

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; С.В.ЧЕРКАСОВ, д.м.н., проф., член-корр.
РАН; Н.Д.ЮЩУК, д.м.н., проф., акад. РАН

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

2

март—апрель

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

<http://www.jmicrobiol.com>

Уважаемые коллеги, авторы и читатели Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии!

Журнал находится в сложнейшем положении. Редколлегия ЖМЭИ обращается к вам с просьбой поддержать ЖМЭИ в подписке на II полугодие 2017 г.

Журналу 92 года, индексируется в Scopus, РИНЦ, входит в перечень ВАК, является изданием ВНОЭМП.

Подписаться можно только в так называемом Зеленом каталоге (см. фото I-го полугодия).

Подписка будет проходить с 1 апреля по 10 июня 2017 года.

Надеемся на ваше понимание и поддержку.

Редколлегия, Редакция



ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ т.(495) 796-92-91		165x258, 132 стр., 152 гр.	3 в полугод.	За 1 номер	За 3 номера
10277	Доставка заказной бандеролью			2 мес. 1800,15	5400, 45
16729	Льготная цена для оформления подписки только на 6 мес.			—	4559, 94
71436	Для оформления текущей подписки			1899, 92	5699, 76

Подписано в печать 15.03.17. Выход в свет 04.04.17.
Формат 70x108 1/16. Печать офсетная. Заказ 1738

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Г.Г.Харсеева, Н.А.Воронина, Т.Д.Гасретова, О.И.Сылка С.Ю.Тюкавкина

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫЕ ШТАММЫ НЕДИФТЕРИЙНЫХ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Цель. Исследование частоты встречаемости антибиотикорезистентных штаммов различных видов недифтерийных коринебактерий. **Материалы и методы.** Использованы штаммы *C.pseudodiphtheriticum*, *C.pseudotuberculosis*, *C.xerosis*, *C.amycolatum*, *C.striatum*, *C.ulcerans*, выделенные от больных с патологией респираторного и урогенитального тракта, а также от лиц, проходивших профилактическое обследование. Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли методом серийных разведений. **Результаты.** Наибольшее количество штаммов недифтерийных коринебактерий проявляло резистентность к бензилпенициллину (54,8%) и линкомицину (50,7%), а наименьшее — к цефотаксиму, цефазолину (6,8%) и ванкомицину (13,7%). Наибольшее количество антибиотикорезистентных штаммов обнаружено среди представителей видов *C.pseudotuberculosis* (100%), *C.xerosis* (96,0%) и *C.pseudodiphtheriticum* (81,0%). Полирезистентные штаммы чаще выявляли среди видов *C.xerosis*, *C.amycolatum* и *C.striatum*. Штаммы недифтерийных коринебактерий чаще проявляли резистентность к одному и двум антибактериальным препаратам (24,7%), реже — к трем (20,5%), четырем (13,7%), пяти (4,1%) и шести (1,4%) препаратам. **Заключение.** Количество антибиотикорезистентных штаммов недифтерийных коринебактерий велико (89,0%) и неодинаково у разных видов.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 3—8

Ключевые слова: недифтерийные коринебактерии, антибиотикорезистентность, полирезистентные штаммы, антибактериальные препараты

G.G.Kharseeva, N.A.Voronina, T.D.Gasretova, O.I.Sylka, S.Yu.Tyukavkina

ANTIBIOTICS RESISTANCE OF CORYNEBACTERIUM NON DIPHTHERIAE STRAINS

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

Aim. Study the frequency of occurrence of antibiotics resistant strains of various species of *Corynebacterium non diphtheriae*. **Materials and methods.** *C.pseudodiphtheriticum*, *C.pseudotuberculosis*, *C.xerosis*, *C.amycolatum*, *C.striatum*, *C.ulcerans* strains isolated from patients with pathologies of respiratory and urogenital tract, as well as individuals taking prophylaxis examination were used. Sensitivity to antibacterial preparations was determined by the serial dilution method. **Results.** The highest number of *Corynebacterium non diphtheriae* strains displayed resistance to benzylpenicillin (54.8%) and lincomycin (50.7%), and lowest — to cefotaxime, cefazolin (6.8%) and vancomycin (13.7%). The highest number of antibiotics resistant strains were detected among members of *C.pseudotuberculosis* (100%), *C.xerosis* (96.0%) and *C.pseudodiphtheriticum* (81.0%) species. Polyresistant strains were detected most frequently among *C.xerosis*, *C.amycolatum* and *C.striatum* species. Strains of *Corynebacterium*

non diphtheriae most frequently displayed resistance to 1 or 2 antibacterial preparations (24.7%), less frequently — to 3 (20.5%), 4 (13.7%), 5 (4.1%) and 6 (1.4%) preparations. *Conclusion.* The amount of antibiotics resistant strains of *Corynebacterium non diphtheriae* is large (89.0%) and non-similar in various species.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 3—8

Key words: *Corynebacterium non diphtheriae*, antibiotics resistance, polyresistant strains, antibacterial preparations

ВВЕДЕНИЕ

Роль патогенного потенциала недифтерийных коринебактерий длительное время была недооценена. Ранее считалось, что недифтерийные коринебактерии, за исключением *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*, не патогенны для человека, а обнаружение коринебактерий в клиническом материале объяснялось его контаминацией. Однако в настоящее время известно, что штаммы *C. non diphtheriae* следует рассматривать как клинически значимые либо при повторном выделении, либо при обнаружении их в чистой культуре в материале из стерильных биотопов [1, 5, 8, 10, 11]. Особое значение имеет правильная их идентификация и определение чувствительности к антибактериальным препаратам. Это связано с появлением данных о повышении антибиотикоустойчивости различных видов коринебактерий. Важным является определение антибиотикограммы таких видов, как *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium amycolatum*, обладающих устойчивостью ко многим из наиболее часто применяемых в клинической практике антибиотикам. Для большинства видов коринебактерий, характеризующихся лекарственной устойчивостью, эффективны гликопептидные антибактериальные препараты, которые часто используют в качестве первой линии эмпирического лечения.

Формирование полиантибиотикорезистентности недифтерийных коринебактерий, особенно ассоциированных с другими микроорганизмами, обуславливает более тяжелое и длительное течение болезни [1, 4]. Большинство исследователей признают, что резистентность и, особенно, полирезистентность бактерий к антибиотикам достигла уже критического уровня и имеет тенденцию к дальнейшему распространению, в том числе и на новые антибактериальные препараты. Множественной лекарственной устойчивостью обладают такие наиболее часто выделяемые из клинического материала виды *C. non diphtheriae*, как *C. pseudodiphtheriticum*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. urealyticum*, *C. minutissimum* и др. [5, 10]. В то же время, множественная лекарственная устойчивость среди нечасто выделяемых видов коринебактерий наблюдается редко. В связи с этим, актуальным является мониторинг антибиотикочувствительности и выявление штаммов недифтерийных коринебактерий, обладающих множественной резистентностью к антибактериальным препаратам.

Цель работы — исследование частоты встречаемости антибиотикорезистентных штаммов различных видов недифтерийных коринебактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы 73 штамма недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. ulcerans*), выделенные за период с 2009 по 2011 гг. из верхних дыхательных путей (зев,

нос) больных с острым и хроническим тонзиллитом, ангинами, из урогенитального тракта (влагалище, цервикальный канал, моча) от пациентов с острым кольпитом, острым и хроническим пиелонефритом, а также лиц, проходивших профилактическое обследование. Штаммы *S. non diphtheriae* получены из лабораторий бактериологических методов исследования Горбольницы № 1 г. Гуково Ростовской области; Областной детской больницы, ЦГБ № 1 им. Н.А.Семашко и Консультативно-диагностического центра Ростова-на-Дону. Идентифицированы бактериологическим методом в соответствии с Методическими рекомендациями [2] и секвенированием генов 16S рРНК с помощью праймеров для коринебактерий (ЗАО «Синтол», Москва).

Определение чувствительности штаммов недифтерийных коринебактерий к антибактериальным препаратам (бензилпеницилину, цефотаксиму, цефазолину, эритромицину, гентамицину, рифампицину, линкомицину, ванкомицину) проводили методом серийных разведений (микрометодом) в жидкой питательной среде [3]. Результаты метода серийных разведений оценивали по значениям МПК (минимальной подавляющей концентрации) в мг/л. Для контроля метода использовали чувствительные к антибиотикам эталонные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, полученные из ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Для характеристики степени чувствительности коринебактерий к антибактериальным препаратам вычисляли МПК для 50% и 90% исследованных штаммов, а также определяли количество чувствительных и резистентных штаммов *S. non diphtheriae*.

Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Statistica 7.0 и MedCalc (версия 9.3.5.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании чувствительности штаммов недифтерийных коринебактерий к антибактериальным препаратам путем определения МПК₅₀, МПК₉₀ (табл.) установлено, что наибольшую активность проявляли цефотаксим, ванкомицин и цефазолин, подавляющие рост 50% штаммов в концентрации $\leq 0,019$ мг/л. При этом к цефотаксиму оказались чувствительными 90% штаммов, МПК₉₀ которого составила 0,625 мг/л. Наименьшей чувствительностью *S. non diphtheriae* обладали к гентамицину, линкомицину и эритромицину, подавляющим 90% штаммов в концентрации $\geq 5,0$ мг/л.

На основании полученных величин МПК все штаммы недифтерийных коринебактерий подразделили на чувствительные и резистентные. Для разграничения категорий чувствительности (или рези-

Антибиотико-чувствительность штаммов недифтерийных коринебактерий (n=73)

Показатели Антибак- териальные препараты	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Количество штаммов недифтерийных коринебактерий	
			Чувствительные	Резистентные
Ванкомицин	$\leq 0,019$	2,5	63 86,3±4,0%	10 13,7±4,0%
Линкомицин	0,312	$\geq 5,0$	36 49,3±5,9%	37 50,7±5,9%
Цефазолин	$\leq 0,019$	2,5	63 86,3±4,0%	5 6,8±2,9%
Цефотаксим	$\leq 0,019$	0,625	66 90,4±3,4%	5 6,8±2,9%
Бензилпенициллин	0,157	2,5	33 45,2±5,8%	40 54,8±5,8%
Гентамицин	0,390	$\geq 5,0$	59 80,8±4,6%	14 19,2±4,7%
Эритромицин	0,157	$\geq 5,0$	42 57,5±5,8%	21 28,8±5,2%
Рифампицин	0,078	2,5	33 45,2±5,8%	20 27,4±4,8%

стенности) между собой использовали пограничные концентрации МПК антибиотика, которые сравнивали с показателями NCCLS (Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам США), а также показателями EUCAST (Европейский комитет по тестированию антимикробной восприимчивости) для коринебактерий [7, 9].

При определении количества чувствительных к антибактериальным препаратам штаммов *S. non diphtheriae* из 73 исследованных установлено, что наиболее чувствительны (90,4±3,4% штаммов) они были к цефотаксиму, а также к ванкомицину и цефазолину (86,3±4,0%). Наименьшее количество штаммов *S. non diphtheriae* проявляли чувствительность к бензилпенициллину и рифампицину (45,2±5,8%), а также линкомицину (49,3±5,9%).

По результатам определения количества резистентных к указанным антибактериальным препаратам штаммов *S. non diphtheriae* выявили, что наиболее резистентны они были к бензилпенициллину и линкомицину (54,8±5,8% и 50,7±5,9% штаммов соответственно), а наименее — к цефотаксиму, цефазолину (6,8±2,9% штаммов) и ванкомицину (13,7±4,0% штаммов).

При исследовании расширенного спектра резистентности к антибактериальным препаратам различных видов *S. non diphtheriae* установили, что наибольшее количество резистентных штаммов обнаружено среди представителей вида *S. pseudotuberculosis* (100%), причем, среди них чаще штаммы *S. pseudotuberculosis* проявляли резистентность к двум (33,3±13,6%) антибиотикам. В то же время, среди штаммов *S. pseudotuberculosis* наблюдали резистентность к одному, трем (25,0±12,5%), реже — к четырем (16,7±10,8%) антибактериальным препаратам.

Среди других видов коринебактерий большое количество резистентных штаммов обнаружено у *S. xerosis* (96,0±3,9%), причем среди них была выявлена полиантибиотикорезистентность к трем (12,0±6,5%), четырем (28,0±9,0%) и пяти (12,0±6,5%) антибактериальным препаратам. Несколько меньшее количество резистентных штаммов было определено у *S. pseudodiphtheriticum* (81,0±8,6%), среди которых антибиотикорезистентность встречалась чаще к одному (38,1±10,6%), реже — к двум (24,0±9,3%) и трем (19,0±8,6%) антибактериальным препаратам. При исследовании 5 штаммов *S. amycolatum* была выявлена множественная антибиотикорезистентность к трем (1 штамм) и шести антибактериальным препаратам (1 штамм). Из 8 исследованных штаммов *S. striatum* полиантибиотикорезистентность к трем и четырем препаратам обнаружили у 4 и 1 штамма соответственно.

В целом, среди всех исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий большинство оказались антибиотикорезистентными (89,0±3,7%), причем наиболее часто штаммы проявляли резистентность к одному и двум антибактериальным препаратам (24,7±5,0%), реже — к трем (20,5±4,7%), четырем (13,7±4,0%), пяти (4,1±2,3%) и шести (1,4±1,3%) препаратам. Подавляющее количество штаммов *S. non diphtheriae* (*S. pseudotuberculosis*, *S. xerosis*, *S. amycolatum* и *S. striatum*), у которых обнаружена полиантибиотикорезистентность, были выделены из урогенитального тракта.

Наибольшее количество штаммов недифтерийных коринебактерий были резистентны к бензилпенициллину, рифампицину и линкомицину. Интересным является тот факт, что при рассмотрении характера множественной резистентности штаммов *S. non diphtheriae* (к четырем, пяти и шести антибактериальным препаратам), обнаруживаемой в большинстве случаев к указанным антибактериальным препаратам, в единичных случаях встречали штаммы, резистентные не только к гентамицину и эритромицину, но и к цефотаксиму,

ванкомицину и цефазолину. Следует отметить, что из всех штаммов *S. pop diphtheriae* наибольшее количество полиантибиотикорезистентных штаммов определяли среди видов *S. xerosis*, *S. amycolatum* и *S. striatum*.

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных данных (МПК₅₀, МПК₉₀, количество чувствительных и резистентных штаммов) было установлено, что наиболее эффективными антибактериальными препаратами в отношении штаммов недифтерийных коринебактерий явились цефотаксим, цефазолин и ванкомицин, наименее — бензилпенициллин и линкомицин.

Чувствительность к таким антибактериальным препаратам, как цефотаксим и цефазолин, у большинства штаммов коринебактерий можно объяснить, по-видимому, их повреждающим воздействием на клеточную мембрану и подавлением синтеза пептидогликанового слоя, сопровождающихся высвобождением аутолитических ферментов. Клеточная оболочка коринебактерий, имея сложное строение, включает в свой состав такие поверхностные белки, как PS-2, DIP1281, белок 67-72p (гемагглютинин), арабиногалактан, пептидогликан, корд-фактор, липоманнан и липоарабиноманнан, являющиеся факторами патогенности и обуславливающими процессы жизнедеятельности клетки [6]. Повреждающее воздействие цефотаксима и цефазолина на эти структуры влечет за собой их разрушение и лизис коринебактерий.

Наличие большого количества антибиотикорезистентных штаммов недифтерийных коринебактерий к таким препаратам как бензилпенициллин, рифампицин и линкомицин, вероятно, может быть обусловлено давностью и частотой их применения в медицинской практике, а также проведенной ранее антибиотикотерапией обследованных с различными заболеваниями, от которых эти штаммы выделяли. Поскольку антибактериальные препараты в проведенном исследовании были взяты из разных фармакологических групп, возможно наличие различной природы и механизмов резистентности к ним коринебактерий. По-видимому, к таким механизмам могут быть отнесены инактивация антибиотика за счет продукции бета-лактамаз и аминокликозидмодифицирующих ферментов; структурные изменения в молекулах, являющихся мишенями для антибиотика; активное выведение антибиотиков из микробной клетки (efflux pump — эффлюкс-эффект). При этом снижение проницаемости внешних структур бактериальной клетки является наименее специфичным механизмом устойчивости и обычно приводит к формированию устойчивости одновременно к нескольким разным группам антибиотиков.

Таким образом, полученные результаты по изучению антибиотикорезистентности у штаммов недифтерийных коринебактерий показали, что количество резистентных штаммов к одному и нескольким антибактериальным препаратам велико ($89,0 \pm 3,7\%$) и неодинаково у разных видов. Наиболее часто резистентность к антибиотикам проявляли штаммы *S. pseudotuberculosis*, реже *S. xerosis*, *S. amycolatum* (5 из 5 штаммов) и *S. striatum* (7 из 8 штаммов), причем, все они были выделены из урогенитального тракта. В то же время, множественная резистентность штаммов разных видов также отличалась между собой. Так, из всех исследуемых видов коринебактерий наиболее полиантибиотикорезистентными оказались *S. xerosis* и *S. amycolatum*, у которых наблюдалась резистентность к пяти и шести антибиотикам. При этом чаще резистентность формировалась к бензилпенициллину, линкомицину и рифампицину, реже — к эритромицину и гентамицину. Большинство штаммов не-

дифтерийных коринебактерий были чувствительны и не проявляли резистентность к цефотаксиму, цефазолину и ванкомицину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Краева Л.А., Манина Ж.Н., Ценева Г.Я. и др. Этиологическое значение *Corynebacterium non diphtheriae* у больных с различной патологией. Журн. микробиол. 2007, 5: 3-7.
2. Методические рекомендации 4.2.00.20-11 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*». М., 2011.
3. Методические указания 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». М., 2004.
4. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Миронов А.Ю. и др. Антибиотикочувствительность штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в г.Ростове-на-Дону и Ростовской области. Клиническая лабораторная диагностика. 2012, 10: 62-64.
5. Bernard K.A. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. J. Clin. Microbiol. 2012, 50 (10): 3152-3158.
6. Burkovski A. Cell envelope of *Corynebacteria*: structure and influence on pathogenicity. ISRN Microbiol. 2013, P. 1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/935736>.
7. EUCAST Definitive document. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Infect. 1998, 4: 291-296.
8. Funke, G., von Graevenitz A., Clarridge J.E. et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 1997, 10 (1): 125-159.
9. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement M100-S9. 1999, 19 (1).
10. Ortiz-Pérez A., de Hijas N.Z.M., Esteban J. et al. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. Microb. Drug. Resist. 2010, 16 (4): 273-277.
11. Reddy B.S., Chaudhury A., Kalawat U. et al. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). Indian J. Med. Microbiol. 2012, 30 (1): 52-57.

Поступила 15.07.16

Контактная информация: Харсеева Галина Георгиевна, д.м.н., проф., 344022, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29, р.т. (863)250-41-09

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Н.А.Селянская, С.В.Титова, С.Н.Головин, Л.А.Егуазарян, Л.М.Веркина, А.В.Тришина

ДЕЙСТВИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА БИОПЛЕНКИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ЭЛЬ ТОР

Ростовский-на-Дону противочумный институт

Цель. Изучение действия антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов Эль Тор. *Материалы и методы.* Определяли чувствительность *Vibrio cholerae* El Tor (6 штаммов) к различным концентрациям антибактериальных препаратов (доксизиклин, тетрациклин, левомецетин, рифампицин, гентамицин, цефтазидим) (МУК 4.2.2495-09). Для визуализации действия препаратов на биопленки использовали трансмиссионную электронную микроскопию. *Результаты.* Значения минимальных подавляющих концентраций антибактериальных препаратов в отношении биопленок увеличилось в 5 — 100 раз по сравнению с планктонными культурами. При электронно-микроскопическом исследовании при действии антибактериальных препаратов на биопленки наблюдали некоторое сглаживание тяжелой между

бактериальной клеткой и субстратом, изменение формы вибрионов, снижение электронной плотности матрикса с повышением его прозрачности. *Заключение.* Изучение действия антибактериальных препаратов на биопленки может повысить эффективность рациональной антибиотикотерапии инфекций за счет выбора препаратов, нарушающих функционирование микробных сообществ.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 8—15

Ключевые слова: холерные вибрионы, планктонная и биопленочная культуры, антибактериальные препараты, антибиотикорезистентность, электронно-микроскопическое исследование

N.A.Selyanskaya, S.V.Titova, S.N.Golovin, L.A.Egiazaryan, L.M.Verkina, A.V.Trishina

EFFECT OF ANTIBACTERIAL PREPARATIONS ON *VIBRIO CHOLERAE* EL TOR BIOFILMS

Rostov-on-Don Institute of Plague Control, Russia

Aim. Study the effect of antibacterial preparations on biofilms of *Vibrio cholerae* El Tor. *Materials and methods.* Sensitivity of *V. cholerae* El Tor (6 strains) to various concentrations of antibacterial preparations (doxycycline, tetracycline, levomycetin, rifampicin, gentamycin, ceftazidime) was determined (MD 4.2.2495-09). Transmission electron microscopy was used for visualization of the effect of preparations on biofilms. *Results.* The values of minimal inhibiting concentrations of antibacterial preparations against biofilms have increased by 5—100 times compared with plankton cultures. Certain smoothing of strands between the bacterial cell and substrate, alteration of vibrios' form, reduction of electron density of the matrix with an increase of its transparency were observed during electron-microscopy of the effect of antibacterial preparations on the biofilm. *Conclusion.* Study of the effect of antibacterial preparations on biofilms could increase effectiveness of rational antibiotics therapy of infections by selection of preparations that disrupt functioning of microbial communities.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 8—15

Key words: cholera vibrios, plankton and biofilm cultures, antibacterial preparations, antibiotics resistance, electron-microscopy study

ВВЕДЕНИЕ

Использование антибактериальных препаратов для лечения холеры является необходимым дополнением патогенетической терапии, так как способствует сокращению периода диареи, выделения вибрионов, позволяет значительно уменьшить объем внутривенных вливаний солевых растворов и сроки медицинского наблюдения, помогает предотвратить формирование вибрионосительства [15]. В настоящее время в инструктивно-методических документах [3, 6] для лечения холеры рекомендовано использование доксициклина, тетрациклина, фторхинолонов, сульфаметоксазола/ триметоприма, левомицетина, аминогликозидов, а также их комбинаций с рифампицином и фуразолидоном. Несмотря на доказанную эффективность этих препаратов, в ряде случаев после курса терапии ими у больных холерой наблюдались бактериальные рецидивы [12]. В свете современных представлений об организации жизни холерных вибрионов в окружающей среде и в организме человека объяснение причин этого явления кроется в способности бактерий

образовывать биопленки, что повышает их устойчивость к различным неблагоприятным воздействиям, в том числе к антибактериальным препаратам [4, 16].

