, 3—9.
- Семенова И.Б.* Роль пуриnergических рецепторов в иммунном ответе. II, 107—119.
- Семенова И.Б., Михайлова Н.А.* Серотипнезависимые вакцины против пневмококковой инфекции. IV, 76—85.

- Семенов А.В., Останкова Ю.В., Файзуллаев Х.Н., Казакова Е.И., Козлов А.В., Мусабаяев Э.И., Тотолян Арег А. Кольцевая ковалентно замкнутая ДНК ВГВ как маркер распространенности острого гепатита В у пациентов с ВГВ, ВГД и ВГС инфекцией в Узбекистане. V, 43—49.
- Сомова Л.М., Шубин Ф.Н., Дробот Е.И., Плехова Н.Г., Ляпун И.Н. Плазмид-ассоциированная вирулентность *Yersinia pseudotuberculosis* и инфекционный процесс. VI, 74—85.
- Сорокина Е.В., Ахматова Н.К., Сходова С.А., Чалая Е.Л., Масюкова С.А. Эффективность применения комбинированной терапии ранней эритемной стадии болезни Лайма с учетом особенностей иммуногенеза. III, 51—56.
- Софронов А.Г., Зуева Л.П., Асланов Б.И., Дардынская И.В., Weine S., Добровольская А.Е., Чащин М.В., Дардынский О.А., Чащин В.П. Многоуровневая оценка биосоциальных факторов риска ВИЧ-инфекции среди трудовых мигрантов. III, 81—87.
- Сычева М.В., Васильченко А.С., Рогожин Е.А., Пашкова Т.М., Попова Л.П., Карташова О.Л. Биологическая активность антимикробных пептидов из тромбоцитов кур. II, 24—29.
- Телесманич Н.Р., Гончаренко Е.В., Чайка С.О., Чайка И.А., Теличева В.О. Возможности применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для изучения углевод-специфических рецепторов диагностического бактериофага эльтор. II, 85—90.
- Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Голотин В.А., Рассказов В.А. Биологическая активность токсинов *Yersinia pseudotuberculosis*. VI, 10—19.
- Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Новикова О.Б., Новикова И.И., Джавадов Э.Д. Новый подход к генотипированию госпитальных изолятов *Clostridium difficile*. II, 9—15.
- Титова С.В., Алексеева Л.П., Андрусенко И.Т. Роль биопленок в выживаемости и сохранении вирулентности холерных вибрионов в окружающей среде и организме человека. III, 88—97.
- Точилина А.Г., Белова И.В., Соловьева И.В., Горлова И.С., Иванова Т.П., Жирнов В.А. Характеристика биологических и молекулярно-генетических свойств пробиотического штамма *Lactobacillus fermentum* 90 ТС-4. II, 16—23.
- Трифонов Т.А., Марцев А.А. Оценка и прогнозирование эпидемиологической обстановки по иксодовому клещевому боррелиозу во Владимирской области. I, 58—62.
- Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П. Специфичность иммуномодулирующего действия эндотоксина *Yersinia pestis*. III, 104—112.
- Тюрин Ю.А., Фассахов Р.С., Григорьева Т.В., Мустафин И.Г. Микробный состав различных участков кожи при развитии атопического дерматита по данным метода MALDI-TOF масс-спектрометрической идентификации. II, 30—36.
- Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Жаринова Н.В., Худолеев А.А., Коготкова О.И., Ефременко В.И., Евченко Н.И., Куличенко А.Н. Особенности масс-спектрометрических белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза при подготовке культуры на разных питательных средах. I, 29—34.
- Фельдблюм И.В., Николаева А.М., Павероз К.А., Данилина Т.В., Соснина О.Ю., Вязникова Т.В., Ершов А.Е., Трофимов Д.М., Полушкина А.В. Безопасность и иммуногенность отечественной комбинированной вакцины против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и Нiv-инфекции, содержащей бесклеточный коклюшный компонент, при иммунизации взрослых. I, 46—51.