Отечественными и зарубежными учеными описаны морфологические особенности, механизмы, стадии формирования биопленок холерными вибрионами, а также факторы, влияющие на этот процесс [7, 9, 11, 17 — 19]. Однако не изучено действие на биопленки холерных вибрионов антибактериальных препаратов. Исследование их влияния на развитие и структуру биопленок является важным для разработки современных способов борьбы с холерой.

В связи с этим, целью настоящего исследования было изучение действия антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов Эль Тор.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штаммы *Vibrio cholerae* El Tor ctx+tcp+, выделенные от больных (Р-5879, 19667, 18826) и из воды (19241, 19613), полученные из Музея живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института.

Значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибактериальных препаратов для планктонных культур определяли методом двукратных серийных разведений в плотной питательной среде в соответствии с [2].

Формирование биопленки проводили способом, описанным в предыдущих работах [11], во флаконах с 30 мл стерильной водопроводной воды при комнатной температуре, используя в качестве твердого субстрата пластинки из пищевого пластика (0,5x1,5 см). Суспензию холерных вибрионов добавляли в конечной концентрации $n \times 10^4$ м.кл/мл по отраслевому стандарту мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ОСО-42-25-59-86 П). Для изучения антибиотико-чувствительности на третьи сутки культивирования пластинки с образовавшимися биопленками после трехкратного промывания в физиологическом растворе переносили в пенициллиновые флаконы с жидкой питательной средой (бульон Мартена, рН 7,7), содержащие антибактериальные препараты в концентрациях, равных значениям МПК для планктонных культур данных штаммов, а также превышающих их в 5, 10, 50, 100 раз. В контрольные пробы с биопленкой антибактериальный препарат не добавляли. Через 24 ч инкубирования в термостате (37°C) делали отпечатки биопленок и высев 0,1 мл планктона на чашки Петри с агаром Мартена (рН 7,7). Результат учитывали через 24 часа по наличию или отсутствию роста холерных вибрионов.

В работе использовали антибактериальные препараты, рекомендуемые для этиотропной терапии холеры [3, 6].

Визуализацию действия антибактериальных препаратов на биопленки *V.cholerae* El Tor осуществляли просвечивающим электронным микроскопом Jeol JEM-1011, получая изображения при помощи CCD-rfvthsOlympus-SIS Veleta.

Для обработки образцов на электронном микроскопе был разработан комбинированный метод культивирования биопленок и дальнейшей их пробоподготовки, при котором минимально нарушается структура самой биопленки и максимально возможно визуализируются основные ее компоненты: внеклеточный матрикс и микробные клетки со свойственными им особенностями.

Биопленки выращивали непосредственно на медных сеточках для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) с формаровой пленкой-подложкой, смонтированных на предметных стеклах.

Приготовление пленок-подложек, монтаж опорных сеток и фиксацию их на предметные стекла производили при условиях работы с ПБА I — II группы патогенности в стерильных условиях в боксе микробиологической безопасности 2 класса. Стекло после специальной стерилизации с пленкой под углом 30° погружали в кристаллизатор с налитой до образования выпуклого мениска дистиллированной водой. При этом пленка отделяется от стекла и остается на поверхности воды. На плавающую пленку помещали опорные сеточки в количестве 4 — 5 штук. Таким образом, мы получали субстрат для формирования биопленок.

По достижении необходимой степени зрелости биопленки субстрат переносили в пенициллиновые флаконы с антибактериальными препаратами.

Для окраски полученного образца применяли схему, позволяющую проводить одновременную фиксацию образца с его обеззараживанием (глутаровый альдегид, тетраоксид осмия), контрастирование (тетраоксид осмия) и визуализацию матрикса биопленки (рутениевый красный, тетраоксид осмия). При использовании этого метода на первом этапе образуется связь между катионом рутениевого красного и анионными группами кислых полисахаридов, а при последующей обработке тетраоксидом осмия в окислительно-восстановительной реакции, катализируемой рутениевым красным, низшие окислы осмия осаждаются на окисленном субстрате. После высыхания опорные сетки с образцами отделяли пинцетом от предметного стекла, помещали в держатель и исследовали методом ТЭМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение МПК антибактериальных препаратов для планктонных культур показало чувствительность всех исследуемых штаммов к тетрациклину, доксициклину, гентамицину, левомицетину, цефтазидиму, рифампицину. По данным литературы, для достижения бактерицидного эффекта в отношении микроорганизмов, структурированных в биопленку, могут потребоваться концентрации антибактериальных препаратов, в несколько раз превышающие значения МПК для планктонных форм [13], в связи с чем, при изучении антибиотикочувствительности биопленочных культур антибактериальные препараты были использованы в концентрациях, равных их МПК для планктонных культур, а также в 5, 10, 50, 100 раз больше.

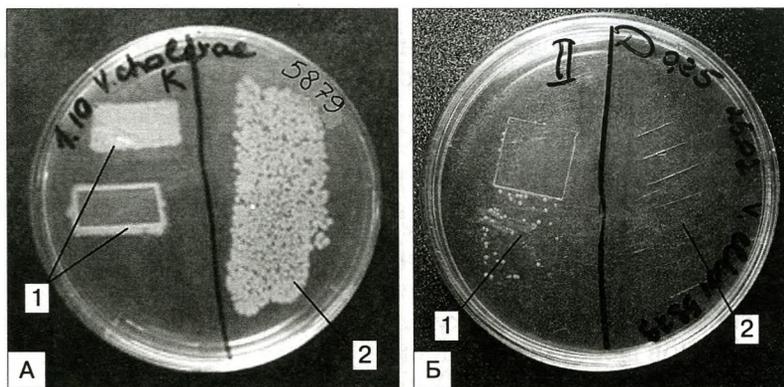


Рис. 1. Оценка жизнеспособности *V.cholerae* El Tor P-5879 в биопленочной (1) и планктонной формах (2).

А — без воздействия антибактериального препарата (контроль); Б — воздействие доксициклином в концентрации 0,25 мг/л (опыт).

Рост биопленок штаммов при воздействии разных концентраций антибактериальных препаратов

Антибактериальный препарат	Кол-во раз, превышающих МПК*	Штамм				
		P-5879	18826	19241	19613	19667
Доксициклин	1	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	-	-	+	-	+
	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
Тетрациклин	1	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
Левомецетин	1	+	+	+	+	+
	5	+	+	-	+	+
	10	+	+	-	+	+
	50	-	+	-	+	-
	100	-	-	-	-	-
Гентамицин	1	+	+	+	+	+
	5	-	-	-	+	+
	10	-	-	-	-	+
	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
Рифампицин	1	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	-	+
	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
Цефтазидим	1	+	+	+	+	+
	5	-	-	-	-	+
	10	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-

Примечание. * Для планктонных культур; + наличие роста; — отсутствие роста.

Антибиотикочувствительность биопленочных культур *V. cholerae* оказалась ниже, чем планктонных. Воздействие на биопленки изученных штаммов антибактериальных препаратов в концентрациях, равных МПК для планктонных клеток, не приводило к их гибели. На рис. 1 представлена оценка жизнеспособности *V. cholerae* El Tor P-5879 в биопленочной и планктонной формах без воздействия антибактериального препарата (контроль) и в присутствии доксициклина в концентрации 0,25 мг/л (МПК). В контроле наблюдали рост на агаре Мартена в отпечатках пластинок с биопленками в виде сплошного слива колоний. При высеве из планктона концентрация холерных вибрионов составляла 1×10^5 — 1×10^6 КОЕ/мл (рис. 1 А). Воздействие доксициклином приводило к гибели планктонной культуры штамма с сохранением жизнеспособности вибрионов в составе биопленки (1×10^2 — 1×10^3 КОЕ/мл) (рис. 1 Б).

Доксициклин вызывал гибель *V. cholerae* El Tor P-5879, 18826 и 19613 в концентрациях, превышающих МПК для планктонных культур этих штаммов в 5 раз, а *V. cholerae* El Tor 19241 и 19667 — в 50 раз (табл.). Биопленки изученных штаммов оказались в 50 раз менее чувствительными к тетрациклину и рифампицину, за исключением *V. cholerae* El Tor 19613, биопленки которого

утрачивали жизнеспособность при концентрациях, равных 10 МПК для планктонной культуры. К левомецетину наибольшую чувствительность продемонстрировали биопленки штамма 19241. Больше всего вызывающие гибель вибрионов в составе биопленок концентрации левомецетина (в 100 раз) увеличились в отношении штаммов *V.cholerae* El Tor 18826 и 19613. Концентрации гентамицина и цефтазидима, подавляющие рост биопленок, колебались от 5 МПК (для штаммов Р-5879, 18826, 19241) до 10 — 50 МПК (штамм 19667). Необходимо подчеркнуть, что в контрольных высевах планктонных культур и в отпечатках биопленок всех изученных штаммов, не подвергшихся воздействию антибактериальных препаратов, наблюдали стабильный рост холерных вибрионов.

ТЭМ позволила визуализировать результат воздействия антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов и показала, что в отсутствии антибактериальных препаратов биопленки имеют сложную структурную организацию и состоят из групп бактерий, адгезированных к поверхности и

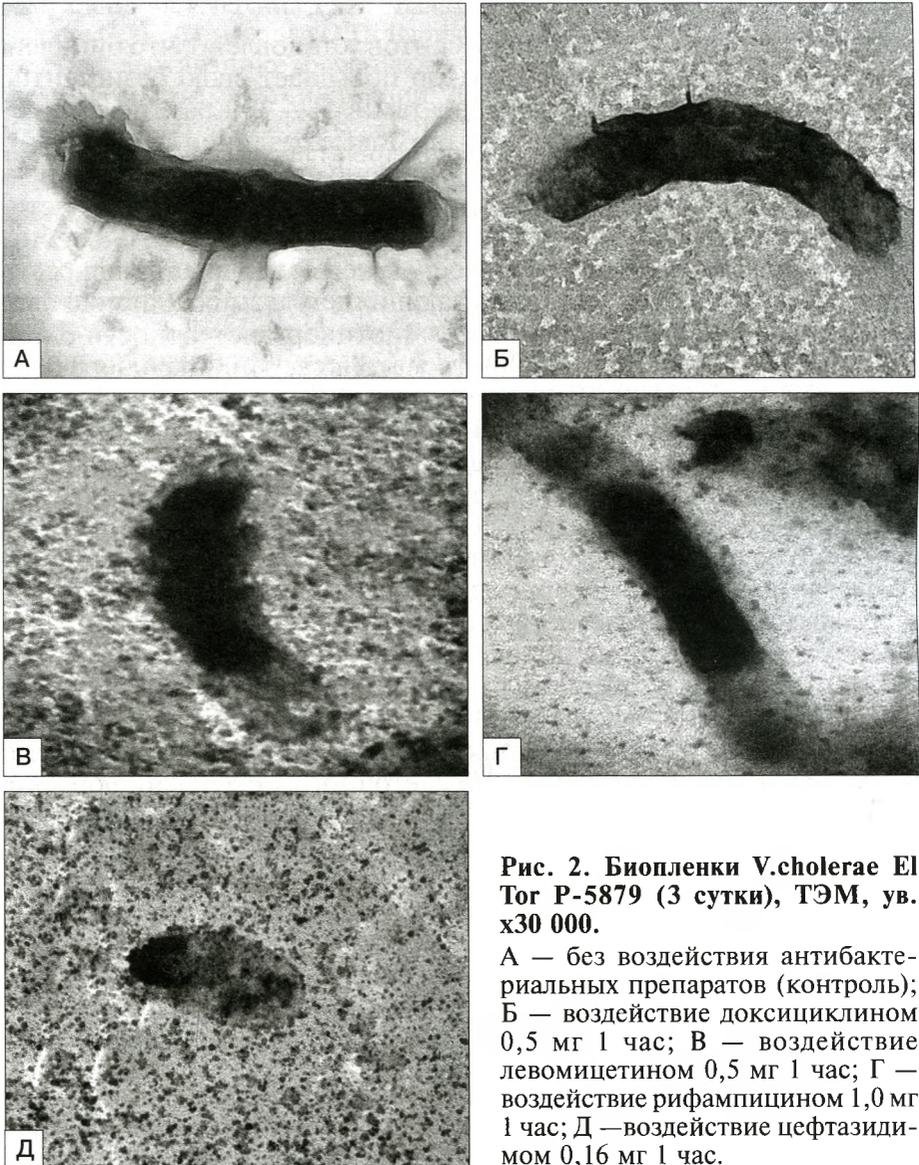


Рис. 2. Биопленки *V.cholerae* El Tor Р-5879 (3 сутки), ТЭМ, ув. х30 000.

А — без воздействия антибактериальных препаратов (контроль); Б — воздействие доксициклином 0,5 мг 1 час; В — воздействие левомецетином 0,5 мг 1 час; Г — воздействие рифампицином 1,0 мг 1 час; Д — воздействие цефтазидимом 0,16 мг 1 час.

окруженных густым аморфным веществом с многочисленными тяжами — внеклеточным матриксом (рис. 2).

Воздействие антибактериальных препаратов в течение 1 часа в концентрациях, соответствующих МПК для планктонных культур, не изменяло морфологию вибрионов в составе биопленок, а также не повреждало структуру матрикса. Однако наблюдали некоторое сглаживание тяжей между бактериальной клеткой и субстратом, особенно выраженное при воздействии левомицетином, рифампицином и цефтазидимом (рис. 2). При воздействии цефтазидимом также можно заметить некоторое округление формы вибрионов, снижение электронной плотности матрикса, повышение его прозрачности, как бы «истончение». Механизмом действия этого препарата является повреждение клеточной стенки бактерий, что, возможно, и вызвало изменение формы. В литературе описана способность препаратов с аналогичным механизмом действия частично подавлять образование биопленки [5].

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов установлено, что биопленочная популяция холерных вибрионов Эль Тор повышает свою резистентность к изученным антибактериальным препаратам в 5 — 100 раз, по сравнению с планктонными культурами, и имеет штаммовые различия. По данным литературы, сниженная чувствительность биопленок к антибактериальным препаратам связана с различием в метаболической активности и скорости роста отдельных клеток бактерий, наличием в популяциях клеток, способных выживать в стрессовых условиях, экспрессией невыявленных генов резистентности, образованием ферментов, вызывающих деградацию или модификацию антибиотиков [8]. Одной из причин антибиотикорезистентности биопленок является наличие экзополисахаридного матрикса, защищающего бактерии. Способность проникать через этот барьер или разрушать его является важным показателем эффективности того или иного антибактериального препарата [10]. Некоторые антибиотики, влияющие на синтез белка, имитируют действие стрессовых факторов, вызывающих формирование биопленки, стимулируют образование внеклеточного матрикса и биопленок [9, 14].

Современные представления о роли биопленок в патогенезе инфекционных заболеваний требуют новых подходов к их диагностике и лечению. В настоящее время ведется разработка новых антибиотиков, изменение тактики антибиотикотерапии, а также поиск ингибиторов межклеточной сигнализации, ферментов и других методов разрушения биопленок. Терапевтическое действие на биопленки может быть направлено на механизмы первичной адгезии бактерий к поверхности, блокирование синтеза или разрушения полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией, а также оно может сочетаться с собственно бактерицидными агентами [1]. Изучение действия антибактериальных препаратов на биопленки может повысить эффективность рациональной антибиотикотерапии инфекций за счет выбора препаратов, нарушающих функционирование микробных сообществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голуб А.В. Бактериальные биопленки — новая цель терапии? *Клин.микробиол. и антимикроб. химиотер.* 2012, 1:23-29.
2. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. МУ 4.2.2495-09. М., 2009.

3. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521-09. М., Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2009.
4. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журн. микробиол. 2011, 3: 99-109.
5. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Орлова О.Г. и др. Избирательное действие ингибиторзащищенных аминопенициллинов на бактериальные биопленки эшерихий, стафилококков и лактобацилл. Лечение и профилактика. 2013, 4 (8): 29-33.
6. Санитарная охрана территории. Организация, обеспечение и оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий в случае завоза или возникновения особо опасных инфекций, контагиозных вирусных геморрагических лихорадок, инфекционных болезней неясной этиологии, представляющих опасность для населения РФ и международного сообщения. МУ 3.4.1030. М., 2001.
7. Сизова Ю.В., Черепяхина И.Я., Балахнова В.В., Бурлакова О.С., Сизова Е.В., Помухина О.И., Фецайлова О.П. Вариабельность свойств, характеризующих способность к выживанию холерных вибрионов, в биопленочных сообществах. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 3: 54-57.
8. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок. Микробиология. 2010, 4: 1-12.
9. Татаренко О.А., Алексеева Л.П., Телесманич Н.Р., Шестиалтынова И.С., Чемисова О.С., Маркина О.В., Непомнящая Н.Б., Ускова Н.Н. Влияние некоторых факторов на формирование биопленки токсигенными и атоксигенными холерными вибрионами эль-тор. Эпидемиол. и инф. болезни. 2012, 5: 36-40.
10. Тец В.В., Тец Г.В. Микробные биопленки и проблемы антибиотикотерапии. Пульмонология и аллергология. 2013, 4: 60-64.
11. Титова С.В., Кушнарёва Е.В. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок *in vitro* с помощью нового методического подхода. Фундаментальные исследования. 2014, 10: 375-379.
12. Турьянов М.Х., Царегородцев А.Д., Петров В.А. и др. Организация медицинских мероприятий по ликвидации крупного очага холеры в Дагестане. Эпидемиол. и инф. болезни. 1996, 3: 15-17.
13. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012, 14 (1):51-58.
14. Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation. Int. J. Artif. Organs. 2011, 34: 737-751.
15. Leibovici-Weissman Y., Neuberger A., Bitterman R. et al. Antimicrobial drugs for treating cholera. Cochrane Database Syst. Rev. 2014, 6:8625.
16. Sadvskaya I., Vinogradov E., Li J. et al. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the *ndvB* gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated β -(1-3)-glucans, which bind aminoglycosides. Glycobiology. 2010, 20: 895-904.
17. Sun S., Tay Q.X.M., Kjelleberg S. et al. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. ISME J. 2015, 9 (8): 1812-1820.
18. Tamayo R., Patimalla B., Camilli A. Growth in biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 2010, 78 (8): 3560-3569.
19. Townsley L., Yildiz F.H. Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Environ. Microbiol. 2015, 17 (11): 4290-305.

Поступила 05.10.16

Контактная информация: Селянская Надежда Александровна, к.м.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40, р.т. (863)234-23-11

ОБЗОР ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ ПО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ (ГЛПС) НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ЗА 1990 — 2015 ГГ.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Цель. Анализ заболеваемости ГЛПС на территории Российской Федерации за последние 25 лет (с 1990 по 2015 гг.). *Материалы и методы.* Для анализа использованы данные официальной статистики Роспотребнадзора, в том числе Федерального центра гигиены и эпидемиологии, а также материалы, поступившие из региональных управлений Роспотребнадзора и центров гигиены и эпидемиологии. Основным методом исследования был эпидемиологический анализ. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением общепринятых методов вариационной статистики с элементами системного анализа. *Результаты.* За изучаемый период (1990 — 2015 гг.) на территории Российской Федерации зарегистрировано 194 116 случаев заболевания ГЛПС. Заболеваемость регистрировалась в 8 федеральных округах Российской Федерации в 58 субъектах. Наиболее напряженная эпидемиологическая обстановка отмечена на территории Приволжского федерального округа, на долю которого за изучаемый период пришлось 86,4% от общей заболеваемости ГЛПС по стране. Выполнен анализ заболеваемости в каждом федеральном округе, показаны территории, наиболее неблагоприятные в эпидемиологическом отношении. *Заключение.* Приведенные данные по заболеваемости ГЛПС отражают неблагоприятную ситуацию по данному заболеванию в Российской Федерации. Предложены меры по предупреждению возникновения заболеваний с целью общего снижения уровня заболеваемости в Российской Федерации.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 16—21

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, заболеваемость, эпидемиологический анализ, неспецифическая профилактика

A.V.Ivanova, N.V.Popov, E.V.Kuklev, A.K.Adamov, S.A.Scherbakova

REVIEW OF EPIDEMIOLOGIC SITUATION ON HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME (HERS) IN RUSSIAN FEDERATION IN 1990 — 2015

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

Aim. Analyze HFRS morbidity in Russian Federation during the last 25 years (1990 — 2015). *Materials and methods.* Official statistics of Federal Service for Surveillance on Consumers' Rights Protection and Human Wellbeing (CPS), including Federal Centre of Hygiene and Epidemiology, were used for the analysis, as well as materials from regional departments of CPS and centers of hygiene and epidemiology. Epidemiologic analysis was the main method. Statistical treatment of the results obtained was carried out using generally accepted methods of variation statistics with elements of system analysis. *Results.* For the studied period (1990 — 2015) 194 116 cases of HFRS were registered. Morbidity was registered in 8 federal districts of the Russian Federation in 58 subjects. The most intense epidemiologic situation was noted in Privolzhsky Federal District, that accounted for 86.4% of total HFRS morbidity during the studied period. Analysis of morbidity was carried out in every federal district, most epidemically unfavorable territories are shown. *Conclusion.* The data

presented on HFRS morbidity reflect unfavorable situation for this disease in Russian Federation. Measures to prevent the emergence of diseases to reduce the general level of morbidity in Russian Federation are presented.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 16—21

Key words: hemorrhagic fever with renal syndrome, morbidity, epidemiologic analysis non-specific prophylaxis

ВВЕДЕНИЕ

В Российской Федерации ГЛПС занимает ведущее место среди зоонозных вирусных инфекций и одно из первых мест среди всех природно-очаговых болезней человека [2].

На территории России эпидемически активные очаги ГЛПС расположены в основном в умеренных широтах Европейской части и на Дальнем Востоке. В дальневосточных регионах, на долю которых приходится чуть больше 1,5% от всех случаев заболевания ГЛПС в России, возбудителями инфекции являются хантавирусы Хантаан, Сеул и Амур. Ежегодная заболеваемость ГЛПС на Дальнем Востоке составляет в среднем 2 на 100 тыс. населения и регистрируется, в основном, среди жителей Приморского и Хабаровского краев и Амурской области [6]. В европейской части России природные очаги ГЛПС, главным образом, приурочены к лесным ландшафтам. Наиболее активная очаговая территория расположена в оптимуме ареала рыжей полевки — в широколиственных и хвойно-широколиственных лесах Приуралья и Среднего Поволжья, относящихся к Приволжскому федеральному округу (ПФО) [1, 3].