- Филатов Н.Н., Линок А.В., Файзулов Е.Б.* Некоторые особенности проявлений эпидемического процесса при острых кишечных инфекциях в Москве. I, 17—21.
- Харсеева Г.Г., Воронина Н.А.* Факторы патогенности *Corynebacterium non diphtheriae*. III, 97—104.
- Хромова Е.А., Ахматова Э.А., Сходова С.А., Семочкин И.А., Хоменков В.Г., Ахматова Н.К., Костинов М.П.* Влияние противогриппозных вакцин на субпопуляции дендритных клеток крови. V, 23—28.
- Хромова Е.А., Семочкин И.А., Ахматова Э.А., Столпникова В.Н., Сходова С.А., Сорокина Е.В., Ахматова Н.К., Костинов М.П.* Сравнительная активность вакцин против гриппа: влияние на субпопуляционную структуру лимфоцитов. VI, 61—65.
- 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. VI, 66—73.
- Чагина И.А., Борисова О.Ю., Кафарская Л.И., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В., Афанасьев М.С., Алешкин А.В., Юсуф Е.В., Москвина Т.И., Пономарева Л.И., Караулов А.В.* Состав популяции штаммов возбудителя дифтерии, циркулирующих в России. V, 50—60.
- Чайникова И.Н., Филиппова Ю.В., Фролов Б.А., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Бондаренко Т.А., Панфилова Т.В., Железнова А.Д., Сарычева Ю.А., Бухарин О.В.* Влияние милиацина на биопленкообразование бактерий. IV, 3—9.
- Чекнёв С.Б., Вострова Е.И., Сарычева М.А., Востров А.В.* Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* катионами меди и цинка, примененными в физиологических концентрациях. III, 9—18.
- Чучалин А.Г., Онищенко Г.Г., Колосов В.П., Курганова О.П., Тезиков Н.Л., Манаков Л.Г., Перельман Ю.М.* Клинико-эпидемиологическая оценка эффективности вакцинации детей против пневмококковой инфекции в Амурской области. III, 57—63.
- 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. VI, 100—108.
- Яцышина С.Б., Рентеева А.Н., Валдохина А.В., Елькина М.А., Сперанская А.С., Пимкина Е.В., Минтаев Р.Р., Маркелов М.Л., Малеев В.В.* Генетическая характеристика вирусов гриппа А/Н3N2 и В, циркулировавших в России в 2013 — 2015 гг. V, 60—72.
-

СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Андриющенко С.В.* Метаболический профиль бифидофлоры при различных микроэкологических состояниях биотопа толстого кишечника человека3
- Bukharin, O.V., Ivanova, E.V., Perunova, N.B., Chainikova, I.N., Andryuschenko, S.V.* Metabolic profile of bifidoflora under different microecological conditions of the colon biotope in human
- Яковлева Т.В., Брико Н.И., Герасимов А.Н., Салтыкова Т.С., Поздняков А.А.* Сравнительная характеристика эпидемических сезонов гриппа 2015 — 2016 и 2009 — 2010 гг. 11
- Yakovleva, T.V., Briko, N.I., Gerasimov, A.N., Saltykova, T.S., Pozdnyakov, A.A.* Comparative characteristics of epidemic seasons of influenza 2015 — 2016 and 2009 — 2010
- Бондаренко А.П., Зайцева Т.А., Троценко О.Е., Гарбуз Ю.А., Каравянская Т.Н., Корита Т.В., Присяжнюк Е.Н., Подколзин А.Т., Шмыленко В.А., Тригорлова Т.Н., Бондарь О.В.* Заболеваемость дизентерией Зонне в Хабаровске и Хабаровском крае, обусловленной атипичным маннитнегативным возбудителем 20
- Bondarenko, A.P., Zaitseva, T.A., Trotsenko, O.E., Garbuz, Yu.A., Karavyanskaya, T.N., Korita, T.V., Prisyazhnyuk, E.N., Podkolzin, A.T., Shmylenko, V.A., Trigorlova, T.N., Bondar, O.V.* Sonnei dysentery morbidity in Khabarovsk and Khabarovsk region due to atypical mannitol-negative causative agent
- Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Шапошникова Л.И., Волюнкина А.С., Лисицкая Я.В., Котенев Е.С., Куличенко А.Н.* Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых инфекций на юге России в 2015 г. 29
- Vasilenko, N.F., Maletskaia, O.V., Manin, E.A., Prislegina, D.A., Dubyansky, V.M., Shaposhnikova, L.I., Volynkina, A.S., Lisitskaia, Ya.V., Kotenev, E.S., Kulichenko, A.N.* Epizootologic monitoring of natural-focal infections in the south of Russia in 2015
- Сердюк Н.С., Евченко Ю.М., Кузнецова И.В., Жилченко Е.Б., Жаринова Н.В., Коняева О.А., Мезенцев В.М., Волюнкина А.С., Котенев Е.С., Платонов М.Е., Анисимов А.П., Куличенко А.Н.* Определение филогенетического родства штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов чумы Кавказа методом мультилокусного VNTR-анализа 35
- Serdyuk, N.S., Evchenko, Yu.M., Kuznetsova, I.V., Zhilchenko, E.B., Zharinova, N.V., Konyaeva, O.A., Mezentsev, V.M., Volynkina, A.S., Kotenev, E.S., Platonov, M.E., Anisimov, A.P., Kulichenko, A.N.* Determination of phylogenetic relationship of *Yersinia pestis* strains from natural plague foci of the Caucasus by multi-locus VNTR-analysis
- Зуева Е.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Тотолян Арег А.* Идентификация сероваров *Leptospira* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии 42
- Zueva, E.V., Stoyanova, N.A., Tokarevich, N.K., Totolyan, Areg A.* Identification of leptospira serovars by MALDI-TOF mass-spectrometry
- Савельева И.В., Тихонов С.Н., Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Котенев Е.С., Бабенышев Б.В., Зинич Л.С., Пидченко Н.Н., Куличенко А.Н.* Ретроспективный анализ биологических и молекулярно-генетических свойств штаммов возбудителя холеры, выделенных в Украине в 1994 — 2011 гг. 49
- Savelieva, I.V., Tikhonov, S.N., Saveliev, V.N., Kovalev, D.A., Pisarenko, S.V., Kotenev, E.S., Babenyshv, B.V., Zinich, L.S., Pidchenko, N.N., Kulichenko, A.N.* Retrospective analysis of biological and molecular-genetic properties of strains — causative agents of cholera — isolated in Ukraine in 1994 — 2011
- Загоскина Т.Ю., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Попова Ю.О., Марков Е.Ю., Старикова О.А.* Конструирование тест-системы с наночастицами коллоидного серебра для обнаружения возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в ДОТ-иммуноанализе 55

<i>Zagoskina, T. Yu., Chesnokova, M. V., Klimov, V. T., Popova, Yu. O., Markov, E. Yu., Starikova, O. A.</i> Construction of a test-system with nanoparticles of colloid silver for detection of pseudotuberculosis and intestinal yersiniosis for causative agents in dot-immunoassay	
<i>Шубин Ф.Н., Раков А.В., Кузнецова Н.А., Якубич Т.В., Снеткова И.П.</i> Формирование заболеваемости населения сальмонеллезом, вызванным <i>Salmonella enteritidis</i> , в районах с неполным обеспечением населения местной продукцией птицеводства.....	61
<i>Shubin, F. N., Rakov, A. V., Kuznetsova, N. A., Yakubich, T. V., Snetkova, I. P.</i> Formation of population morbidity with salmonellosis caused by <i>Salmonella enteritidis</i> in regions with incomplete supply of local poultry products	
<i>Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Лазарева А.М.</i> Особенности микробиоценоза слизистой оболочки носа при атопическом и полипозном риносинуситах.....	67
<i>Kolenchukova, O. A., Smirnova, S. V., Lazareva, A. M.</i> Features of microbiocenosis of nose mucous membrane during atopic and polypous rhinosinusitis	
<i>Новикова Л.И., Петрова М.С., Аleshкин В.А., Скирда Т.А., Волков А.В., Матвеевская Н.С., Бочкарева С.С., Синчугова Т.В., Панурина Р.Л., Зуева М.М., Наумова М.А., Воронина И.С., Бунин С.В., Борисова О.Ю., Пименова А.С.</i> Комплексный иммуноглобулиновый препарат в терапии коклюша у детей раннего возраста.....	73
<i>Novikova, L. I., Petrova, M. S., Aleshkin, V. A., Skirda, T. A., Volkov, A. V., Matveevskaya, N. S., Bochkareva, S. S., Sinchugova, T. V., Panurina, R. L., Zueva, M. M., Naumova, M. A., Voronova, I. S., Bunin, S. V., Borisova, O. Yu., Pimenova, A. S.</i> Complex immunoglobulin preparation for therapy of pertussis in young children	
<i>Башмакова Н.В., Литвинова А.М., Кузнецова О.А.</i> Характеристика состояния доношенных новорожденных из групп высокого перинатального риска в период вакцинации в роддоме.....	80
<i>Bashmakova, N. V., Litvinova, A. M., Kuznetsova, O. A.</i> Characteristics of the condition of full-term newborns from the group of high perinatal risk during vaccination period in the maternity hospital	

ОБЗОРЫ (REVIEWS)

<i>Начарова Е.П., Харит С.М., Лобзин Ю.В., Брико Н.И.</i> Принципы мониторинга неблагоприятных событий после вакцинации в России и в мире.....	86
<i>Nacharova, E. P., Kharit, S. M., Lobzin, Yu. V., Briko, N. I.</i> Principles of monitoring of adverse events after vaccination in Russian Federation and the world	
<i>Гладышева И.В., Черкасов С.В.</i> Физиологические особенности коринебактерий репродуктивного тракта женщин.....	96
<i>Gladysheva, I. V., Cherkasov, S. V.</i> Physiological features of corynebacteria of female reproductive tract	
<i>Харсеева Г.Г., Воронина Н.А.</i> Коринебактерии: особенности структуры бактериальной клетки.....	107
<i>Kharseeva, G. G., Voronina, N. A.</i> Corynebacterium: features of the structure of the bacterial cell	
<i>Титова С.В., Алексеева Л.П.</i> Роль кворум-сенсинг в регуляции образования биопленок холерными вибрионами.....	115
<i>Titova, S. V., Alekseeva, L. P.</i> The role of quorum-sensing in regulation of formation of biofilms by <i>Vibrio cholerae</i>	

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ ЗА 2016 ГОД (AUTHOR'S INDEX FOR 2016)

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

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

При направлении статей в ЖМЭИ авторам следует соблюдать следующие правила:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11. Плата с аспирантов за публикацию статей не взимается.

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

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