На территории Приволжского федерального округа заболеваемость ГЛПС достигает 87,6% от таковой в Европейской части России и 86,2% от всей заболеваемости, зарегистрированной в целом по Российской Федерации.

За многолетний период эпидемиологического наблюдения (с 1935 г.) заболеваемость ГЛПС характеризуется подъемами каждые 3 — 4 года, обусловленными, в основном, циклическим эпизоотическим процессом в очагах вируса Пуумала, с которым связано более 95% заражений людей на территории России. В очагах Дальнего Востока рост заболеваемости ГЛПС в 1,5 — 2 раза связан с особенностями эпизоотического процесса в популяциях восточноазиатской мыши, активность которого отмечается через 4 — 5 и более лет [5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения эпидемиологической ситуации по заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом были проанализированы данные официальной статистики Роспотребнадзора, в том числе Федерального центра гигиены и эпидемиологии, а также материалы, поступившие из региональных управлений Роспотребнадзора и центров гигиены и эпидемиологии. Основным методом исследования был эпидемиологический анализ. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением общепринятых методов вариационной статистики с элементами системного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За последние 25 лет на территории Российской Федерации сохраняется чрезвычайно напряженная обстановка по заболеваемости природно-очаговыми вирусными болезнями. А в самой структуре природно-очаговой заболеваемо-

сти, регистрирующейся на территории Российской Федерации, доля ГЛПС достигает практически 90%, что делает данное заболевание одним из актуальнейших среди всех природно-очаговых заболеваний в России [3, 4].

По данным Роспотребнадзора за анализируемый период (1990 — 2015 гг.) на территории Российской Федерации было зарегистрировано 194 116 случаев заболевания ГЛПС среди населения.

За анализируемый период наблюдалось несколько подъемов заболеваемости в 1994, 1999, 2001, 2004, 2008, 2009 годах с показателями заболеваемости от 5,9 до 7,6 на 100 тысяч населения.

Наиболее крупный подъем заболеваемости ГЛПС зафиксирован в 1997 году (в 4,9 раза выше показателя заболеваемости 1996 года). Абсолютное количество заболеваний составило 20 948 случаев (14,2 на 100 тысяч населения), при этом, 50% от всех зарегистрированных случаев заболевания пришлось на территорию Республики Башкортостан (10 057 случаев). Заболеваемость ГЛПС среди населения республики достигала 295 на 100 тысяч населения, а в целом по стране разнилась от 0,4 на 100 тысяч населения в Забайкальском крае до 60,1 на 100 тысяч населения в Удмуртской Республике.

За последние пять лет (2011 — 2015 гг.) наблюдался 1 крупный подъем заболеваемости ГЛПС в 2014 году (в 2,6 раза по сравнению с 2013 годом) в основном за счет Центрального, Приволжского и Уральского федеральных округов. Так, в Саратовской области отмечен рост заболеваемости в 9,6 раза, Белгородской области — в 7,3 раза, Республике Татарстан — в 6,3 раза, Калужской области — в 6,2 раза, в Свердловской области — в 5,4 раза.

Заболеваемость регистрировалась в 8 федеральных округах Российской Федерации в 58 субъектах. Однако распределение заболеваемости по территории Российской Федерации было не однородным. В 97% случаев заболеваемость регистрировалась в Европейской части России, главным образом, в очагах, приуроченных к лесным ландшафтам. Распределение заболеваемости ГЛПС по федеральным округам Российской Федерации за анализируемый период отображено в табл.

Среди всех случаев заболевания ГЛПС по стране на долю Приволжского Федерального округа за анализируемый период приходилось 86,4%, что характеризует этот регион как территорию с наибольшей эпидемической активностью природных очагов ГЛПС в стране.

Всего в Приволжском федеральном округе за 1990 — 2015 гг. зарегистрировано 167 778 случаев заболевания ГЛПС, при этом в среднем на 1 год приходилось 6712 больных. За период с 2000 по 2010 гг. на территории округа было зарегистрировано 68 666 случаев заболевания ГЛПС, на 1 год — 6242 больных, что на 470 случаев меньше среднелетних значений. Аналогичные показатели заболеваемости регистрировались и в предыдущем десятилетии (в 1990 — 1999 гг. зарегистрировано 67 779 случаев, в год — 6778 больных). За последние пять лет регистрации (2011 — 2015 гг.) зафиксировано 37 801 случаев заражения людей ГЛПС. Среднее значение заболеваемости за пять лет составляло 7560 случаев.

на 470 случаев меньше среднелетних значений. Аналогичные показатели заболеваемости регистрировались и в предыдущем десятилетии (в 1990 — 1999 гг. зарегистрировано 67 779 случаев, в год — 6778 больных). За последние пять лет регистрации (2011 — 2015 гг.) зафиксировано 37 801 случаев заражения людей ГЛПС. Среднее значение заболеваемости за пять лет составляло 7560 случаев.

Распределение заболеваемости ГЛПС по Федеральным округам РФ

Федеральный округ	1990—1999 гг.	2000—2009 гг.	2010—2015 гг.
	Абсолютное количество заболевших		
Приволжский	67 779	69 777	30 222
Центральный	3050	5802	5277
Уральский	2482	1734	612
Дальневосточный	2520	1143	649
Северо-Западный	729	947	873
Южный	56	203	62
Сибирский	190	6	2
Северо-Кавказский	—	—	2
Крымский	—	—	—

К наиболее неблагополучным по ГЛПС субъектам ПФО относятся Республики Башкортостан, Удмуртия, Татарстан, в которых доля от всей заболеваемости ГЛПС в ПФО за анализируемый период составляла 62%, а среднее количество заболевших за исследуемый период превышало 30 человек на 100 тысяч населения.

Все случаи заражения ГЛПС на территории ПФО были ассоциированы с серотипом вируса Puumala.

Высокая заболеваемость ГЛПС регистрируется и в Центральном федеральном округе. За последние 25 лет ее доля в общей структуре заболеваемости по стране составляла порядка 7,2%. Ежегодно регистрировалось от 100 до 1318 случаев заболевания. Случаи заболевания были отмечены во всех 18 субъектах федерального округа, однако наибольшее количество больных регистрировалось в Тульской (18,4%), Ярославской (16%) и Московской областях (17,2%). По сравнению с предыдущим десятилетием (1990 — 1999 гг.) заболеваемость в 2000 — 2010 гг. в округе выросла в 2,3 раза (с 3050 до 7160 случаев). А за последние 5 лет (2011 — 2015 гг.) в округе уже зарегистрировано 4536 случаев. Ежегодно регистрировалось от 617 до 1283 случаев заболевания, причем с каждым годом регистрации количество случаев заболевания только увеличивалось. В природных очагах ГЛПС Центрального федерального округа на большинстве территорий циркулирует хантавирус серотипа Puumala, а в 3 — 5% случаев заболевание ассоциируют с хантавирусом серотипа Dobrava.

Третье место по эпидемиологической активности природных очагов ГЛПС в стране занимает Уральский федеральный округ. Согласно официальной статистике Роспотребнадзора за предшествующий десятилетний период с 2000 по 2010 гг. на территории округа было зарегистрировано 1838 случаев заболевания. По сравнению с предыдущим десятилетним периодом (1990 — 1999 гг.) заболеваемость в целом по округу снизилась в 1,3 раза (с 2482 до 1957 случаев). При этом почти 80% всех зарегистрированных случаев ГЛПС в округе приходилось на Челябинскую область (1551 случай).

За последние пять лет (2011 — 2015 гг.) в Уральском федеральном округе зарегистрировано 508 случаев заболевания населения геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, при этом, как и прежде, подавляющее большинство случаев отмечалось на территории Челябинской области. Все случаи заражения ГЛПС были ассоциированы с серотипом вируса Puumala.

За аналогичный период регистрации (1990 — 2015 гг.) в Северо-Западном федеральном округе зарегистрировано 2549 случаев заболевания, что составляет 1,3% от общероссийской заболеваемости за этот период. С 2000 по 2011 г. зарегистрировано 1127 случаев ГЛПС, что на 398 случаев меньше, чем в предыдущей декаде (1990 — 1999 гг.). Больше половины всех больных ГЛПС в округе составляли жители Вологодской области (611 случаев), впервые случаи ГЛПС были выявлены в Новгородской (2 случая) и Архангельской областях (1 случай). За последние пять лет (2011 — 2015 гг.) на территории округа зарегистрировано 795 случаев заболевания, что на 293 случая превышает показатели предыдущей пятилетней заболеваемости (2005 — 2010 гг. — 502 случая). Единственным в ФО субъектом, на территории которого больных ГЛПС не регистрировали, остается Ненецкий автономный округ. Все случаи заражения ГЛПС на территории Северо-Западного ФО также были ассоциированы с серотипом вируса Puumala.

В Дальневосточном регионе за период с 1990 по 2015 гг. было официально зарегистрировано 4312 случаев заболевания ГЛПС среди населения округа, что составляет 2,2% от общероссийской заболеваемости за этот период. С 2000

по 2010 г. на территории округа было зарегистрировано 1224 случая заболевания ГЛПС. По сравнению с предыдущим десятилетием (1990 — 1999 гг.) заболеваемость в целом по округу снизилась в 2 раза (с 2520 до 1224 случая).

За последние пять лет зарегистрировано 568 случаев, что на 44 случая меньше заболеваемости, зарегистрированной за предыдущий пятилетний период (за 2005 — 2010 гг. заболеваемость составляла 612 случаев). Заражения людей обусловлены хантавирусами трех серотипов: Seoul, Hantaan и Amur.

По данным Роспотребнадзора за исследуемый период на территории Южного федерального округа зарегистрирован 321 случай заболевания ГЛПС, что составляет 0,16% от общероссийской заболеваемости за этот период. С 2000 по 2011 гг. на территории округа зарегистрировано 217 случаев заболевания ГЛПС, что почти в 4 раза превышает показатели заболеваемости предыдущего десятилетнего периода (56 случаев). Все случаи заболевания людей были выявлены в Волгоградской области (113 случаев) и Краснодарском крае (104 случая). За последние пять лет (2011 — 2015 гг.) на территории округа зарегистрировано 58 случаев заболевания людей. По сравнению с предыдущим пятилетним периодом заболеваемость снизилась практически в 2 раза (103 случая за 2005 — 2010 гг.). Практически в 100% случаев заболевания источником заражения людей являлись рыжие полевки, носители вируса Puumala, однако описаны случаи заражения людей тяжелыми формами ГЛПС, обусловленными вирусом Dobrava.

В Сибирском ФО за период с 1990 по 2015 гг. было официально зарегистрировано 198 случаев заболевания ГЛПС среди населения округа, что составляет 0,2% от общероссийской заболеваемости за этот период. Согласно официальной статистики Роспотребнадзора, с 1990 по 1999 гг. было зарегистрировано 190 случаев ГЛПС, а за последующие 15 лет регистрации — всего 8 случаев.

В Северо-Кавказском ФО регистрировались единичные спорадические случаи заболевания. Не исключено, что случаи заболевания могли быть завозными из других регионов страны.

За анализируемый период на территории Российской Федерации отмечена крайне неблагоприятная эпидемиологическая обстановка по ГЛПС. Стабильный рост заболеваемости ГЛПС может определяться множеством факторов. К основным факторам риска роста заболеваемости ГЛПС относят: возрастающую численность грызунов, связанную с недостаточной организацией и проведением дератизационных работ; освоение новых территорий под садоводческие товарищества и индивидуальную застройку, под объекты сельского хозяйства и промышленности; увеличение площадей городов, что приводит к формированию новых антропоургических очагов болезни, и как один из основных факторов — отсутствие эффективной специфической профилактики [3].

Среди всех случаев заболевания ГЛПС по стране на долю Приволжского Федерального округа за анализируемый период приходилось 86,4%, что характеризует этот регион как территорию с наибольшей эпидемической активностью природных очагов ГЛПС в стране.

Для снижения уровня заболеваемости ГЛПС на территории Российской Федерации необходимо усилить эпидемиологический надзор в природных очагах, в том числе, установить участки высокого риска заражения и контингенты риска, внедрить в практику пространственные и временные прогнозы обострения эпидемиологической обстановки. Также необходимо увеличить объемы полевой и поселковой дератизации на территориях с циркулирующей

вируса Добрава в осенне-зимний период в местах скопления полевой мыши (ометы, стога, животноводческие фермы, надворные постройки частного сектора). В связи с низкой эффективностью дератизационных работ, в лесных природных очагах, где установлена циркуляция вируса Пуумала, необходимо также увеличение объемов поселковой дератизации внутри и вокруг населенных пунктов, жилых и производственных объектов, где сохраняется высокий риск возникновения групповых заболеваний. В целях снижения заболеваемости ГЛПС на очаговых территориях рекомендуется использовать современные дератизационные технологии с обязательным предварительным рекогносцировочным зоологическим обследованием территории очага с целью выявления мест концентрации грызунов, определения их численности и распределения. Неспецифические профилактические мероприятия проводить не менее двух раз в год: весной и осенью, информационно-разъяснительную работу — постоянно. Для предупреждения заражения населения в эпидемических очагах основными мерами профилактики являются барьерная и сплошная дератизация, очаговая и камерная дезинфекция, а также санитарно-гигиенические и санитарно-технические мероприятия, повышающие чистоту городской территории и непроницаемость строений для грызунов. Постоянная информационно-разъяснительная работа среди населения обеспечивает правильное поведение людей в очагах, что также ведет к снижению заболеваемости [4].

В зеленых зонах населенных пунктов необходимо, в первую очередь, приведения лесных массивов в лесопарковое состояние. Здесь необходимо регулярно проводить очистку леса от бурелома и валежника, а также покосы растительности. Такие мероприятия ухудшают условия обитания рыжей полевки, и ее численность значительно снижается. При этом также необходимо внедрение в практику противоэпидемических работ в очагах ГЛПС вакцинопрофилактики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бернштейн А.Д., Апекина Н.С., Хворенков А.В., Копылова Л.Ф., Мясников Ю.А., Михайлова Т.В. Особенности проявления лесных очагов ГЛПС, расположенных в оптимуме ареала рыжей полевки. РЭТ-инфо. 2000, 3: 11-17.
2. Бернштейн А.Д., Гавриловская И.Н., Апекина Н.С. Особенности природной очаговости хантавирусных зоонозов. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010, 2: 5-13.
3. Кутырев В.В., Добло А.Д., Куклев Е.В. Эпидемиологическая ситуация по карантинным и другим опасным инфекционным болезням в Приволжском федеральном округе и совершенствование санитарной охраны территории. НМЖ. Здравоохранение ПФО. 2001, 1: 138-141.
4. Мочалкин П.А. Очаги геморрагической лихорадки с почечным синдромом города Уфы: опыт оздоровления. Дис. канд. мед. наук. Саратов, 2010.
5. Ткаченко Е.А., Бернштейн А.Д., Дзагурова Т.К., Морозов В.Г., Слонова Р.А., Иванов Л.И. Актуальные проблемы геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Микробиология. 2013, 1: 51-58.
6. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Бернштейн А.Д., Окулова Н.М., Коротина Н.А., Транквилевский Д.В. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в России — проблема XXI века. Вестник Российской Академии естественных наук. 2012, 1: 48-54.

Поступила 05.09.16

Контактная информация: Иванова Александра Васильевна,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452) 26-21-31

*К.А.Никифоров, Е.Г.Оглодин, Л.М.Куклева, Г.А.Ерошенко,
В.Г.Германчук, З.Л.Девдариани, В.В.Кутырев*

ПОДВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Цель. Разработка способа дифференциации штаммов *Y.pestis* разных подвидов на основе метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. *Материалы и методы.* Поиск ДНК мишеней для дифференциации подвидов возбудителя чумы проводили с помощью программ Mauve 2.3.1, Mega 5.0 и алгоритма BLAST на основе сравнения полногеномных последовательностей секвенированных штаммов *Y.pestis*. На найденные ДНК мишени рассчитывали праймеры и зонды в формате TaqMan, оптимизировали условия проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. *Результаты.* Найденны ДНК мишени, несущие мутации, маркерные для штаммов кавказского, алтайского, гиссарского, улегейского подвидов, штаммов из Таласского высокогорного очага чумы. Эффективность найденных ДНК мишеней и разработанного способа подвидовой дифференциации подтверждена на 101 штамме *Y.pestis* разных подвидов, выделенных в природных очагах России, ближнего и дальнего зарубежья. *Заключение.* Разработанный способ на основе метода ПЦР с регистрацией результатов в режиме реального времени обеспечивает проведение быстрой и эффективной дифференциации штаммов *Y.pestis* разных подвидов.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 22–27

Ключевые слова: возбудитель чумы, подвиды, эпидемическая значимость, дифференциация, ПЦР

*K.A.Nikiforov, E.G.Oglodin, L.M.Kukleva, G.A.Eroshenko,
V.G.Germanchuk, Z.L.Devdariani, V.V.Kutyrev*

SUBSPECIES DIFFERENTIATION OF *YERSINIA PESTIS* STRAINS BY PCR WITH HYBRIDIZATION-FLUORESCENT DETECTION

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

Aim. Develop a method of differentiation of *Y.pestis* strains of different subspecies based on PCR with hybridization-fluorescent detection in real-time. *Materials and methods.* DNA target search for differentiation of subspecies of plague causative agent was carried out by Mauve 2.3.1, Mega 5.0 and BLAST algorithm based on comparison of full-genome sequences of *Y.pestis* strains. Primers and TaqMan probes were calculated for the DNA targets found, conditions of PCR with hybridization-fluorescent detection — optimized. *Results.* DNA targets carrying marker mutations for the caucasus, altai, gissar, ulegei subspecies, strains from Talass alpine plague reservoir were detected. The effectiveness of the DNA targets found and the developed approach of subspecies differentiation is confirmed on 101 *Y.pestis* strains of different subspecies, isolated from natural foci of Russia, near and far abroad. *Conclusion.* The developed approach based on PCR with real-time detection allows for a rapid and effective differentiation of *Y.pestis* strains of various subspecies.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 22–27

Key words: plague causative agent, subspecies, epidemic significance, differentiation, PCR

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель чумы *Yersinia pestis* — этиологический агент особо опасной бактериальной инфекции, представляющей серьезную угрозу общественному здравоохранению. Согласно используемой в Российской Федерации и других странах СНГ классификации штаммы *Y.pestis* делится на пять подвидов — основной и четыре неосновных (кавказский, алтайский, гиссарский и улегейский) [2]. Помимо этих подвидов существуют обособленные группы штаммов с неустановленным систематическим положением, к которым относятся штаммы *Y.pestis* из Таласского высокогорного очага, имеющие ряд фенотипических и генетических особенностей [6].

Штаммы *Y.pestis* отличаются по вирулентности, эпидемической значимости и биохимической активности, циркулируют в разных ландшафтно-географических зонах. Штаммы основного подвида обладают высокой вирулентностью и эпидемической значимостью, а штаммы неосновных подвидов имеют избирательную вирулентность и низкую эпидемическую значимость. Установление принадлежности исследуемых штаммов *Y.pestis* к определенному подвиду делает возможным провести оценку их эпидемического потенциала, установить происхождение и вероятные пути заноса инфекции при проведении эпидемиологического расследования вспышек и случаев болезни.

При выполнении лабораторно-диагностических исследований подвидовую дифференциацию штаммов *Y.pestis* осуществляют на основе их различий в биохимической активности по отношению к сахарам и спиртам (ферментация сахаров и многоатомных спиртов, редукция нитратов) [3]. Однако надежность получаемых результатов находится в зависимости от условий культивирования штаммов и качества используемых сред, а для проведения анализа требуется выделение чистых культур возбудителя. Уровень развития современной микробиологии позволяет значительно ускорить эту длительную процедуру определения подвидовой принадлежности штаммов возбудителя чумы на основе методов молекулярно-генетического анализа, в том числе, простого и эффективного метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), применение которого позволяет получать стабильные и воспроизводимые результаты. Ранее нами разработан способ подвидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы, основанный на использовании метода ПЦР с электрофоретическим учетом результатов [4].

Целью исследования была разработка способа дифференциации штаммов *Y.pestis* разных подвидов на основе метода ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ). ПЦР-РВ требует меньше времени для проведения анализа по сравнению с ПЦР с электрофоретическим учетом результатов, а также снижает вероятность контаминации реакции ввиду отсутствия этапа электрофореза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск ДНК мишеней для подвидовой дифференциации штаммов *Y.pestis* осуществляли с помощью программ Mauve 2.3.1 и Mega 5.0 путем сравнения полногеномных последовательностей штаммов разных подвидов и групп, а также алгоритма BLAST с использованием полногеномных последовательностей штаммов *Y.pestis* из базы данных NCBI GenBank и штаммов, секвени-

рованных в РосНИПЧИ «Микроб». Последовательности зондов на найденные ДНК мишени рассчитывали таким образом, чтобы они были комплементарны участкам специфических для подвидов делеций и, следовательно, у штаммов, содержащих эти делеции, сигнал флуоресценции отсутствовал (табл. 1). Расчет праймеров проводили с помощью программы Vector NTI 10.

Для поиска специфичных ДНК мишеней были использованы полногеномные последовательности штаммов *Y.pestis* из базы данных NCBI GenBank: CO92, Nepal516, Antiqua, Pestoides F, Pestoides A, Pestoides B, 91001, а также полногеномные последовательности штаммов *Y.pestis* из коллекции РосНИПЧИ «Микроб»: 231 (708) (основной подвид), С-741 (кавказский подвид), И-2998 (алтайский подвид), А-1249 (гиссарский подвид), И-2422 (улегейский подвид), А-1815 (таласский штамм).

Анализ эффективности разработанного способа подвидовой дифференциации проводили на 101 штамме *Y. pestis* разных подвидов, выделенном в природных очагах России, в ближнем и дальнем зарубежье. Часть из использованных штаммов *Y.pestis* представлена в подписи к рисунку. Последовательности сконструированных праймеров и зондов в формате TaqMan приведены в табл. 1. В качестве флуоресцентных красителей использовали Cy5 (красный канал детекции флуоресценции), R6G (желтый канал), ROX (оранжевый канал), FAM (зеленый канал), а гасителей флуоресценции — RTQ1 и BHQ2. Условия проведения ПЦР-РВ были следующими: для мишени «45» — 1 цикл 95°C 10 мин; 40 циклов: 95°C 15 с, 57°C 40 с, 72°C 15 с; для мишени «89» — 1 цикл 95°C 15 мин; 10 циклов: 95°C 20 с, 56°C 20 с, 72°C 20 с; 30 циклов: 95°C 15 с, 57°C 45 с, 72°C 20 с; для мишени «Caucasic(-91)» — 1 цикл 95°C, 15 мин; 40 циклов: 95°C 15 с, 58°C 40 с; для мишени «Uleg(-88)» — 1 цикл 95°C 15 мин; 10 циклов: 95°C 20 с, 55°C 20 с, 72°C 20 с; 35 циклов: 95°C 20 с, 56°C 45 с, 72°C 20 с; для мишени «Alt(-90)» — 1 цикл 95°C 15 мин; 40 циклов: 95°C 15 с, 58°C 40 с; для мишени «His(-205)» — 1 цикл 95°C 15 мин; 40 циклов: 95°C 15 с,

Таблица 1. Последовательности сконструированных праймеров и зондов для проведения подвидовой дифференциации штаммов *Y.pestis*

Праймеры (S, As) и зонды (Zond)	Последовательности праймеров 5' - 3'
45-S	GTGGATGAGAAAGTTTACCC
45-As	ATCACACCTGGATGGTTAC
45-Zond	FAM-ACTCAGCAAGCATCTGCTCAACATG-RTQ1
89-S	ATGAAATGACCCGACAACAG
89-As	GCTTACACTGGTGGTATTAG
89-Zond	FAM-TTGTTTAGGCGGCAGTTTATCTGCC-RTQ1
Caucasic(-91)-S	CAAAGGGGTGCAAAGTGAC
Caucasic(-91)-As	GCAAGTTGTTTCAGGCCG
Caucasic(-91)-Zond	R6G-GCGGGTCAAGAAAGCTATCGCTGCG-RTQ1
His(-205)-S	CTGACGATCGGTTTCACTTC
His(-205)-As	GCTTCAATTTGCTGTTTGGT
His(-205)-Zond	ROX-TCGGACCAATTGATCAATGTCG-BHQ2
Alt(-90)-S	AATGCCAGTGAGATAACCC
Alt(-90)-As	ACCTTCCTGGCCGATGTA
Alt(-90)-Zond	R6G-GATGGCTTGACAGCAATTTCTGGC-RTQ1
Uleg(-88)-S	ATCAATTGTAGTGGAGGGG
Uleg(-88)-As	GCATCCATAGGTGCAGTA
Uleg(-88)-Zond	Cy5-TGAAGTTAGTGGGAGGATTGAGTTT-BHQ2
Tal(-72)-S	CGCAAGAGTTAGGGCTGGA
Tal(-72)-As	CCTAACAAGATCCCACGGC
Tal(72)-Zond	ROX-GGTGTATAGCGCCATCAATTTGGC-BHQ2

57°C 35 с и 72°C 15 с; для мишени «Tal(-72)» — 1 цикл 95°C 15 мин; 40 циклов 95°C 15 с, 59°C 35 с и 72°C 15 с. Амплификацию ДНК осуществляли для каждой ДНК мишени в отдельной реакции с использованием амплификатора Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). На этапе отжига праймеров проводили учет флуоресценции, уровень порога равнялся 0,05, специфичность реакции определялась значением Ct менее 31. Результат обеспечивался программным измерением зна-

Таблица 2. Анализ эффективности найденных ДНК мишеней и сконструированных на них праймеров и зондов для проведения подвидовой дифференциации штаммов *Y.pestis*

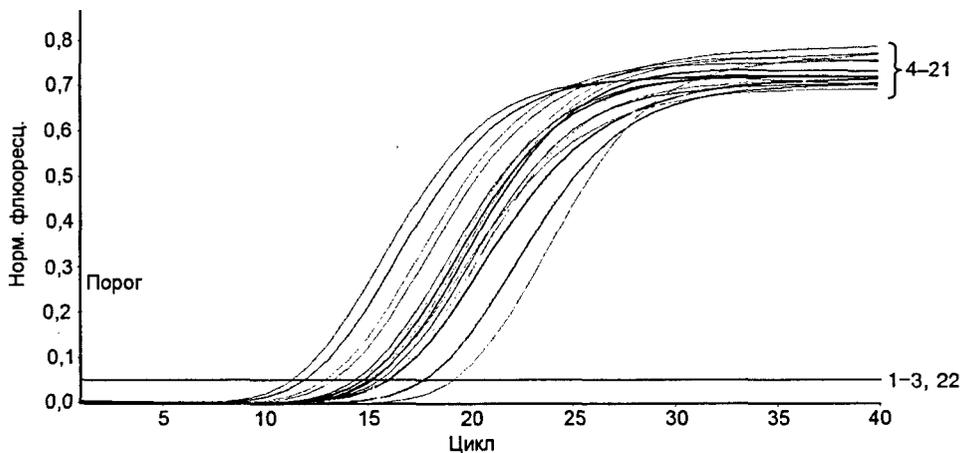
Штаммы, подвид (п/в)	Наличие сигнала флуоресценции по ДНК мишеням:						
	«45»	«89»	«Caucasic(-91)»	«Uleg(-88)»	«Alt(-90)»	«His(-205)»	«Tal(-72)»
Основной п/в — 42 штамма	—	—	+	+	+	+	+
Кавказский п/в — 15 штаммов	+	+	—	+	+	+	+
Алтайский п/в — 20 штаммов	+	+	+	+	—	+	+
Улегейский п/в — 7 штаммов	+	+	+	—	+	+	+
Гиссарский п/в — 10 штаммов	+	+	+	+	+	—	+
Таласские штаммы — 7 штаммов	+	+	+	+	+	+	—

чения St графика кривой флуоресценции, что отображалось в виде статуса реакции («реакция» и «нет реакции»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки быстрого и надежного способа определения подвидовой принадлежности исследуемых штаммов методом ПЦР-РВ нами проведен поиск ДНК мишеней, позволяющих проводить дифференциацию основного, кавказского, улегейского, алтайского, гиссарского подвидов, а также штаммов из Таласского высокогорного очага (табл. 2).

Для детекции штаммов высоковирулентного и эпидемически значимого основного подвида нами использованы переменные участки хромосомных локусов *ilvN* и *terC*, в которых у штаммов основного подвида ранее были обнаружены делеции размером в 45 и 89 п.н., отсутствующие у штаммов всех неосновных подвидов [1, 5]. На эти ДНК мишени (обозначенные как «45» и



Дифференциация штаммов *Y.pestis* основного и неосновных подвидов методом ПЦР-РВ с праймерами на мишень «45».

Штаммы *Y.pestis*: 1. 1116Д основной подвид, 2. Hamburg 15 основной подвид, 3. 231 (708) основной, 4. 6499 кавказский подвид, 5. 7896 кавказский подвид, 6. И-2422 улегейский подвид, 7. И-3071 улегейский подвид, 8. И-3130 улегейский подвид, 9. И-3131 улегейский подвид, 10. И-2998 алтайский подвид, 11. И-2359 алтайский подвид, 12. 2817 алтайский подвид, 13. 4857 алтайский п/одвид, 14. А-1728 гиссарский подвид, 15. А-1249 гиссарский подвид, 16. А-1633 гиссарский подвид, 17. А-1723 гиссарский подвид, 18. А-1816 таласская группа, 19. А-1805 таласская группа, 20. И-3085 группа *microtus*, 21. И-3086 группа *microtus*, 22. отрицательный контроль.

«89») нами рассчитаны праймеры и зонды для их использования в ПЦР-РВ (табл. 1). На рис. приведен пример разделения штаммов *Y.pestis* основного и неосновных подвидов методом ПЦР-РВ с использованием ДНК мишени «45».

В ПЦР-РВ с зондом в формате TaqMan, комплементарным области делеции и меченным красителем FAM, у штаммов основного подвида отсутствовали сигналы флуоресценции, которые проявлялись у штаммов других подвидов и групп. Эффективность рассчитанных праймеров и зондов на данные мишени проверена на 101 штамме, в том числе 42 штаммах основного подвида.

При сравнении полногеномной последовательности штамма *Y.pestis* C-741 кавказского подвида с последовательностями штаммов других подвидов нами выявлена мутация, специфическая для штаммов кавказского подвида — делеция размером 91 п.н. в гене AK38_2123 (обозначение гена по геному референтного штамма *Y.pestis* CO92, NCBI GenBank). На выявленную ДНК мишень, обозначенную как «Caucasic(-91)», рассчитаны праймеры и зонд и определены условия проведения реакции («Материалы и методы», табл. 1). В ПЦР-РВ с зондом, меченным красителем R6G, у всех использованных 15 штаммов кавказского подвида отсутствовал флуоресцентный сигнал, который проявлялся у штаммов других подвидов.

При анализе генома штамма *Y.pestis* И-2422 улегейского подвида обнаружена мутация, маркерная для штаммов этого подвида — делеция в 88 п.н. в гене AK38_1098. Эта ДНК мишень обозначена как «Uleg(-88)». В ПЦР-РВ с зондом на эту мишень, меченным красителем Cy5 (табл. 1), у всех исследованных штаммов улегейского подвида отсутствовал флуоресцентный сигнал, который регистрировался у других штаммов.

Мутация, маркерная для штаммов алтайского подвида — делеция в 90 п.н. в гене AK38_1327, выявлена нами при сравнении последовательности штамма алтайского подвида *Y.pestis* И-2998 с последовательностями штаммов других подвидов. В ПЦР с рассчитанными нами праймерами и зондом, меченным красителем R6G, на мишень Alt(-90) у всех 20 исследованных штаммов алтайского подвида отсутствовал сигнал флуоресценции, в отличие от штаммов других подвидов и групп.

При анализе нуклеотидной последовательности генома штамма *Y.pestis* А-1249 гиссарского подвида выявлена маркерная для штаммов гиссарского подвида делеция размером 205 п.н. в гене AK38_334. В связи с большим размером делеции, праймеры на эту ДНК мишень рассчитаны таким образом, чтобы они попадали в область делеции, тогда как праймеры на другие мишени были комплементарны участкам, фланкирующим делецию (табл. 1). В ПЦР-РВ с зондом на мишень His(-205), меченным красителем ROX, у всех исследованных нами 10 штаммов гиссарского подвида отсутствовал флуоресцентный сигнал, который проявлялся у штаммов других подвидов и групп.

В геноме штамма *Y.pestis* А-1815 удалось найти мутацию, специфическую для штаммов из Таласского высокогорного очага чумы в Киргизии, которая представляла собой делецию размером 72 п.н. в гене AK38_181. В ПЦР-РВ с праймерами и зондом на мишень Tal(-72), меченным красителем ROX, у штаммов таласской группы отсутствовал флуоресцентный сигнал, который проявлялся у штаммов других подвидов.

Таким образом, нами разработан способ подвидовой дифференциации штаммов *Y.pestis* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом

результатов в режиме реального времени. Ранее метод ПЦР-РВ не использовался для определения подвидовой принадлежности штаммов *Y.pestis*. При сравнении нуклеотидных последовательностей штаммов *Y.pestis* основного и неосновных подвидов нами выявлены мутации, специфичные для штаммов кавказского, алтайского, гиссарского, улегейского подвидов, штаммов из Таласского высокогорного очага чумы, использование которых в комплексе с двумя ранее найденными маркерными для штаммов основного подвида ДНК мишенями позволяет проводить быструю дифференциацию штаммов разных подвидов на основе метода ПЦР-РВ. Эффективность и специфичность сконструированных праймеров и зондов подтверждена на наборе из 101 штамма *Y.pestis* разных подвидов из природных очагов Российской Федерации, стран ближнего и дальнего зарубежья. Разработка такого способа подвидовой дифференциации имеет важное значение для практики, поскольку может обеспечить разделение штаммов *Y.pestis* разных подвидов, отличающихся по вирулентности и эпидемической значимости, а также позволит устанавливать принадлежность исследуемого штамма к конкретному подвиду. Последнее особенно важно при проведении эпидемиологического мониторинга в тех природных очагах чумы Российской Федерации и сопредельных государств, в которых одновременно циркулируют штаммы основного и неосновных подвидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Павлова А.И., Краснов Я.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis*. Журн. микробиол. 2012, 3:25-35.
2. Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Yersinia pestis*. Проблемы особо опасных инфекций. 1998, 1:11 — 12.
3. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. М., Шико, 2013.
4. Одинокоев Г.Н., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Краснов Я.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ подвидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы методом полимеразной цепной реакции. Патент РФ № 2552611. Бюл. № 16, 2015.
5. Одинокоев Г.Н., Павлова А.И., Анисимова Л.В., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов и возбудителя псевдотуберкулеза методом полимеразной цепной реакции. Патент РФ № 2425891. Бюл. №16, 2011.
6. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В.Кутырева. М., Медицина, 2004.

Поступила 26.09.16

Контактная информация: Ерошенко Галина Александровна,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)26-21-31

Г.В.Демидова, Е.П.Соколова, В.П.Зюзина, В.А.Рыкова,
И.В.Морозова, О.Н.Подладчикова, В.И.Тынянова

ВЛИЯНИЕ ВНЕХРОМОСОМНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ НА ТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *YERSINIA PESTIS*

Ростовский-на Дону противочумный институт

Цель. Выяснение роли внехромосомных элементов наследственности в проявлении токсических свойств *Yersinia pestis*. *Материалы и методы.* Работа выполнена на вакцинном штамме *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) и бесплазмидных вариантах вакцинного EV76 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) и вирулентного 231 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) штаммов *Y. pestis*. О присутствии функционально активной формы липополисахарида (ЛПС) в среде инкубации бактерий судили по токсичности супернатантов клеток *Y. pestis* для интактных животных (модель инфекционно-токсического шока) и мышей, сенсибилизированных D-GalN. *Результаты.* Установлено, что 37°C культуры *Y. pestis* EV76, содержащие полноценный набор плазмид, высвобождают ЛПС во внешнюю среду. Бесплазмидные варианты как вакцинного, так и вирулентного штаммов *Y. pestis* pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻ такой способностью не обладают. Отделение ЛПС от клеточной стенки выявлено у живых бактерий возбудителя чумы. Предполагается, что этот процесс сопряжен с транслокацией белков, кодируемых плазмидами pMT1, pCD1, pPCP1, из клетки во внешнюю среду. *Заключение.* Впервые установлена функциональная взаимосвязь между внехромосомными элементами наследственности и токсической активностью ЛПС *Y. pestis*.

Журн. микробиол. 2017, № 2, С. 28—33

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, плазмиды, липополисахарид, токсичность

G.V.Demidova, E.P.Sokolova, V.P.Zyuzina, V.A.Rykova,
I.V.Morozova, O.N.Podladchikova, V.I.Tynyanova

EFFECT OF EXTRACHROMOSOMAL ELEMENTS OF HEREDITY ON TOXIC PROPERTIES OF *YERSINIA PESTIS*

Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Russia

Aim. Elucidation of the role of extrachromosomal elements of heredity in manifestations of toxic properties of *Yersinia pestis*. *Materials and methods.* The study was carried out in vaccine strain *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) and non-plasmid variants of vaccine EV76 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) and virulent 231 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) strains of *Y. pestis*. Presence of functionally active form of lipopolysaccharide (LPS) in the incubation medium of the bacteria was evaluated via toxicity of supernatant of *Y. pestis* for intact animals (infection-toxic shock) and mice sensitized by D-GalN. *Results.* 37°C cultures of *Y. pestis* EV76 containing a full amount of plasmids were established to release LPS into the environment. Non-plasmid variants of both vaccine and virulent strains of *Y. pestis* pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻ do not have this ability. Separation of LPS from cell wall was detected in live bacteria of plague infectious agent. This process is assumed to be coupled with translocation of proteins coded by pMT1, pCD1, pPCP1 plasmids from the cell into the environment. *Conclusion.* Functional inter-connection between extrachromosomal elements of heredity and toxic activity of *Y. pestis* LPS is established for the first time.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 28—33

Key words: *Yersinia pestis*, plasmids, lipopolysaccharide, toxicity

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что патогенез чумы в любой ее форме представляет собой стадии развития инфекционно-токсического шока, вызванного действием липополисахарида (ЛПС) возбудителя [1, 3]. Биологически активный полимер ЛПС является компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Для проявления токсических свойств ЛПС необходимо его отделение от внешней мембраны бактерий и представление рецепторам иммунокомпетентных клеток макроорганизма в свободной молекулярной форме. В опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что целые клетки *Y. pestis* и препараты ЛПС, выделенные из этих культур, обладают различными иммуномодулирующими свойствами [12]. Максимальное воздействие на рецепторный комплекс TLR4/MD2 оказывает свободная форма ЛПС. В то же время, эффект действия ЛПС, связанного с бактериальной клеткой, незначителен. Объясняется это тем, что токсически активная часть ЛПС (липид А) жестко фиксирована физико-химическими связями с белками внешней мембраны бактерий, что исключает участие липида А в активации фагоцитарных клеток макроорганизма. Из данных литературы известно, что ЛПС в свободной форме в небольших количествах может высвобождаться в среду при делении клеток, при разрушении бактерий в процессе фагоцитоза, под действием комплекса белков системы комплемента и от антибиотиков, а также обнаруживается в составе бактериальных везикул [9].

Особенность *Y. pestis* состоит в том, что источником функционально активной формы ЛПС являются не разрушенные, а живые клетки бактерий. По наблюдению врачей-клиницистов действие эндотоксина максимально на терминальной стадии инфекции, когда стремительное размножение бактерий сопровождается гиперпродукцией цитокинов, что приводит к развитию септического шока и гибели организма [3, 13].

Вопрос о том, каким образом бактерии *Y. pestis* отделяют ЛПС от клеточной стенки во внешнюю среду, специально не исследовался. Мы предположили, что освобождению ЛПС способствует система белков, кодируемых резидентными плазмидами *Y. pestis*. В пользу высказанного предположения свидетельствуют данные о структурно-функциональной организации плазмид *pMT1*, *pCD1*, *pPCP1* и их роли в проявлении вирулентных свойств *Y. pestis* [1, 11]. При анализе работ, посвященных этим вопросам, мы обратили внимание на тот факт, что все белки, кодируемые плазмидами, локализованы, как правило, на внешней мембране клеточной стенки бактерий или же секретируются во внешнюю среду, то есть вектор транслокации белков направлен из клетки. Так, плазида *pCD1* кодирует белки системы секреции III типа (T3SS) и эффекторные белки *Yops* дистанционного действия. Плазида пестициногенности *pPCP1* уникальна для *Y. pestis*, содержит *pla* и *psn* гены. Бактериоцин пестицин секретируется во внешнюю среду, а протеаза *Pla* локализована на внешней мембране клеток возбудителя чумы. Плазида *pMT1* — кодирует два важных видоспецифических белка: фракцию I и «мышинный» токсин (MT). Фракция I формирует на поверхности микроба капсулу, которая не имеет жесткой связи с поверхностными структурами клетки, легко отделяется от них и диффундирует во внешнюю среду. Примечательно, что в состав капсульного вещества входят как MT, так и ЛПС клеточной стенки бактерий [7]. Изложенное выше позволило предположить, что процесс отделения молекул ЛПС от клеточной мембраны сопряжен с процессом транслокации кодируемых плазмидами *Y. pestis* белков из клетки во вне.

Цель настоящей работы заключалась в выяснении роли внехромосомных элементов наследственности в проявлении токсических свойств *Y. pestis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выяснения вопроса о функциональной взаимосвязи между экспрессией генов резидентных плазмид и активностью эндотоксина *Y. pestis* использованы два методических приема: модель инфекционно-токсического шока, описанная А.Н. Кравцовым и др. [5], и модель сенсibilизации биопробных животных D-галактозамином (D-Gal) [10]. Оба метода позволяют судить о присутствии функционально активной формы ЛПС в среде инкубации бактерий по ее токсичности для биопробных животных. Модель, предложенная Кравцовым А.Н., основана на трансформации ЛПС из биологически инертного в токсически активную форму в условиях *in vitro*. Процесс валиден терминальной стадии инфекции и осуществляется под влиянием биологически активного вещества, присутствующего в гемолизованных эритроцитах крови и тканях паренхиматозных органов млекопитающих. В условиях макроорганизма токсическое действие ЛПС реализуется через рецепторный комплекс TLR4/MD2 фагоцитарных клеток [6,8]. В случае с D-GalN механизм токсического действия ЛПС на макроорганизм иной — провоспалительный цитокин TNF- α , синтез которого индуцирует ЛПС, активирует специфические рецепторы апоптоза клеток печени (Fas R), что приводит к гибели гепатоцитов и организма в целом. Чувствительность метода инфекционно-токсического шока, определенная для ЛПС вакцинного штамма *Y. pestis* EV76, составляет приблизительно 40 мкг/мышь [7]. Чувствительность к ЛПС этого же штамма в условиях D-Gal равна 5 — 10 мкг/мышь [2]. Оба метода высокоэффективны для детекции свободной формы ЛПС *Y. pestis* в условиях *in vivo*.

Экспериментальная работа выполнена на вакцинном штамме *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1). Из него был получен бесплазмидный вариант (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻). Отсутствие интеграции плазмид с хромосомной ДНК подтверждено методом ПЦР с праймерами, комплементарными плазмидным генам *saI1* (плазмида pMT1), *lcrV* (плазмида pCD1) и *pla* (плазмида pPCP1). Штамм депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий под № КМ 1279, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов). Бесплазмидный вариант вирулентного штамма *Y. pestis* 231 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) предоставлен проф. А.П.Анисимовым (ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Выбор вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 для проведения настоящего исследования не случаен. Клетки этого штамма не способны преодолевать неспецифический иммунный барьер макроорганизма и не вызывают гибели животных при внутрибрюшинном введении дозы 1×10^8 м.к./мышь. В то же время, основной патогенетический фактор — эндотоксин — у этого штамма сохранен и его действие проявляется при внутривенном введении бактерий биопробным животным [14] или же в условиях, соответствующих инфекционно-токсическому шоку, описанных нами ранее [5].

При использовании модели инфекционно-токсического шока культуры вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 и бесплазмидные варианты вирулентного и вакцинного штаммов выращивали на плотной питательной среде LB (Difco, США) в течение 18 — 24 часов при 37°C. Для перевода ЛПС в токсически активную форму клетки исследуемых штаммов *Y. pestis* вносили в гемолизованные эритроциты крови человека в количестве 1 — 5×10^{10} м.к./мл и инкубировали 3 часа при 37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием (5 мин при 12000 об./мин), а супернатанты вводили мышам внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл. В супернатанте содержалось от 1×10^4 до 5×10^4 м.к./мл. О присутствии ЛПС в супернатантах судили по гибели животных в течение первых двух суток наблюдения. Каждая экспериментальная группа содержала 6 — 10 мышей.

Обработку мышей D-GalN проводили по методу Galanos C. et al. в нашей модификации [2]. Для этого культуры *Y. pestis* всех используемых вариантов выращивали на плотной питательной среде LB (Difco, США) в течение 18 — 24 часов при 37°C. Взвесь бактерий концентрацией 1×10^{10} м.к./мл готовили на физиологическом растворе NaCl и инкубировали 3 часа при 37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 12 000 об./мин. Полученный супернатант вводили мышам совместно с 20 мкг D-GalN внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл. В супернатанте содержалось от 1×10^4 до 5×10^4 м. к./мл. О присутствии ЛПС в инокулятах судили по гибели животных в течение первых двух суток. Каждая экспериментальная группа содержала 6 — 10 мышей.

В экспериментах также использовали культуры *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1), убитые кипячением при 100°C в течение 30 мин.

В качестве контроля экспериментальным животным вводили внутрибрюшинно и внутривенно по 0,1 мл миллиардной взвеси клеток полноценного штамма *Y. pestis* EV76 и бесплазмидных вариантов вакцинного и вирулентного штаммов, выращенных на плотной питательной среде LB (Difco, США) в течение 18 часов при 37°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о принципиальных различиях в токсических свойствах *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) и бесплазмидных вариантов *Y. pestis* EV76 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) и *Y. pestis* 231 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) (табл.). Как следует из данных, приведенных в табл., супернатант полноценного штамма *Y. pestis* EV76, полученный после инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека, токсичен для животных и вызывает гибель мышей в 100% случаев в течение первых двух суток наблюдения. В то же время, супернатанты бесплазмидных вариантов вакцинного *Y. pestis* EV76 и вирулентного штаммов *Y. pestis* 231 в этих же условиях постановки эксперимента не токсичны для животных. Аналогичные результаты были получены при использовании модели D-GalN. На фоне D-GalN среда инкубации клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 проявляет выраженный токсический эффект и вызывает гибель 100% животных. Бесплазмидные варианты вакцинного и вирулентного штаммов *Y. pestis* в

Токсичность *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1) и бесплазмидных вариантов *Y. pestis* EV76 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) и *Y. pestis* 231 (pMT1⁻, pCD1⁻, pPCP1⁻) для мышей при разных условиях постановки экспериментов

Условия постановки экспериментов	Число павших животных/число взятых в опыт животных			
	<i>Y. pestis</i> EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1)	<i>Y. pestis</i> EV76 (pMT1 ⁻ , pCD1 ⁻ , pPCP1 ⁻)	<i>Y. pestis</i> 231 (pMT1 ⁻ , pCD1 ⁻ , pPCP1 ⁻)	<i>Y. pestis</i> EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1)
	Живые клетки	Убитые клетки	Живые клетки	Живые клетки
1. Супернатанты клеток <i>Y. pestis</i> . Модель инфекционно-токсического шока	70/70	0/30	0/40	0/10
2. Супернатанты клеток <i>Y. pestis</i> . Модель D-GalN	36/36	0/30	0/30	0/12
3. Внутривенное введение клеток <i>Y. pestis</i>	10/10	—	0/10	0/10
4. Внутрибрюшинное введение клеток <i>Y. pestis</i>	0/12	—	0/12	0/12

равной мере не токсичны для биопробных животных. Обращает на себя внимание тот факт, что различия в токсическом действии полноценных и бесплазмидных вариантов *Y. pestis* имеют не количественный, а качественный характер.

Столь же резко отличается токсичность живых и убитых кипячением клеток полноценного вакцинного штамма *Y. pestis* EV76. В отличие от живых бактерий среда инкубации мертвых клеток не токсична для мышей и не вызывает их гибели.

Качественные различия между полноценными и бесплазмидными вариантами *Y. pestis* EV76 подтверждают также результаты опытов по внутривенному введению культур биопробным животным. Введение клеток полноценного вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 в хвостовую вену в количестве 1×10^8 м. кл. вызывает развитие типичного инфекционного процесса. Бесплазмидные варианты *Y. pestis* в тех же условиях не проявляют токсических свойств, и гибели животных не наблюдается.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о функциональной взаимосвязи между резидентными плазмидами и токсической активностью ЛПС *Y. pestis*. Впервые установлено, что клетки *Y. pestis* EV76, содержащие полноценный набор плазмид, способны высвобождать ЛПС во внешнюю среду, и этот процесс не связан с разрушением бактерий, а является функцией живых клеток возбудителя чумы. Варианты *Y. pestis*, лишенные внехромосомных элементов наследственности, такой способностью не обладают. Очевидно, что отделению ЛПС от клеточной стенки бактерий способствуют белки, кодируемые резидентными плазмидами *Y. pestis*. Видимо, этот процесс сопряжен с транслокацией кодируемых плазмидами рMT1, рCD1, рPCP1 белков на наружную поверхность клеток либо во внешнюю среду. Примером может служить недавно установленный факт ЛПС-белкового взаимодействия между высокотемпературной формой ЛПС и белком Pla плазмиды пестициногенности рPCP1. Комплекс локализован на внешней мембране клетки, а функциональная активность Pla проявляется только при его сочетании с молекулой ЛПС [3].

В реализации токсического потенциала ЛПС *Y. pestis*, на наш взгляд, основная роль принадлежит капсульной субстанции возбудителя чумы. Как известно, капсулу на поверхности микроба формирует фракция I (FI) — белок, кодируемый плазмидой рMT1. Продукция капсулы строго зависит от температуры и максимальна при 37°C. Несмотря на то, что FI давно известна, выделена, очищена, установлены гены, ответственные за синтез и сборку, ее роль в инфекционном процессе при чуме до сих пор не совсем понятна [4].

Ранее в экспериментах *in vitro* и *in vivo* мы установили, что капсульная субстанция бактерий *Y. pestis* является носителем функционально активной формы ЛПС [7]. Как было отмечено ранее, биологическое своеобразие капсульного вещества *Y. pestis* заключается в отсутствии жесткой связи с поверхностными структурами клетки, в результате чего капсула легко отделяется от них и диффундирует во внешнюю среду. Предполагаем, что при отделении капсулы от клеток все биомолекулы, находящиеся на поверхности внешней мембраны и не имеющие ковалентной связи с близлежащими полимерами, включая молекулы ЛПС, «стягиваются» вместе с капсулой в среду инкубации бактерий. Процесс осуществляется на терминальной стадии инфекции и является центральным моментом патогенеза чумы. Накопление ЛПС в составе

капсульной субстанции происходит пропорционально росту и размножению бактерий в организме млекопитающих. После отделения капсульного вещества от клеток под влиянием биологически активных веществ паренхиматозных органов — литические ферменты и биологически активный гликолипид — капсула разрушается, а малотоксичный высокотемпературный ЛПС трансформируется в токсически активную форму [8]. Дальнейшее действие эндотоксина *Y. pestis* канонично и осуществляется по схеме, типичной для ЛПС грамотрицательных бактерий. Переход ЛПС от связанного состояния к свободной форме — необходимый этап в реализации токсического потенциала ЛПС *Y. pestis*. Молекулярные механизмы этого процесса и степень участия в нем каждой из плазмид *Y. pestis* является предметом дальнейших специальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Мол. генетика, микробиол., вирусол. 2002, 3: 3-23.
2. Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П. и др. Токсичность липополисахаридов вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV 76 для белых мышей, сенсибилизированных D-галактозамином. Журн. микробиол. 2011, 1: 74-76.
3. Евсеева В.В., Платонов М.Е., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Активатор плазмидогена чумного микроба. Инфекция и иммунитет. 2015, 5 (1): 27-36.
4. Кадникова Л.А., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Капсульный антиген чумного микроба. Инфекция и иммунитет. 2015, 5 (3): 201-218.
5. Кравцов А.Н., Тынянова В.И., Зюзина В.П. Повышение вирулентности бактерий *Yersinia pestis* при инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека. Журн. микробиол. 1993, 4: 3-6.
6. Рыжко И.В., Мишанькин М.Б., Тынянова В.И., Цураева Р.И., Молдован И.А. Способ прогнозирования клинической эффективности антибактериальных, вакцинных препаратов, средств пассивной анитоксической иммунотерапии на модели инфекционно-токсической формы чумы у мышей. Патент № 2303821 от 27.07.2007.
7. Соколова Е.П. Механизмы активации токсических субстанций чумного микроба. Автореф. дис. канд. биол. наук. Ростов-на-Дону, 2002.
8. Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П. Специфичность иммуномодулирующего действия эндотоксина чумного микроба. Журн. микробиол. 2016, 3: 104-112.
9. Eddy J., Gielda L., Caulfield A. et al. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. PLoS One. 2014, 9 (9): e107002.
10. Galanos C., Freudenberg M. A., Reuter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1979, 76: 5939-5943.
11. Huang H.Z., Nicolich M., Linder L. Current trends in plague research: from genomics to virulence. Clin. Med. Res. 2006, 4 (3): 1189-1199.
12. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H. et al. Immunomodulatory properties of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. Clin. Vaccine Immunol. 2010, 17 (1): 49-55.
13. Montminy S., Khan N., McGrath S. et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. J. Nature Immun. 2006, 7 (10): 1066-1073.
14. Une T., Brubaker R. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in yersiniae. J. Immunol. 1984, 133: 2226-2230.

Поступила 05.10.16

Контактная информация: Демидова Галина Викторовна, к. б. н., 3440002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117, р.т. (863)240-27-03

Г.Е.Брилль¹, А.В.Егорова¹, И.О.Бугаева¹, Г.В.Пономарев²

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО КРАСНОГО ЛАЗЕРА НА РОСТ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ФОТОДИТАЗИНА

¹Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского,

²Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Цель. Исследовать влияние лазерного излучения красной области спектра на рост колоний метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного штаммов *Staphylococcus aureus*, а также изучить фотодинамический эффект фотосенсибилизатора фотодитазина. *Материалы и методы.* Определяли влияние света полупроводникового красного лазера (λ 660 нм, 100 мВт/см²) в дозах 30, 60, 90 и 180 Дж/см² на рост колоний *S. aureus*. Время облучения — 5, 10, 15 и 30 мин. В отдельных сериях экспериментов бактериальные клетки предварительно сенсибилизировали водным раствором фотодитазина в концентрации 5×10^{-6} М. *Результаты.* Установлено, что излучение красного лазера вызывало отчетливое подавление бактериального роста. Этот эффект на стандартном штамме *S. aureus* проявлялся только при использовании относительно высоких доз облучения (180 Дж/см²). Фоточувствительность метициллин-резистентного штамма оказалась значительно выше: бактериостатическое действие красного света отмечалось уже при дозе 60 Дж/см². Предварительная обработка бактериальных клеток фотодитазином заметно усиливала ростингибирующий эффект лазерного света.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 34—37

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, лазерное излучение, фотодитазин

G.E.Brill¹, A.V.Egorova¹, I.O.Bugaeva¹, G.V.Ponomarev²

EFFECT OF LOW-INTENSITY RED LASER ON GROWTH OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND SENSITIZING EFFECT OF PHOTODITAZIN

¹Razumovsky Saratov State Medical University, ²Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

Aim. Study the effect of laser emission in the red spectrum on growth of methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, as well as photodynamic effect of photosensitizer photoditazin. *Materials and methods.* Effect of light of semiconductor red laser (λ 660 nm, 100 mW/cm²) at 30, 60, 90 and 180 J/cm² on growth of *S. aureus* colonies was determined. Time of exposure — 5, 10, 15 and 30 minutes. In certain series of experiments bacterial cells were sensitized in advance by a water solution of photoditazin at a concentration of 5×10^{-6} M. *Results.* Red laser emission was established to cause a pronounced suppression of bacterial growth. This effect on standard *S. aureus* strain only took place during use of relatively high exposure doses (180 J/cm²). Photosensitivity of methicillin-resistant strain turned out to be significantly higher: bacteriostatic effect of red light was noted already at the dose of 60 J/cm². Treatment of bacterial cells with photoditazin in advance significantly enhanced growth-inhibiting effect of laser light.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 34—37

Key words: *Staphylococcus aureus*, laser emission, photoditazin

ВВЕДЕНИЕ

Золотистый стафилококк является возбудителем многих заболеваний человека и до последнего времени остается наиболее частой причиной возникновения внутрибольничных инфекций [2, 4]. Особому риску подвергаются пациенты с ослабленной иммунной системой при несоблюдении персоналом больницы надлежащих санитарных правил. Лечение стафилококковых инфекций вызывает серьезные трудности, вследствие нарастающей лекарственной устойчивости возбудителя и появления метициллин-резистентных штаммов (MRSA) [1, 3, 5]. Последнее диктует необходимость изыскания новых немедикаментозных методов лечения стафилококковых поражений. В этом плане внимание исследователей привлекают различные виды низкоинтенсивного лазерного излучения. Однако считается, что бактериальные клетки мало чувствительны к свету красной области спектра.

Целью настоящей работы явилось изучение прямого бактериостатического действия на *S. aureus* низкоинтенсивного красного лазера и фотодинамического эффекта фотосенсибилизатора фотодитазина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали клетки стандартного (метициллин-чувствительного, MSSA) и клинического (метициллин-резистентного, MRSA) штаммов *S. aureus* 209P, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского. Для культивирования бактерий использовали ГРМ-агар (ГНЦ ПМБ, Оболенск). Для облучения культур микроорганизмов использовали полупроводниковый лазер (EMRED Oy, Финляндия), генерирующий излучение красной области спектра (λ 660 нм) в непрерывном режиме. Плотность мощности составляла 100 мВт/см², время облучения — 5, 10, 15 и 30 мин. При этом суммарная энергетическая доза облучения составляла соответственно 30, 60, 90 и 180 Дж/см². Для сенсибилизации бактериальных клеток использовали водный раствор фотодитазина (N-диметилглюкаминная соль хлорина Е6) в концентрации 5×10^{-6} М (производитель ООО ВЕТА-ГРАНД, Москва). Фотосенсибилизатор был предоставлен проф. Г.В. Пономаревым (Москва). Пик поглощения молекулы фотодитазина совпадает с длиной волны используемого лазера. Для создания асептических условий полистирольный 96-луночный планшет для иммунологических исследований помещали в стерильный пластиковый корпус. Источник излучения располагали над ячейками планшета.

Бактериальную взвесь готовили в стерильном физиологическом растворе по международному оптическому стандарту мутности 5 ед. (ГИСК им. Л.А. Тарасевича); конечная концентрация составила 10^3 м.к./мл. Из разведения микроорганизмов 10^4 м.к./мл 0,1 мл взвеси вносили в 0,9 мл раствора фотосенсибилизатора и инкубировали в течение 30 мин без доступа света. Из конечного разведения, а также из раствора фотосенсибилизатора бактериальную взвесь в объеме 0,2 мл вносили в ячейки планшета. Облучение находящихся в ячейках бактериальных клеток проводили, последовательно увеличивая дозу. Из каждой ячейки высевали по 0,2 мл взвеси на чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределяли по поверхности стерильным шпателем. Контролем служили взвеси бактерий, не обработанные фотосенсибилизатором и не подвергнутые облучению. Посевы контрольных и облученных микроорганизмов инкубировали в течение 48 часов при 37°C. Оценку

роста бактерий проводили путем подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ). Все эксперименты проводили в пятикратных повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием U-теста Манна-Уитни. Достоверными считали различия средних при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее количество колоний при росте метициллин-чувствительного штамма в контроле (без воздействия) составило $373,6 \pm 46,2$. После лазерного облучения в суммарной дозе 30, 60 и 90 Дж/см² количество колоний слегка уменьшалось, но эти изменения были статистически не достоверны ($p > 0,1$). Однако фотовоздействие в дозе 180 Дж/см² вызывало уменьшение числа колоний до $238,8 \pm 21,8$, т.е. на 36% ($p < 0,02$).

Иные закономерности были обнаружены при использовании метициллин-резистентного штамма золотистого стафилококка. Среднее количество колоний этого штамма в контроле составило $320,6 \pm 69,9$, что достоверно не отличалось от роста стандартного штамма ($p > 0,5$). После облучения лазером в суммарной дозе 30 Дж/см² прослеживалась тенденция к угнетению клеточного роста ($p > 0,05$). Увеличение дозы фотовоздействия приводило к отчетливому подавлению бактериального роста. Так, при использовании дозы 60 Дж/см² число колоний уменьшилось до $143,2 \pm 19,6$ (на 55%, $p < 0,05$), при 90 Дж/см² — до $126,4 \pm 16,8$ (на 61%, $p < 0,05$), при 180 Дж/см² — до $107,2 \pm 14,8$ ($p < 0,02$). То есть при максимальной дозе облучения, использованной в наших опытах, угнетение роста бактерий достигало 67%.

Следовательно, низкоинтенсивное лазерное излучение красной области спектра оказывает ингибирующее влияние на рост колоний *S. aureus*, причем этот эффект на стандартном штамме проявляется только при использовании относительно высоких доз облучения (180 Дж/см²). Фоточувствительность метициллин-резистентного штамма оказалась значительно выше: бактериостатическое действие красного света отмечалось уже при дозе 60 Дж/см².

Далее мы определили, не влияет ли на рост стафилококков предварительная инкубация бактериальных клеток с фотосенсибилизатором фотодитазином. Как оказалось, этот препарат не оказывает существенного влияния на рост бактерий. Число колоний штамма MSSA при использовании фотодитазина в концентрации 5×10^{-6} М составляло $338,8 \pm 36,0$ ($p > 0,5$), штамма MRSA — $296,4 \pm 63,1$ ($p > 0,5$).

Следующим этапом нашей работы явилось изучение фотодинамического действия фотодитазина на *S. aureus*. С этой целью микробные клетки, предварительно обработанные фотосенсибилизатором, подвергались лазерному воздействию.

Опыты, проведенные со штаммом MSSA, подвергнутым действию фотодитазина, показали, что лазерное облучение уже в малой дозе (30 Дж/см²) снижает число колоний до $235,2 \pm 35,0$ ($p < 0,05$). Однако степень этого снижения достоверно не отличается от действия самого лазерного облучения ($p > 0,05$), т.е. отчетливого фотодинамического эффекта не наблюдается. Увеличение дозы фотовоздействия до 60 Дж/см² вызывает еще большее угнетение роста бактерий (до $128,0 \pm 17,7$ колоний, $p < 0,01$). В этом проявляется явное фотодинамическое действие, поскольку степень ингибиции роста бактерий достоверно превышает лазерный эффект ($p < 0,01$). В дальнейшем по мере увеличения дозы облучения наблюдается прогрессирующее угнетение роста колоний: при облучении в дозах 90 и 180 Дж/см² количество колоний

уменьшается до $102,8 \pm 15,5$ ($p < 0,001$) и $69,6 \pm 13,8$ ($p < 0,001$) соответственно, что также заметно превышает степень торможения бактериального роста при воздействии только лазера ($p < 0,01$ и $p < 0,001$) и свидетельствует о фотодинамическом эффекте фотодитазина.

В опытах со штаммом MRSA предварительная обработка фотодитазином с последующим лазерным облучением в дозах 30 и 60 Дж/см² достоверно не влияли на число колоний. Так, при использовании дозы облучения 30 Дж/см² число колоний составило $248,2 \pm 52,5$ ($p > 0,2$), при 60 Дж/см² — $151,8 \pm 34,0$ ($p > 0,05$). При дальнейшем увеличении дозы облучения регистрировалось отчетливое угнетение клеточного роста: число колоний при дозе облучения 90 Дж/см² уменьшалось до $66,4 \pm 16,2$ ($p < 0,01$), при 180 Дж/см² — до $34,4 \pm 12,8$ ($p < 0,01$). Причем при действии двух последних доз лазерного облучения выявлялся отчетливый фотодинамический эффект: степень угнетения роста бактериальных колоний была значительно выше после предварительного действия фотодитазина, чем при действии только лазера ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно).

Таким образом, лазерное излучение красного диапазона спектра оказывает непосредственное бактериостатическое действие на рост метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного штаммов *S. aureus*, причем этот эффект более выражен на резистентном штамме. Предварительная сенсibilизация бактериальных клеток фотодитазином заметно усиливает ростиингибирующий эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. Braga E.D., Aguiar-Alves F., de Freitas M.F. et al. High prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* colonization among healthy children attending public daycare centers in informal settlements in a large urban center in Brazil. *BMC Infect. Dis.* 2014, 6 (14): 538.
2. Carrel M., Schweizer M.L., Sarrazin M.V. et al. Residential proximity to large numbers of swine in feeding operations is associated with increased risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at time of hospital admission in rural Iowa veterans. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2014, 35 (2): 190-193.
3. Dissemond J., Goos M., Esser S. Pathogenetic significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in chronic wounds. *Vasa.* 2003, 32 (3): 131-138.
4. McKinnell J.A., Miller L.G., Eells S.J. et al. A systematic literature review and meta-analysis of factors associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at time of hospital or intensive care unit admission. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2013, 34 (10): 1077-1086.
5. Miller R.M., Price J.R., Batty E.M. et al. Healthcare-associated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: role of a cryptic variant of an epidemic clone. *J. Hosp. Infect.* 2014, 86 (2): 83-89.

Поступила 10.10.16

Контактная информация: Егорова Анна Валериевна, к.м.н.,
410012, Саратов, ул. Б.Казачья, 112, р.т. (8917)210-69-80

М.П.Костинов, И.В.Лукачев, А.К.Мещерякова, Е.В.Дмитриева,
Н.К.Ахматова, Е.А.Хромова, О.О.Магаршак, А.А.Сависко*

ИНДУКЦИЯ ЭФФЕКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ ТОПИЧЕСКОЙ ФОРМОЙ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА- $\alpha 2b$ ПРИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЯХ У БЕРЕМЕННЫХ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, *Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Изучить иммунологический фенотип лимфоцитов в процессе лечения топической формой рекомбинантного интерферона- $\alpha 2b$ при респираторных инфекциях у беременных. *Материалы и методы.* В исследовании приняли участие 74 беременных от 14 недель гестации, из них 55 женщин — в первые сутки с симптомами острой респираторной инфекции (ОРИ) легкой и средней тяжести течения, не нуждающиеся в госпитализации. I группа — 34 беременные с ОРИ, получавшие базисную терапию в сочетании с человеческим рекомбинантным интерфероном- $\alpha 2b$ в форме геля. II группа — 21 беременная с ОРИ, получавшие только базисную терапию. Контрольную группу составили 19 беременных без признаков ОРИ. Методом проточной цитофлуориметрии исследовали относительное содержание основных субпопуляций лимфоцитов: CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3–CD19+, CD3–CD16+56+, CD3–CD8+, рассчитывали иммунорегуляторный индекс в крови в первые сутки от начала заболевания и спустя 8 — 10 дней. *Результаты.* У беременных с острыми респираторными инфекциями легкого и среднетяжелого течения выявлен дисбаланс субпопуляций лимфоцитов, характеризующийся повышением содержания CD3–CD16+56+ и CD3+CD8+, а также снижением содержания CD3+ и CD3+CD8+. Включение в комплекс базисной терапии беременных топической формы рекомбинантного интерферона- $\alpha 2b$ в первые дни развития заболевания оказывает системное влияние на клеточное звено иммунитета и приводит к восстановлению субпопуляционного состава лимфоцитов крови, характерного для физиологического течения беременности. *Заключение.* Назначение топической формы рекомбинантного интерферона у беременных с легкой и средней тяжестью ОРИ может сопровождаться активацией факторов врожденного и адаптивного иммунитета.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 38—45

Ключевые слова: острые респираторные инфекции, беременные, клеточный иммунитет, иммуномодуляторы

M.P.Kostinov, I.V.Lukachev, A.K.Mescheryakova, E.V.Dmitrieva,
N.K.Akhmatova, E.A.Khromova, O.O.Magarshak, A.A.Savisko*

INDUCTION OF EFFECTORS OF INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY IN THE PROCESS OF THERAPY OF TOPIC FORM OF RECOMBINANT INTERFERON- $\alpha 2b$ DURING RESPIRATORY INFECTIONS IN PREGNANT

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, *Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. Study immunologic phenotype of lymphocytes in the process of therapy of topic form of recombinant interferon- $\alpha 2b$ during respiratory infections in pregnant. *Materials and methods.* 74 pregnant women from 14 weeks of gestation took part in the study, among them 55 — within 24 hours with symptoms of acute respiratory infection (ARI) of light and medium, severe course of infection, who do not need hospitalization. Group I — 34 pregnant

women with ARI receiving basic therapy with human recombinant interferon- α 2b in gel form. Group II — 21 pregnant with ARI receiving only basic therapy. Control group had 19 pregnant women without signs of ARI. Relative content of principle lymphocyte subpopulations was studied by flow cytometry: CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD19+, CD3-CD16+56+, CD3-CD8+; immune regulatory index was calculated in blood within 24 hours from the onset of the disease and 8 — 10 days later. *Results.* A disbalance of lymphocyte subpopulations was noted in pregnant women with light or medium severity course of acute respiratory infections, that was characterized by an increased content of CD3-CD16+56+ and CD3+CD8+, as well as a reduced content of CD3+ and CD3+CD8+. Inclusion of a topical form of recombinant interferon- α 2b during the first days of development of the disease has a systemic effect on cell immunity and results in normalization of subpopulation composition of blood lymphocytes that is characteristic for physiological course of pregnancy. *Conclusion.* Administration of topic form of recombinant interferon in pregnant with light or medium severity of ARI can be accompanied by activation of factors of innate and adaptive immunity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 38—45

Key words: acute respiratory infections, pregnant, cell immunity, immune modulators

ВВЕДЕНИЕ

Интерфероны (ИФН) представляют собой семейство цитокиновых медиаторов, играющих важную роль в формировании иммунитета и обладающих выраженным противовирусным, противомикробным, радиопротективным и иммуномодулирующим действием [1]. Проведены обширные клинические испытания интерферонов, доказывающие их преимущество в использовании при острых респираторных вирусных инфекциях, герпесе, гепатитах В и С [2, 4, 7].

В настоящее время для профилактики и лечения острой респираторно-вирусной инфекции предпочтение отдается неинъекционным формам рекомбинантных интерферонов [5]. Установлено, что сочетание рекомбинантного интерферона с одним из антиоксидантных препаратов усиливает противовирусное действие ИФН [2]. Нежелательные явления в виде повышения температуры, лихорадки, гриппоподобных симптомов, возникающих при парентеральном введении препаратов ИФН, практически отсутствуют [7]. Кроме того, при применении таких комбинированных препаратов в течение 2 лет не образуются антитела, нейтрализующие антивирусную активность рекомбинантного ИФН-альфа [1, 7].

Для борьбы с инфекцией в области ее проникновения в организм разработаны наружные лекарственные формы рекомбинантного интерферона: мазь и гель. В отличие от других путей введения интерферона, интраназальное применение препарата обеспечивает наибольшую эффективность при наименьшем числе неблагоприятных реакций [15].

В качестве средства профилактики ОРИ интерфероны относятся к мерам экстренного назначения, то есть могут быть использованы сразу же после контакта больного с респираторно-вирусной инфекцией или при первых симптомах заболевания. Даже в случае, если появились первые симптомы, интраназальное применение ИФН позволяет избежать манифестации заболевания более чем в 80% случаев [14]. Лекарственные формы рекомбинантного интерферона- α 2b в виде мази и геля при интраназальном введении обладают большей эффективностью, чем человеческого [15].

Зарубежные исследователи при интраназальном применении предпочитают использование высоких доз интерферона (2 500 000 — 10 000 000 МЕ/сут.), что повышает токсичность терапии и способствует возникновению побочных явлений (кровянистые выделения из носа) [16]. Отечественные интраназальные препараты ИФН основаны, преимущественно, на взаимодействии с антиоксидантами, что позволяет значительно снизить курсовые дозы [Алпенидзе Д.Н. и др., 2010].

В акушерско-гинекологической практике препараты интерферона применяются давно, и доказана их безопасность и эффективность как для беременной, так и для плода. В 2009 — 2010 гг. в период пандемии вируса гриппа А/Н1N1 рекомбинантные интерфероны в форме суппозиторий вошли в стандарты лечения беременных с респираторными инфекциями и гриппом. В последующем была разработана лекарственная форма рекомбинантного интерферона- $\alpha 2b$ в виде геля, которая может быть назначена по показаниям у беременных с 14 недель гестации. Так как препарат предназначен для интраназального применения, по протоколу исследования изучалось его влияние на параметры мукозального иммунитета, и была дана характеристика клинической безопасности и эффективности. Оценка влияния топической формы рекомбинантного интерферона- $\alpha 2b$ на иммунологический фенотип лимфоцитов не только у беременных, но и у других групп населения не проводилась. Это представляет интерес для выявления взаимосвязи между регуляторными системами иммунитета при назначении топической формы иммуномодулятора и полученным клиническим эффектом.

Лечение беременных с респираторными инфекциями обосновано тем, что присоединение бактериальной или вирусной инфекции к физиологической беременности ведет к значительному дисбалансу в иммунной системе женщины, что находит отражение не только на течении периода гестации, но и на развитии ребенка в постнатальном периоде. Поэтому поиск методов профилактики и лечения респираторных инфекций у беременных является одним из приоритетных. С другой стороны, изучение состояния иммунной системы беременной и плода является важнейшей проблемой современного акушерства.

Цель исследования — изучить иммунологический фенотип лимфоцитов в процессе лечения топической формой рекомбинантного интерферона- $\alpha 2b$ при респираторных инфекциях у беременных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в 2009 — 2013 гг. в НИИВС им. И.И.Мечникова и в отделении женской консультации городской клинической больницы г. Жуковский Московской области. Работа выполнена в соответствии с протоколом исследования, рассмотренном и утвержденном Локальным этическим комитетом НИИВС им. И.И.Мечникова. Все пациенты подписывали информированное согласие для участия в клиническом исследовании.

В исследовании приняли участие 74 беременных от 14 недель гестации, из них 55 женщин — в первые сутки с симптомами острой респираторной инфекции легкой и средней тяжести течения, не нуждающиеся в госпитализации. Наблюдение за беременными проводилось совместно с врачом акушером-гинекологом в соответствии с требованиями Приказа Минздравсоцразвития РФ от 02.10.2009 № 808н «Об утверждении порядка оказания акушерско-гинекологической помощи». После консультации акушера-гинеколога и отоларинголога и подписанного информированного согласия для участия в ис-

следования они были распределены: I группа — 34 беременные с ОРИ, получавшие базисную терапию в сочетании с человеческим рекомбинантным интерферон- $\alpha 2b$ в форме геля, разрешенным к применению у беременных от 14 недель гестации. Препарат назначали интраназально объемом 1 мл 3 раза в сутки в течение 7 дней. II группа — 21 беременная с ОРИ, получавшие только базисную терапию: назальные деконгестанты, 0,9% раствор хлорида натрия интраназально, мирамистин для обработки носа и/или глотки. При выявлении бактериальных осложнений ЛОР-органов назначали антибактериальные препараты местно (фузафунгин) или внутрь (амоксциллин) согласно общепринятым схемам сроком до 7 дней. Контрольную группу составили 19 беременных без признаков ОРИ.

При первичном обращении у всех беременных исследовали относительное содержание основных субпопуляций лимфоцитов: Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD3+CD4+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), В-лимфоцитов (CD3–CD19+), натуральных киллеров (CD3–CD16+56+) и НК-клеток с высокой цитотоксичностью (CD3–CD8+). Рассчитывали иммунорегуляторный индекс (ИРИ) — соотношение Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Фенотипическую характеристику лимфоцитов периферической крови оценивали методом проточной цитофлуометрии на проточном цитометре Beckman Coulter FC-500 с использованием FITC- и PE-меченных МКат (Beckman Coulter) согласно инструкции производителя. Кровь для исследования брали в день обращения в первые сутки от начала заболевания и спустя 8 — 10 дней.

Статистическая обработка полученных данных проводилась методами вариационной статистики с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Excel, версия 7, Statistica for Windows, версия 7, Biostat. При подтверждении нормальности распределения признаков были использованы параметрические критерии и численные данные представлены как $M \pm m$. При отсутствии нормального распределения для описания результатов были рассчитаны медиана и интерквартильный размах (25 и 75 перцентилей). Для сравнения значений показателей в двух группах были использованы методы параметрической и непараметрической статистики: критерий Стьюдента для нормального распределения показателей и критерий Манна-Уитни для оценки статистической значимости различий показателей выборок, не подчиняющихся закону нормального распределения. Для сравнения динамических показателей в группе использовали критерий Вилкоксона. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$. При корреляционном анализе связь между показателями оценивали как сильную при абсолютном значении коэффициента корреляции Спирмена $r > 0,70$, имеющую среднюю силу при r от 0,69 до 0,30, и как слабую при $r < 0,29$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных результатов исследования исходных значений содержания основных субпопуляций лимфоцитов у женщин с физиологическим течением беременности показал: тенденцию к увеличению содержания CD3+, уменьшению содержания CD3–CD19+ и CD3–CD16+56+ по сравнению с нормальными показателями у здоровых взрослых (табл. 1). Значения CD3+CD4+, CD3+CD8+, ИРИ, НК CD3–CD8+ у беременных без ОРИ не отличались от нормальных значений, характерных для здоровых взрослых.

Выявленные изменения относительного количества Т-лимфоцитов и их разновидностей, В-лимфоцитов у беременных без ОРИ отмечены и другими исследователями, при этом одни указывают на увеличение, другие — на уменьшение, некоторые выявляли только тенденцию роста субпопуляций лимфоцитов или не обнаруживали значимых изменений Т-клеток в период беременности [6, 11, 12].

При сопоставлении групп беременных с физиологическим течением беременности без ОРИ и с симптомами респираторной инфекции у последних выявлены изменения в сторону уменьшения относительного количества отдельных субпопуляций лимфоцитов (содержание CD3+ и CD3+CD8+) и увеличения концентрации CD3-CD16+56+ и CD3-CD8+ (табл. 1). Значения CD3+CD4+, ИРИ и CD3-CD19+ у беременных с проявлениями респираторного заболевания и без него были сопоставимы. Обнаруженные изменения численности Т-цитотоксических лимфоцитов у беременных во II и III триместрах с симптомами ОРИ может указывать на процесс активации иммунокомпетентных клеток под воздействием вирусной или бактериальной инфекции. В норме такие изменения количества Т-лимфоцитов с превалированием субпопуляции цитотоксических лимфоцитов, выявляющиеся в I триместре беременности, являются адаптивными в репродуктивной системе и не имеют существенного значения в процессах иммуномодуляции [12].

В результате фенотипирования лимфоцитов в цельной крови у беременных в динамике заболевания ОРИ отмечено изменение соотношения некоторых показателей в зависимости от проводимой терапии (табл. 2). Так, в I группе, получавшей в комплексе препарат интерферона- $\alpha 2b$, к 8 — 10 дню лечения наблюдали повышение содержания CD3+ и CD3+CD4+ лимфоцитов по сравнению с исходными значениями. Во II группе беременных, использовавших при лечении ОРИ только базисную терапию, указанные показатели в

Таблица 1. Субпопуляционный состав лимфоцитов у беременных при первичном обращении

Показатели	Значения субпопуляций лимфоцитов крови		
	Норма здоровых взрослых	У беременных без ОРИ (n=12)	У беременных с ОРИ (n=55)
CD3+ (%)	60—76	80,84±1,07	73,36±0,99*
CD3+CD4+ (%)	38—46	43,81±1,24	42,94±1,04
CD3+CD8+ (%)	31—40	33,07±0,87	27,76±0,94*
ИРИ	1,2—2,0	1,34±0,05	1,71±0,08
CD3-CD19+ (%)	11—16	9,44±0,9	9,61±0,47
NK CD3-CD16+56+ (%)	10—19	8,43±0,83	13,5±0,66*
NK CD3-CD8+ (%)	1,5—6	2,98±0,33	5,85±0,38**

Примечание. * p<0,001, ** p<0,01 — по сравнению с группой беременных без ОРИ.

Таблица 2. Субпопуляционный состав лимфоцитов в динамике лечения у беременных с ОРИ

Показатели	Значения субпопуляций лимфоцитов крови			
	Исходно I+II группы (n=55)	I группа после лечения (n=34)	II группа после лечения (n=21)	
CD3+ (%)	M±S.E.	73,36±0,99	77,85±1,5	75,83±1,47
	median	73,6	77,9	76,6
	LQ-UQ	68,5—80,5	73,7—82,1*	69,1—80,2
CD3+CD4+ (%)	M±S.E.	42,94±1,04	45,9±0,8	44,57±1,49
	median	42,9	45,9	43,9
	LQ-UQ	39,8—48,2	43,9—48,5*	41,6—48,8
CD3+CD8+ (%)	M±S.E.	27,76±0,94	30,05±1,02	29,16±1,52
	median	27,8	30,4	26,9
	LQ-UQ	22,6—31,7	26—33,6	23,5—34,4
ИРИ	M±S.E.	1,71±0,08	1,62±0,08	1,69±0,12
	median	1,6	1,6	1,9
	LQ-UQ	1,3—2	1,3—1,8	1,2—2,1
CD3-CD19+ (%)	M±S.E.	9,61±0,47	10,02±0,5	11,49±0,7
	median	9,3	9,5	11
	LQ-UQ	6,8—12,3	8—11,9	9—14
NK CD3-CD16+56+ (%)	M±S.E.	13,5±0,66	11,33±0,55	12,35±0,92
	median	13	11,3	12,7
	LQ-UQ	11—16,5	8,8—12,6	9,6—14,3
NK CD3-CD8+ (%)	M±S.E.	5,85±0,38	4,5±0,28	4,2±0,4
	median	5,6	4,3	4,2
	LQ-UQ	3,9—7,7	3,3—5,6	2,7—5,8

Примечание. * По сравнению с исходными данными, p<0,01.

процессе наблюдения не изменились. Значения других исследуемых субпопуляций лимфоцитов были сопоставимы как между группами, так и с исходными данными.

Таким образом, при физиологическом течении беременности были выявлены следующие особенности субпопуляционного состава лимфоцитов: более высокое содержание Т-лимфоцитов — $80,84 \pm 1,07\%$ и натуральных киллеров — $8,43 \pm 0,83\%$ при сниженном В-лимфоцитов — $9,44 \pm 0,9\%$, что характерно для иммунных механизмов в развитии и сохранении беременности. При сравнении значений отдельных субпопуляций у беременных с симптомами ОРВИ и без них выявлено снижение содержания CD3+ и CD3+CD8+ у беременных без ОРВИ ($73,36 \pm 0,99\%$ и $80,84 \pm 1,07\%$; $27,76 \pm 0,94\%$ и $33,07 \pm 0,87\%$ соответственно). У беременных с признаками ОРВИ содержание натуральных киллеров CD3–CD16+56+ и CD3–CD8+ повышалось ($13,5 \pm 0,66\%$ и $5,85 \pm 0,38\%$ соответственно) по сравнению с женщинами с физиологическим течением беременности ($8,43 \pm 0,83\%$ и $2,98 \pm 0,33\%$ соответственно). Из данных литературы известно, что хронические эндотелиотропные вирусные инфекции во II и III триместрах приводят к снижению абсолютных показателей CD3+CD4+ и уровня секретируемых Th-2 цитокинов (IL-4, IL-10), повышению численности клеток с цитотоксическим потенциалом (CD8+, CD16+, 56+) и секретируемых этими клетками цитокинов (IL-2, IL-6, TNF- α). Избыточное количество провоспалительных цитокинов вызывает развитие эндотелиопатии и активацию системы комплимента, что является триггерным фактором в патогенезе синтеза антифосфолипидных АТ и молекул адгезии с последующим развитием тромбофилии и плацентарной недостаточности [12]. Поскольку в наших исследованиях развитие ОРВИ у беременных были вызваны не персистирующими эндотелиотропными вирусами, а респираторными вирусами (27,8%) и другими микробными патогенами, то можно предположить, что изменения в субпопуляции лимфоцитов являлись транзиторными и не сопровождалась развитием патологии беременности [8].

В литературе описана супрессия клеточного механизма иммунного ответа у беременных с острым риносинуситом при отсутствии активации гуморального звена, что клинически может проявляться затяжным течением заболевания, увеличивая риск развития рецидивов и осложнений гестации [3]. Наше клиническое наблюдение за беременными показало, что в группе пациенток, получавших только базисную терапию, частота бактериальных осложнений (гнойные синуситы, трахеобронхиты) составила 38,1% против 11,8% случаев ($p < 0,05$) в группе, принимавших дополнительно рекомбинантный интерферон- $\alpha 2b$ в форме интраназального геля [9]. Кроме того, потребность в назначении антибиотиков на фоне комплексного лечения топической формой иммуномодулятора сократилась до 11,8% по сравнению с группой, получавшей только базисную терапию — 39% случаев ($p < 0,05$).

В проведенном исследовании у женщин в периоде гестации с ОРВИ, исходно имевших более низкое содержание Т-лимфоцитов — $73,36 \pm 0,99\%$ и Т-хелперов — $42,94 \pm 1,04$, отмечено их нарастание на фоне интерферонотерапии до $77,85 \pm 1,5$ и $45,9 \pm 0,8$ соответственно ($p < 0,01$), чего не выявлено у беременных, получавших только базисную терапию — $75,83 \pm 1,47$ и $44,57 \pm 1,49$ соответственно. Активизация функций субпопуляции Т-лимфоцитов на фоне местной интерферонотерапии у беременных с симптомами ОРВИ сопровождалась уменьшением воспалительного процесса и снижением в назальном смыве IL-8 с 1353 (781 — 1007) пг/мл до 623 (495 — 1024) пг/мл ($p < 0,05$) [10]. IL-8 является хемоаттрактантом для нейтрофилов, которые мигрируют в шей-

ку матки и вырабатывают мактриксную металлопротеиназу-8 (нейтрофильную коллагеназу) и нейтофильную эластазу — ферменты, участвующие в разрушении межклеточного матрикса [13, 17]. Провоспалительные цитокины активируют цитотоксические свойства НК-клеток и фагоцитарную активность макрофагов, которые находятся в повышенном количестве в децидуа и при восходящей инфекции могут оказывать прямое повреждающее действие на трофобласт и плаценту, провоцируя механизмы активации сократительной деятельности матки [13, 17].

В группе женщин, получавших в комплексе терапии препарат интерферона, в динамике более выражена тенденция к снижению НК-клеток, что наблюдается при физиологическом течении беременности.

Содержание В-лимфоцитов как у беременных с признаками ОРИ, так и без них во все периоды исследования было сопоставимо и ниже нормальных значений здоровых взрослых. Это характерно для беременности, поскольку в каждом из триместров достоверно снижалась численность В-лимфоцитов, но пропорция существенно смещалась в пользу Т-лимфоцитов в соотношении с нормой небеременных [12].

Следовательно, полученные данные свидетельствуют о том, что у беременных с острыми респираторными инфекциями легкого и среднетяжелого течения выявлен дисбаланс субпопуляций лимфоцитов, характеризующийся повышением содержания CD3—CD16+56+ и CD3+CD8+, а также снижением содержания CD3+ и CD3+CD8+. Включение в комплекс базисной терапии беременных топической формы рекомбинантного интерферона- $\alpha 2b$ в первые дни развития заболевания оказывает системное влияние на клеточное звено иммунитета и приводит к восстановлению субпопуляционного состава лимфоцитов крови, характерного для физиологического течения беременности, и уменьшает риск развития воспалительных явлений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деньгин В.В., Деленя Н.В. Виферон: применение при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Фарматека. 2005, 12: 53-57.
2. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М., ГЕОТАР-Медиа, 2005.
3. Ершов Ф. И., Григорян С. С., Орлова Т. Г. и др. Противовирусная терапия ОРВИ у детей. Детские инфекции. 2006, 3: 56-61.
4. Золин В.В. Липосомальный противовирусный препарат рекомбинантного альфа-2b интерферона человека: получение и свойства. Автореф. дис. канд. мед. наук. Кольцово, 2010.
5. Заплатников А.Л. Иммунопрофилактика и иммунотерапия острых респираторных инфекций у детей. Лечащий врач. 2006, 9: 50-56.
6. Казимирко Н.К. и др. Иммунология физиологической беременности. Молодой ученый. 2014, 3 (6): 132-137.
7. Малиновская В.В., Деленя Н.В., Ариненко Р.Ю., Мешкова Е.Н. Виферон. Комплексный противовирусный и иммуномодулирующий препарат для детей и взрослых. Руководство для врачей. М., ИНКО-ТНК, 2005.
8. Мещерякова А.К., Фошина Е.П., Тарбаева Д.А., Сависько А.А., Зайцева Е.В. Клиническое течение острой респираторной инфекции и состояние микробиоценоза верхних дыхательных путей у беременных. Журн. микробиол. 2012, 5: 12-16.
9. Мещерякова А.К., Костинов М.П., Кутько О.В., Малиновская В.В., Тарбаева, Д.А. Никонова А.А., Черданцев А.П. Клинический эффект применения различных лекарственных форм Виферона у беременных с острой респираторной инфекцией. Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии, 2010, 4: 46-49.

10. Мещерякова А.К., Костинов М.П., Магаршак О.О., Гусева Т.С., Паршина О.В. Влияние препарата рекомбинантного интерферона α -2b в форме геля на течение ОРВИ и состояние мукозального иммунитета у женщин в периоде гестации от 14 недель. Вестник оториноларингологии. 2014, 6: 50-53.
11. Севостьянова О.Ю., Теплова С.Н., Радзинский В.Е. Иммунный гомеостаз в динамике неосложненной беременности. Вестник РУДН, сер. Медицина. Акушерство и гинекология. 2005, 4 (32): 39-42.
12. Смирнова Т.Л., Портнова Е.В., Сергеева В.Е. Иммуниет и беременность. Вестник Чувашского университета. 2009, 2: 79-85.
13. Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. Невынашивание беременности. М., МИА, 2010.
14. Феликсова Л., Шебекова В., Целипанова Е. и др. Гриппферон у детей, больных ОРВИ. Врач. 2001, 1: 40-41.
15. Шумилов В.И., Шевцов В.А., Лобов С.П. Грипп и ОРВИ: неспецифическая профилактика с использованием генно-инженерного- α 2 интерферона и его новых форм. Лечащий врач. 2000, 9: 20-21.
16. Kneuber M.C., Moll H.A., de Groot R. Treatment and prevention of respiratory virus infection. Eur. J. Pediatr. 2000, 159 (6): 399-411.
17. Romero R., Chaiworapongsa T., Gotsch F. et al. The diagnosis and management of preterm labor with intact membranes. Clin. Maternal. Fetal. Med. Online. 2012, 29. <http://clinicalmaternalfetalmedicineonline.com/>.

Поступила 19.09.16

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*А.А.Ртищев, Р.Р.Минтаев, В.Ю.Кост, И.Б.Коптяева,
И.И.Акопова, К.В.Лисовская, С.Г.Маркушин*

ВКЛЮЧЕНИЕ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В КОНСЕРВАТИВНЫЕ УЧАСТКИ РА-ГЕНА ПРИВОДИТ К АТТЕНУАЦИИ ВИРУЛЕНТНОГО ШТАММА ВИРУСА ГРИППА А/WSN/33

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

Цель. Исследование возможности получения аттенуированных вариантов вируса гриппа с помощью включения специально подобранных сайт-специфических мутаций в консервативную последовательность РА-гена (концевую часть СООН-домена РА-гена) вирулентного штамма. *Материалы и методы.* В работе был использован вирулентный штамм вируса гриппа А/WSN/33. Включение сайт-специфических мутаций в РА-ген вирулентного штамма А/WSN/33 проводили с помощью двуступенчатой мутационной ПЦР. Клонирование осуществляли, используя GoldenGate реакцию. Использовали 8-плазмидную трансфекционную систему на основе вектора рНW2000. Трансформацию проводили на рубидиевых компетентных бактериальных клетках штамма DH5 α . Трансфекцию делали при помощи реагента Lipofectamine LTX (Invitrogen) в кокультуре клеток 293Т и MDCK. *Результаты.* Показано, что трансфектанты, содержащие замену F658A в СООН-домене РА-гена, приобрели ts-фенотип и резко снизили способность к размножению в легких мышей. Включение замены F658A в СООН-домен РА-гена в комбинации с включением в геном вирулентного штамма ts-мутаций из генов ХА штаммов вируса гриппа приводило к получению трансфектантов, обладающих фенотипическими характеристиками, типичными для кандидатов в живые гриппозные вакцины. *Заключение.* Показана возможность получения аттенуированных вариантов вируса гриппа путем включения специально подобранных сайт-специфических мутаций в консервативную последовательность РА-гена.

Ключевые слова: вирус гриппа, сайт-специфические мутации, трансфектанты, аттенуация, PA-ген

*A.A.Rtischev, R.R.Mintaev, V.Yu.Kost, I.B.Koptyaeva,
I.I.Akopova, K.V.Lisovskaya, S.G.Markushin*

INCLUSION OF SITE-SPECIFIC MUTATIONS INTO CONSERVATIVE SEGMENTS OF PA-GENE RESULTS IN ATTENUATION OF VIRULENT INFLUENZA VIRUS STRAIN A/WSN/33

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Study the possibility of obtaining attenuated variants of influenza virus by including specially selected site-specific mutations into a conservative sequence of PA-gene (terminal segment of COOH-domain of the PA-gene) of a virulent strain. *Materials and methods.* A/WSN/33 — a virulent strain of influenza virus was used in the study. Inclusion of site-specific mutations into PA-gene of the A/WSN/33 virulent strain was carried out using a two-step mutation PCR. Cloning was carried out using GoldenGate reaction. 8-plasmid transfection system based on pHW2000 vector was used. Transformation was carried out in rubidium competent bacterial cells of DH5 α strain. Transfection was done using Lipofectamine LTX (Invitrogen) reagent in a 293T and MDCK cells' co-culture. *Results.* Transfectants with F658A substitution in the COOH-domain of the PA-gene were shown to acquire ts-phenotype and sharply reduce the ability to reproduce in mice lungs. Introduction of F658A substitution into COOH-domain of the PA-gene in combination with introduction of ts-mutations from ca influenza virus strains into the genome of the virulent strain resulted in obtaining transfectants that have phenotypic characteristics typical for live influenza vaccine candidates. *Conclusion.* The ability to obtain attenuated variants of influenza viruses by introducing specially selected site-specific mutations into conservative sequence of the PA-gene is shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 45—53

Key words: influenza virus, site-specific mutations, transfectants, attenuation, PA-gene

ВВЕДЕНИЕ

Имеющийся к настоящему времени опыт применения холодоадаптированной (ХА) живой гриппозной вакцины в России и США показал, что этот препарат обладает наибольшей эффективностью при массовой вакцинации против гриппа, особенно детей [1, 2]. Использование генно-инженерных технологий может поднять на новый уровень разработку живых гриппозных вакцин как в медицине, так и в ветеринарии. В последнее время большой интерес среди исследователей вызывает генно-инженерный подход, предполагающий прямое включение аттенуирующих мутаций в геном вирулентного штамма вируса гриппа [3, 4, 6 — 13]. Данные литературы за последний период свидетельствуют о том, что подавляющее большинство исследователей при этом использует стандартный набор ts-мутаций из ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 (PB1-ген: K391E, E581G, A661T; PB2-ген: N265S; NP-ген: D34G). Вместе с тем, по данным литературы использование данного набора не позволяет полностью аттенуировать не только пандемический штамм, но даже и некоторые вирулентные сезонные варианты вируса гриппа [13]. С целью решения данной проблемы в представленной работе предлагается еще один

методический подход — включение специально подобранных сайт-специфических мутаций в консервативные участки РА-гена вирулентного штамма вируса гриппа, а также использование этих мутаций в комбинации с сайт-специфическими мутациями из других генов, кодирующих белки полимеразного комплекса ХА штаммов-доноров: А/Краснодар/101/35/35/59 (Н2N2); А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2); А/Энн Арбор/6/60 (Н2N2). Структурно-функциональные особенности РА-субъединицы полимеразного комплекса до настоящего времени изучены довольно поверхностно. Известно, что она содержит 2 больших домена: эндонуклеазный домен (аминокислотные остатки 1 — 197) и большой С-терминальный домен (аминокислотные остатки 257 — 716), который контактирует с первыми 15 аминокислотными остатками РВ1-субъединицы. Оба домена связаны линкером, состоящим из 60 аминокислотных остатков (197 — 257), образующих 3 спиральных сегмента. Линкерная область РА-субъединицы лежит на поверхности РВ1-субъединицы и является критической для сборки гетеродимера РВ1-РА и его импорта в клеточное ядро. Недавно было обнаружено, что линкерная область РА-белка является подходящим местом для включения сайт-специфических мутаций с целью конструирования новых живых гриппозных вакцин [3]. Мы со своей стороны попытались с той же целью использовать другую консервативную область РА-белка — концевую часть СООН-домена, где у ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 была обнаружена мутация F707L. С этой целью были сделаны аминокислотные замены в позициях 706 (W-A), 707 (F-L), 658 (F-A). В данной работе мы исследовали влияние этих мутаций на фенотипические маркеры вирулентного штамма А/WSN/33 при их включении в геном данного штамма одних или в комбинации с ts-мутациями, взятыми из генов, кодирующих белки полимеразного комплекса ХА штаммов вируса гриппа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе был использован вирулентный штамм вируса гриппа А/WSN/33 (Н1N1), полученный путем трансфекции из плазмид рНW2000, содержащих отдельные гены данного штамма. Восемью-плазмидная трансфекционная система на основе вектора рНW2000 была любезно предоставлена доктором Вебстером (Мемфис, США).

Все использованные в работе вирусы и сайт-специфические мутанты поддерживали путем пассажей в 10 — 11-дневных куриных эмбрионах (КЭ). Активность репродукции вирусов гриппа при разной температуре инкубации оценивали по результатам титрования в КЭ, инкубированным при 34°C, 37°C, 38°C, 39°C и выражали в RCT (reproductive capacity at different temperatures). $RCT_{39} = (\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл при } 34^\circ\text{C} - \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл при } 39^\circ\text{C})$. Вирусы считались температурочувствительными (ts-фенотип), если RCT₃₉ был более 5.0 lg ЭИД₅₀/0,2 мл.

В опытах по трансфекции использовали культуру клеток Т293 и линию клеток MDCK, полученную из Института Пастера (Франция). Все клетки выращивались при 37°C в СО₂-инкубаторе. Клеточные культуры пассировались на среде МЕМ (ПанЭко, Москва), содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки и гентамицин в количестве 1 мг на 450 мл среды.

Для генно-инженерных работ со штаммом А/WSN/33 (Н1N1) вируса гриппа использовалась 8-плазмидная трансфекционная система на основе вектора рНW2000 [5]. Каждая из 8 плазмид содержала соответствующий ген вируса гриппа, фланкированный необходимыми регулируемыми элементами для

сборки вируса в клеточной культуре при трансфекции. Для накопления плазмид использовали штамм *Escherichia coli* DH5alpha.

Вирусы накапливали в куриных эмбрионах по стандартной методике. Для последующего выделения РНК вирусы концентрировали центрифугированием. Вначале аллантаоисную жидкость осаждали в центрифуге Beckman J2-21 (ротор JA-14) при 6000 об/мин в течение 30 мин для осаждения клеточного дегриза. Вирус осаждали из надосадочной жидкости на высокоскоростной центрифуге Beckman J2-21 с использованием ротора JA-14 (14000 об/мин, 2,5 часа). Осадок вирионов ресуспендировали в буфере STE (10mM Tris-HCL, 100 mM NaCL, 1mM EDTA, pH 7.4) в гомогенизаторе Даунса.

Для последующей постановки ПЦР выделяли вирусную РНК при помощи набора для выделения РНК из плазмы и сыворотки крови (Лаборатория Изоген, Москва).

Обратную транскрипцию ставили отдельно от ПЦР при помощи ревертазы M-MuLV (СибЭнзим, Новосибирск). ПЦР ставили с высокоточной полимеразой Tersus (Евроген, Москва). Очистку полученных ПЦР-продуктов из легкоплавкой агарозы осуществляли при помощи набора фирмы Fermentas (Thermo Fisher Scientific, США).

Мутагенез PA-гена проводился с помощью двуступенчатой мутационной ПЦР. Для очистки ПЦР продукта использовали Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit (кат. № 0702). Клонирование проводили с помощью так называемой GoldenGate реакции (<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>). Использовались рестриктаза Esp3 (BsmB1) (Fermentas/Thermo-Scientific, кат. № ERO451), буфер 10x Fermentas Tango, T4 ДНК лигаза (СибЭнзим, кат. № E319). Реакция проводилась в амплификаторе с программой 15 циклов по 5 минут при 37°C и 5 минут при 17°C. Трансформацию проводили на рубидиевых компетентных бактериальных клетках штамма DH5α. Скрининг клонов проводили при помощи ПЦР с последующим электрофоретическим анализом.

Секвенирование вставок в полученных плазидах проводилось фирмой «Евроген» на автоматическом секвенаторе MegaBACE-500.

Трансфекцию проводили при помощи реагента Lipofectamine LTX (Invitrogen) либо в кокультуре клеток 293Т и MDCK, либо в однодневном монослое клеток 293Т.

Изучение att-фенотипа проводили по следующей методике: группы мышей весом 10 — 12 г (самки, по пять голов на группу) инфицировали интраназально под легким эфирным наркозом анализируемыми вирусами (в дозе 50 мкл на мышь). Через 72 часа мышей усыпляли и извлекали легочную ткань, из которой готовили 10% суспензию в ступках с тертым стеклом. Инфекционный титр вируса в 10% суспензии легких определяли в куриных эмбрионах и выражали в Ig ЭИД₅₀/0,2 мл. Все реассортанты были исследованы в трех независимых опытах.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием среднего квадратичного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы нами был исследован ts-фенотип у вариантов штамма A/WSN/33, имеющих сайт-специфические мутации в PA-гене. Как видно из табл. 1, включение мутаций в концевую часть COOH-домена PA-гена в позиции 706 и 707 незначительно влияло на уровень размножения штамма A/WSN/33 в куриных эмбрионах при повышенной температуре. Однако ва-

риант штамма А/WSN/33 с сайт-специфической мутацией F658A в РА-гене снизил активность размножения в куриных эмбрионах при 38°C на 2.0 lg и больше, чем на 3.0 lg при 39°C. На следующем этапе работы был исследован ts-фенотип вариантов штамма А/WSN/33, имеющих ts-мутацию F658A в РА-гене в комбинации с сайт-специфическими мутациями в геноме из РВ1-гена различных штаммов вируса гриппа. Как видно из табл. 1, трансфектант №5, имеющий в геноме единичную мутацию I147Т из РВ1-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59, полностью потерял способность к размножению при 39°C. Трансфектант №4, имеющий в геноме ts-мутации из РВ1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60, характеризовался значительным снижением

способности к размножению при 39°C. Далее мы исследовали ts-фенотип трансфектанта №6, унаследовавшего в геноме мутацию V591I из РВ1-гена штамма А/Ленинград/134/17/57 в сочетании с мутацией F658A в РА-гене. Как видно из табл. 1, данный трансфектант характеризовался незначительным изменением уровня репродукции при 39°C. Принимая во внимание тот факт, что большинство полученных трансфектантов, имеющих в РА-гене мутацию F658A, характеризовались недостаточной аттенуацией, мы включили в геном штамма А/WSN/33 дополнительную ts-мутацию, взятую из РВ2-гена ХА штамма А/Краснодар/101/35/59. Полученные трансфектанты №7 и №8, имеющие в геноме сайт-специфические мутации из всех 3 генов, кодирующих белки полимеразного комплекса, обладали различным набором мутаций только в РВ1-гене. Трансфектант №7 унаследовал одну ts-мутацию (V591I) в РВ1-гене из генома ХА штамма А/Ленинград/134/17/57. Трансфектант №8 приобрел 3 мутации из РВ1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 (К391Е, Е581G, Е457D). Как видно из табл. 1, трансфектант №7 показал незначительное изменение ts-фенотипа, в то время как трансфектант №8 полностью утратил способность к размножению при непермиссивных условиях.

При изучении весовых характеристик мышей, инфицированных интраназально вариантами штамма А/WSN/33, содержащими сайт-специфические мутации в генах, кодирующие белки полимеразного комплекса РВ1, РВ2 и РА, было установлено, что мыши, инфицированные исходным вирулентным

Таблица 1. Изучение ts- и att-фенотипа вариантов штамма вируса гриппа А/WSN/33, имеющих сайт-специфические мутации в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса

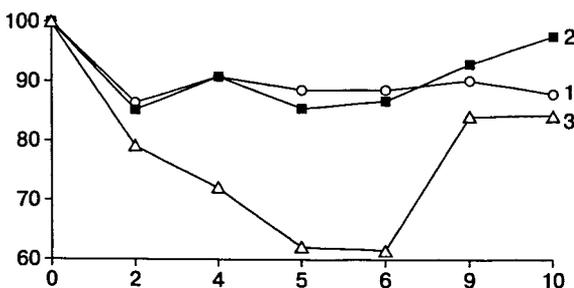
Исходный штамм и полученные трансфектанты (Тр.)	Титр вирусосодержащей жидкости в куриных эмбрионах (ЭИД ₅₀ /0,2 мл)			Титр вируса в легких мышей (lg ЭИД ₅₀ /0,2 мл)
	34°C	38°C	39°C	
А/WSN/33	6.5±0,32	6.5±0,25	6,25±0,4	5,0±0,4
Тр. №1 РА* А/WSN/33** (W706A)***	5.5±0.4	5.5±0,2	н.д.	5.0±0.35
Тр. №2 РА А/WSN/33 (F707L)	6.0±0,25	н.д.	4.0±0,5	4.0±0,2
Тр. №3 РА А/WSN/33 (F658A)	6.0±0,5	4.0±1.0	3.0±0,4	2.0±0,5
Тр. №4 РВ1 А/АА (К391Е, Е581G, Е457D) РА А/WSN/33 (F658A)	6.0±0.5	4.0±1.0	2.0±0,2	2.0±0.7
Тр. №5 РВ1 А/Кр ₃₅ (I147Т) РА А/WSN/33 (F658A)	6.0±1.0	4.0±0.8	<1.0	<1.0
Тр. №6 РВ1 А/Лен ₁₇ (V591I) РА А/WSN/33 (F658 А)	6.0±0.4	4.0±0.5	4.0±0.4	2.5±0.35
Тр. №7 РВ1 А/Лен ₁₇ (V591I) РВ2 А/Кр ₃₅ (V290L) РА А/WSN/33 (F658A)	6.5±0.5	5.0±1.0	3.0±0.5	2.5±1.2
Тр. №8 РВ1 А/АА(К391Е, Е581G, Е457D) РВ2 А/Кр ₃₅ (V290L) РА А/WSN/33 (F658A)	5.5± 0.35	3.5±1.0	<1.0	<1.0

Примечание. * Полимеразный ген; ** название штамма: А/WSN/33, А/АА — А/Энн Арбор/6/60, А/Лен₁₇ — А/Ленинград/134/17/57, А/Кр₃₅ — А/Краснодар/101/35/59; ***Локализация мутации, н.д. — не делали.

штаммом А/WSN/33, характеризовались быстрой и значительной потерей веса после интраназального заражения в дозе $10^{5.0}$ ЭИД₅₀/0,05 мл. На 8 — 9 сутки после инфицирования часть мышей погибла. Мыши, инфицированные трансфектантами №4, №5, №6, показывали различные, но менее выраженные темпы падения веса (рис.). Наибольшую потерю веса обнаружили мыши, инфицированные трансфектантом №6, имеющем в РВ1-гене мутацию V591I, унаследованную из РВ1-гена ХА штамма А/Ленинград/17/134/57. Мыши, инфицированные трансфектантами №7 и №8, показывали меньшую потерю веса на протяжении всего срока наблюдения. Можно было сделать вывод, что мутация V591I в РВ1-гене незначительно влияла на снижение вирулентности трансфектанта №6.

Далее изучали att-фенотип полученных сайт-специфических мутантов штамма А/WSN/33. Исследованные трансфектанты значительно различались по степени размножения в легочной ткани мышей. Как видно из табл. 1, среди трансфектантов, имеющих единичные замены в концевой области СООН-домена РА-гена, только трансфектант с мутацией F658A резко снизил уровень вирусного размножения в легочной ткани мышей. Трансфектанты, унаследовавшие мутации W706A и F707L в РА-гене, практически не отличались по вирулентности для мышей от исходного штамма А/WSN/33. Среди трансфектантов, имеющих ts-мутации в РВ1-гене и РА-гене, полной потерей размножения в легких мышей характеризовался только трансфектант №5, имеющий в РВ1-гене мутацию I147T от ХА штамма А/Краснодар/101/35/59. Два другие трансфектанта демонстрировали сниженное, но заметное размножение вируса в легочной ткани мышей. В заключительной части этого раздела работы мы исследовали att-фенотип трансфектантов, имеющих ts-мутации в генах, кодирующих все три субъединицы полимеразного комплекса вируса гриппа. Как видно из табл. 1, трансфектанты №7 и №8 имели значительные различия по данному маркеру. Если трансфектант №8 потерял способность размножаться в легких мышей, то трансфектант №7 размножался в легких достаточно активно.

На следующем этапе работы нами был проведен сравнительный анализ



Потеря веса мышей, инфицированных вариантами вируса гриппа, имеющими сайт-специфические мутации в генах полимеразного комплекса.

По оси абсцисс — время (сут), прошедшее с момента инфицирования мышей сайт-специфическими мутантами штамма А/WSN/33 вируса гриппа; по оси ординат — потеря веса мышей, инфицированных сайт-специфическими мутантами (%); 1 — Тр. № 4, 2 — Тр. № 5, 3 — Тр. № 6.

иммуногенности трансфектантов, имеющих сайт-специфические мутации в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса. Необходимо было выяснить, могут ли эти варианты со сниженной способностью к размножению в легких мышей индуцировать достаточно высокий гуморальный иммунитет у мышей в ответ на интраназальное заражение. Наличие значительного титра антител в крови мышей, иммунизированных трансфектантами, дало бы возможность рассматривать их в качестве перспективных кандидатов в живые гриппозные вакцины. Трансфектанты №4, №5, №6, взятые для исследования,

имели общую мутацию F658A в PA-гене, однако различные мутации в PB1-гене. Как видно из табл. 2, трансфектанты №4, №5 и №6, имеющие соответственно три мутации (K391E, E581G, E457D) из PB1-гена ХА штамма А/Энн Арбор/6/60, одну мутацию из PB1-гена (I147T) штамма А/Краснодар/101/35/59 и ts-мутацию (V591I) из PB1-гена А/Ленинград/134/17/57, индуцировали умеренный уровень гуморального иммунитета у мышей. Мыши, иммунизированные трансфектантом №8, имеющим сайт-специфические мутации в 3 генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, также характеризовались умеренным уровнем гуморального иммунитета.

Таблица 2. Изучение иммуногенности вариантов штамма вируса гриппа А/WSN/33 с сайт-специфическими ts-мутациями в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса

Сыворотка	Титр сывороточных антител в РЗГА при взаимодействии вирусов с антисыворотками*			
	Антигены			
	Тр. №4	Тр. №5	Тр. №6	Тр. №8
Тр. №4	1:160—1:320			
Тр. №5		1:160		
Тр. №6			1:160—1:320	
Тр. №8				1:320
Неим. сыв.	<:10	<:10	<:10	<:10

Примечание. * Реакцию задержки (торможения) гемагглютинации (РЗГА) с вирусами гриппа проводили согласно МУ 3.3.2. 1758-03. За титр сыворотки принимали предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации. Тр. — трансфектант.

В опытах на мышах нами была исследована защитная эффективность трансфектантов №4, №5, №6, №8. Мышей вакцинировали дважды интраназально исследуемыми вирусами в дозе $10^{5.0}$ ЭИД₅₀/0,05мл с последующим инфицированием вирулентным штаммом А/WSN/33 в дозе $10^{2.0}$ ЭИД₅₀/0,05 мл. Титр вирулентного штамма легких при заражении невакцинированных мышей составлял $10^{3.5}$ ЭИД₅₀/0,2 мл. В легких мышей, вакцинированных трансфектантами №4, №5, №6, №8, не наблюдалось вирусного размножения. Интересно отметить, что трансфектанты, индуцирующие умеренный уровень гуморальных антител (1:160 — 1:320), обеспечивали полную защитную эффективность при иммунизации, что, по-видимому, можно объяснить значительной активизацией в данном случае клеточного иммунитета.

ОБСУЖДЕНИЕ

Введение в практику получения гриппозных живых вакцин генно-инженерных подходов может значительно оптимизировать отдельные этапы этого процесса. В последнее время большой интерес вызывает генно-инженерный подход, предполагающий получение вакцинных вариантов путем прямого включения в геном вирулентных штаммов вируса гриппа заранее известных и изученных ts-мутаций, взятых из генома ХА штаммов — доноров аттенуации. Вместе с тем, не менее перспективным подходом в этом направлении может быть включение аттенуирующих мутаций в функционально важные сайты консервативных последовательностей генома вирулентного штамма. Примером может служить обнаружение в линкерной области PA-гена вирулентного штамма А/WSN/33 функционально важных сайтов, включение в которые мутационных замен приводило к появлению вакцинных вариантов [3]. Используя этот методический подход, мы включили мутационную замену F658A в другой функционально важный сайт PA-гена штамма А/WSN/33 — концевую область СООН-домена этого гена, что также привело к аттенуации этого штамма.

Как показали наши исследования, более глубокая аттенуация вирулент-

ного штамма A/WSN/33 может быть достигнута путем комбинированного включения в его PA-ген аттенуирующей замены F658A и ts-мутаций из генов, кодирующих белки полимеразного комплекса ХА штаммов вируса гриппа. Трансфектанты №5 и №8, содержащие замену F658A в PA-гене в сочетании с ts-мутациями из генов, кодирующих белки полимеразного комплекса ХА штаммов, имели удовлетворительные фенотипические характеристики. Они не размножались в куриных эмбрионах при непермиссивных условиях, полностью потеряли вирулентность для мышей при интраназальном заражении и обладали защитной эффективностью при заражении мышей вирулентным штаммом. Таким образом, использованный нами подход оказался весьма перспективным. Интересно отметить, что трансфектанты №5 и №8, индуцирующие у иммунизированных мышей умеренный уровень гуморальных антител, тем не менее, обладали удовлетворительной защитной эффективностью. В этой связи, можно предположить, что при интраназальной иммунизации полученными трансфектантами наблюдается значительная активация клеточного иммунитета.

По данным некоторых исследователей [6, 12] феномен констелляции генов значительно ограничивает включение мутаций в несколько различных генов вирулентного штамма с целью модификации его генома, что значительно усложняет использование данного генетического подхода для получения аттенуированных вариантов вируса гриппа А. Тем не менее, в данной работе показана возможность создания мутационных замен различного происхождения в 3 генах, кодирующих белки полимеразного комплекса вирулентного штамма. Исследование генетической стабильности полученных трансфектантов с оптимальными фенотипическими характеристиками даст возможность оценить их в качестве возможных кандидатов в живые гриппозные вакцины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. Санкт-Петербург, Наука, 1994.
2. Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Цфасман Т.М. и др. Новые холодоадаптированные штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа. Вопросы вирусологии. 2013, 1: 11-17.
3. Da Costa B., Sausset A., Munier S. et al. Temperature-sensitive mutants in the influenza A virus RNA polymerase: alterations in the PA linker reduce nuclear targeting of the PB1-PA dimer and result in viral attenuation. *J. Virol.* 2015, 89 (12): 6376- 6390.
4. Hickman D., Hossain J., Song H. et al. An avian live attenuated master backbone for potential use in epidemic and pandemic influenza vaccines. *J. Gen. Virol.* 2008, 89: 2682-2690.
5. Hoffmann E., Neumann G., Hobom G. et al. Ambisense approach for the generation of influenza A virus: vRNA and mRNA synthesis from one template. *Virology.* 2000, 267 (2): 310-317.
6. Jin H., Zhou H., Lu B. et al. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J. Virol.* 2004, 78 (2): 995-998.
7. Parkin N., Chiu P., Coelingh K. Genetically engineering live attenuated influenza A virus vaccine candidates. *J. Virol.* 1997, 71 (4): 2772-2778.
8. Pena L., Vincent A., Ye J. et al. Modifications in the polymerase genes of a swine-like triple-reassortant influenza virus to generate live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 viruses. *J. Virol.* 2011, 85 (1): 456-469.
9. Solorzano A., Li Yo., Perez D.R. Alternative live — attenuated influenza vaccines based on modification in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virol.* 2010, 84 (9): 4587-4596.

10. Song H., Nieto G., Perez D. A new generation of modified live-attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J. Virol.* 2007, 81 (17): 9238–9248.
11. Subbarao E.K., Kawaoka Y., Murphy B.R. Rescue of an influenza A virus wild-type 7227PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature — sensitive and attenuating mutation. *J. Virol.* 1993, 67 (12): 7223–7227.
12. Subbarao K., Park E., Lawson C. et al. Sequential addition temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design of a genetically engineered live influenza A virus vaccine. *J. Virol.* 1995, 69 (10): 5969–5977.
13. Zhou B., Li Y., Speer S. et al. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine.* 2012, 30 (24): 3691–3702.

Поступила 26.09.16

Контактная информация: Ртишев Артем Андреевич,
115088, Москва, 1 Дубровская ул., 15, р.т. (495)674-02-47

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*А.В.Шиповалов¹, А.Г.Дурыманов¹, О.В.Петрова¹, Е.В.Иванова²,
А.В.Епанчинцева¹, С.В.Святченко¹, С.В.Мальцев¹, В.Ю.Марченко¹,
В.Н.Михеев¹, А.Б.Рыжиков¹, Т.Н.Ильичева¹*

АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА К ГРИППУ НАКАНУНЕ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ СЕЗОНОВ В 2014 Г. И 2015 Г.

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская область, ²Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области, Новосибирск

Цель. Контроль за коллективным иммунитетом населения к сезонным вирусам гриппа, а также надзор за появлением в сыворотках крови людей антител к вирусам гриппа с пандемическим потенциалом. *Материалы и методы.* Реакция торможения гемагглютинации с вакцинными и эпидемическими штаммами вируса гриппа, а также с высокопатогенными вирусами гриппа птиц А/гоок/Chany/32/2015 (H5N1) (clade 2.3.2.1c.) и А/Anhui/01/2013 (H7N9). *Результаты.* Среди всех образцов сыворотки, собранных осенью 2014 г. и осенью 2015 г., ни один не реагировал в РТГА с антигенами А(H5N1) и А(H7N9) даже в разведении 1:10. Из образцов, собранных осенью 2014 года, 41% были положительными к вирусу А/California/07/09(H1N1pdm09), 36% положительны к А/Texas/50/2012 (H3N2), 40% положительны к В/Brisbane/60/2008 (Vict.lin.) и 47% взаимодействовали в РТГА со штаммом В/Massachusetts/2/2012 (Yam.lin.). 22% всех образцов имели титр ниже 40 со всеми антигенами, и только 10% имели в РТГА титр 40 и более со всеми вакцинными штаммами. Среди образцов, собранных осенью 2015 года, количество серопозитивных к штамму А/California/07/09(H1N1pdm09) колебалось от 31% в Уральском ФО до 46% в Южном ФО. Количество серопозитивных к штамму А/Switzerland/9715293/13 (H3N2) было на уровне 4 — 13% во всех ФО, кроме Уральского, в котором этот показатель был немного выше 30%. Количество серопозитивных к вакцинным штаммам вируса гриппа В колебалось от 23 до 76%. Титр в РТГА равный или выше 40 со всеми вакцинными штаммами имели только 2% сывороток, серонегативными оказались 29% всех образцов. *Заключение.* Популяционный иммунитет населения России к вирусу гриппа А(H3N2) находится на очень низком уровне, поэтому социально значимые последствия от эпидемии гриппа во многом будут зависеть от кампании по вакцинации осенью 2016 года.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 53—60

Ключевые слова: популяционный иммунитет к гриппу, РТГА, антитела к вакцинным штаммам, антитела к высокопатогенным штаммам

*A.V.Shipovalov¹, A.G.Durymanov¹, O.V.Petrova¹, E.V.Ivanova²,
A.V.Epanchintseva¹, S.V.Svyatchenko¹, S.V.Maltsev¹, V.Yu.Marchenko¹,
V.N.Mikheev¹, A.B.Ryzhikov¹, T.N.Ilicheva¹*

ANALYSIS OF POPULATION IMMUNITY AGAINST INFLUENZA PRIOR TO 2014 AND 2015 EPIDEMIC SEASONS

¹State Scientific Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, ²Centre of Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Region, Novosibirsk, Russia

Aim. Control for the population herd immunity against seasonal influenza viruses as well as for emergence of antibodies against influenza with pandemic potential in human blood sera. *Materials and methods.* HAI reaction against vaccine and epidemic influenza viruses as well as HPAI viruses A/rook/Chany/32/2015 (H5N1) (clade 2.3.2.1c.) and A/Anhui/01/2013 (H7N9). *Results.* Among all the sera samples collected in the autumn of 2014 and 2015, none had reacted in HAI against A(H5N1) and A(H7N9) antigens even at 1:10 dilution. Among samples collected in autumn 2014, 41% were positive to A/California/07/09(H1N1pdm09) virus, 36% — A/Texas/50/2012 (H3N2), 40% — B/Brisbane/60/2008 (Vict.lin.) and 47% reacted in HAI against the B/Massachusetts/2/2012 (Yam.lin.) strain. 22% of all the samples had a titer of at least 40 against all the antigens and only 10% in HAI had a titer of 40 or more against all the vaccine strains. Among the samples collected in autumn 2015, the number of seropositive against A/California/07/09(H1N1pdm09) varied from 31% in the Urals FD to 46% in the Southern FD. The amount of seropositive against A/Switzerland/9715293/13 (H3N2) strain was at the level of 4 — 13% in all the FDs except Urals, where this parameter was slightly above 30%. The amount of seropositive against vaccine influenza B viruses varied from 23 to 76%. Only 2% of sera had titers in HAI of 40 or above against all the vaccine strains, 29% of all the samples were seronegative. *Conclusion.* Population immunity in Russia against influenza A(H3N2) is at a very low level, thus socially significant consequences of influenza epidemics in many aspects will depend on the vaccination campaign of autumn 2016.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 53—60

Key words: population immunity against influenza, HAI, antibodies against vaccine strains, antibodies against highly pathogenic strains

ВВЕДЕНИЕ

Серологические методы широко используются для наиболее адекватной оценки того, какая часть популяции конкретного региона или страны имела контакт с патогеном, поскольку не все люди обращаются за медицинской помощью при легком или бессимптомном течении болезни [6]. Кроме того, определение уровня антител против эпидемических штаммов вируса в сыворотке крови определенного процента населения (при случайной выборке) позволяет оценить потенциальную уязвимость населения и своевременно корректировать противозидемические мероприятия. Особое значение имеют сероэпидемиологические исследования высокопатогенного вируса гриппа А (H5N1, H7N9), поскольку значимое повышение количества людей, имеющих антитела к вирусу с пандемическим потенциалом, будет свидетельствовать о появлении варианта вируса, способного передаваться от человека к человеку. Так, до сих пор не известно, какая часть населения подвергается воздействию

этого патогена при его циркуляции среди дикой и домашней птицы, какова доля бессимптомных случаев болезни [4].

На территории РФ антитела к вирусу гриппа А(Н5N1) были обнаружены в 2008 — 2009 гг. вскоре после появления этого патогена в популяциях диких птиц на территории России (2005 — 2009 гг.) и вспышек высокопатогенного гриппа среди домашней птицы [1, 5]. С 2010 по 2014 гг. на территории России не было вспышек заболевания, вызванных высокопатогенным вирусом гриппа птиц, от диких и домашних птиц не выделяли вирусы А(Н5N1), в сыворотках крови людей антитела к этому патогену не обнаруживали [5]. В 2014 г. на севере Восточной Сибири от дикой водоплавающей птицы был выделен штамм высокопатогенного вируса гриппа А/wigeon/Sakha/1/2014 (Н5N8), на которого относится к clade 2.3.4.4 [8]. Весной 2015 г. на юге Западной Сибири был выделен штамм высокопатогенного вируса гриппа птиц А/rook/Chany/32/2015 (Н5N1) (clade 2.3.2.1c.) [9].

Настоящая работа посвящена анализу популяционного иммунитета к гриппу накануне эпидемических сезонов в 2014 и 2015 годах. Для этого сыворотки, собранные в разных регионах России исследовали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с вакцинными и высокопатогенными штаммами вируса гриппа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В реакции торможения гемагглютинации использовались антигены, представляющие собой вируссодержащую культуральную жидкость, инактивированную β-пропиолактоном. Для приготовления антигенов использовались штаммы вируса гриппа, полученные из СЦ ВОЗ (Атланта, США): А/California/07/09(Н1N1pdm09), А/Texas/50/2012 (Н3N2), А/Switzerland/9715293/13 (Н3N2), В/Brisbane/60/2008 (Vict. lin.), В/Massachusetts/2/2012 (Yam.lin.), В/Phuket/3073/2013 (Yam.lin.), а также штамм А/Anhui/01/2013 (Н7N9), полученный из СЦ ВОЗ (Гонконг, Китай), и выделенный нами штамм А/rook/Chany/32/2015 (Н5N1) (clade 2.3.2.1c.) [9].

Сбор образцов крови осуществлялся методом случайной выборки у людей разных возрастных групп, обратившихся за медицинской помощью в многопрофильные лечебно-профилактические учреждения, а также на станциях переливания крови. Забор крови осуществлялся из периферической (локтевой) вены в объеме 5 мл с помощью одноразовых шприцев или одноразовых пластиковых систем (вакутайнеры), состоящих из контейнера с навинчивающейся на него одноразовой иглой и пробирки с плотно прилегающей пробкой и вакуумом внутри. Венозная кровь, полученная без антикоагулянтов, отстаивалась в пробирке при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка, затем пробирки помещали в холодильник на ночь. На следующий день отбирали сыворотку автоматической пипеткой в чистые пробирки и осветляли центрифугированием при 2000 — 3000 об/мин в течение 10 мин. Осветленную сыворотку отбирали пипеткой в чистую промаркированную пробирку.

Транспортировку образцов в ГНЦ ВБ «Вектор» осуществляли в термоконтейнере с хладозементами. Собранные образцы хранили до исследования при температуре — 20°С. Наличие в сыворотках крови антител к разным типам/серотипам вируса гриппа тестировали по общепринятой методике в реакции торможения гемагглютинации [11], сыворотки считали положительными, если обратный титр антител был равен или больше 40. Для тестирования сывороток, собранных в 2014 году, использовали вакцинные штаммы А/

California/07/09(H1N1pdm09), A/Texas/50/2012 (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (Vict. lin.), B/Massachusetts/2/2012 (Yam.lin.). Для тестирования сывороток, собранных в 2015 г., использовали вакцинные штаммы A/California/07/09(H1N1pdm09), A/Switzerland/9715293/13 (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (Vict. lin.), B/Phuket/3073/2013 (Yam.lin.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего было исследовано 3888 образцов, собранных осенью 2014 года, и 4548 образцов, собранных осенью 2015 года. Ни один из образцов сыворотки крови даже в разведении 1:10 не реагировал в РТГА с антигенами А(Н5N1) и А(Н7N9).

Результаты, полученные в РТГА с вакцинными штаммами, представлены в табл. 1.

Если суммировать данные, приведенные в табл. 1, видно, что 41% всех образцов, собранных осенью 2014 года, были позитивными к вирусу A/California/07/09(H1N1pdm09), 36% позитивны к A/Texas/50/2012 (H3N2), 40% положительны к B/Brisbane/60/2008 (Vict.lin.) и 47% взаимодействовали в РТГА со штаммом B/Massachusetts/2/2012 (Yam.lin.). 22% всех образцов имели титр ниже 40 со всеми антигенами, и только 10% имели в РТГА титр 40 и более

Таблица 1. Количество образцов сывороток, серопозитивных к вакцинным штаммам вируса гриппа А и В

Регион сбора сывороток крови	Тип/субтип антигена в РТГА	Осень 2014 г.			Осень 2015 г.		
		Кол-во образцов	Кол-во серопозитивных	%	Кол-во образцов	Кол-во серопозитивных	%
Дальневосточный ФО	A/H1	859	231	27	1154	400	35
	A/H3		137	16		83	7
	B/Vic		463	54		264	23
	B/Yam		349	41		529	46
Сибирский ФО	A/H1	1350	605	45	1363	451	33
	A/H3		515	38		140	10
	B/Vic		384	28		436	32
	B/Yam		560	41		607	45
Уральский ФО	A/H1	609	338	56	571	178	31
	A/H3		312	51		185	32
	B/Vic		342	56		283	50
	B/Yam		365	60		253	44
Приволжский ФО	A/H1	612	306	50	855	365	43
	A/H3		301	49		77	9
	B/Vic		234	38		214	25
	B/Yam		304	50		388	45
Северо-Западный ФО	A/H1	10	3	30	10	3	30
	A/H3		3	30		0	0
	B/Vic		2	20		0	0
	B/Yam		7	70		9	90
Южный ФО	A/H1	248	72	29	395	181	46
	A/H3		53	21		14	4
	B/Vic		73	29		97	25
	B/Yam		107	43		200	51
Северо-Кавказский ФО	A/H1	200	46	23	200	62	31
	A/H3		68	34		25	13
	B/Vic		43	22		63	32
	B/Yam		128	64		151	76
Всего образцов			3888			4548	

со всеми вакцинными штаммами. Тем не менее, важно отметить, что уровень популяционного иммунитета к гриппу существенно различался в федеральных округах. Так, в 2014 году количество серопозитивных ко всем вакцинным штаммам в Уральском ФО находилось на уровне 51 — 60%, а в Северо-Кавказском ФО в диапазоне 29 — 43%.

Таблица 2. Антигенные свойства штамма A/Novosibirsk/29/14 (H3N2)

Вирус гриппа A(H3N2)	Титр сывороток			
	A/Perth/16/09	A/Victoria/361/09	A/Texas/50/12	A/Switzerland/9715293/13
A/Perth/16/09	1280	40	40	20
A/Victoria/361/09	320	2560	320	20
A/Texas/50/12	160	640	1260	80
A/Switzerland/9715293/13	<20	80	160	1280
A/Novosibirsk/29/14	<20	80	80	640

Среди образцов, собранных осенью 2015 года (табл. 1), количество серопозитивных к штамму A/California/07/09(H1N1pdm09) колебалось от 31% в Уральском ФО до 46% в Южном ФО. Количество серопозитивных к штамму A/Switzerland/9715293/13 (H3N2) было на уровне 4 — 13% во всех ФО, кроме Уральского, в котором этот показатель был немного выше 30%. Количество серопозитивных к вакцинным штаммам вируса гриппа В колебалось от 23 до 76%. В среднем, серопозитивных образцов к A/California/07/09(H1N1pdm09) было около 36%, к A/Switzerland/9715293/13 (H3N2) — 12%, к B/Brisbane/60/2008 (Vict. lin.) — 30%, к B/Phuket/3073/2013 (Yam.lin.) — 47%. Титр в РТГА равный или выше 40 со всеми вакцинными штаммами имели только 2% сывороток, серонегативными оказались 29% всех образцов.

Известно, что вирусы гриппа A(H3N2) эволюционируют быстрее, чем вирусы A(H1N1), у них быстрее изменяются антигенные свойства, и, как следствие, приходится чаще менять вакцинный штамм [10]. Чтобы оценить коллективный иммунитет населения России накануне эпидемии 2014 — 2015 гг. в отношении эпидемических штаммов вируса гриппа A(H3N2), мы тестировали 50 сывороток, положительных к вакцинному штамму A/Texas/50/2012 (H3N2), в РТГА с эпидемическим штаммом A/Novosibirsk/29/14 (H3N2), выделенным на юге Западной Сибири в самом конце эпидемии 2013 — 2014 гг. По антигенным свойствам этот штамм оказался подобен штамму A/Switzerland/9715293/13. Антигенная характеристика штамма A/Novosibirsk/29/14 (H3N2) представлена в табл. 2.

Как видно из табл. 2, по антигенным свойствам штамм A/Novosibirsk/29/14 подобен штамму A/Switzerland/9715293/13, рекомендованному ВОЗ в качестве вакцинного на сезон 2015 — 2016 гг.

Для дополнительного анализа были взяты по 10 образцов сыворотки крови, собранных в 5 регионах России и показавшие в РТГА с антигеном A/

Таблица 3. Анализ в РТГА сывороток крови против эпидемического штамма A/Novosibirsk/29/14 (H3N2)

Регион	Кол-во сывороток, имеющих в РТГА с вирусом A/Texas/50/2012 (H3N2) титр >80	Количество сывороток, имеющих в РТГА с вирусом A/Novosibirsk/29/14 (H3N2) титр:						
		<20	20	40	80	160	320	640
Сахалинская обл.	10				3	1	5	1
Забайкальский край	10	10						
Республика Хакассия	10	7	2	1				
Республика Алтай	10		2	5	3			
Астраханская обл.	10	8	1	1				
Всего	50	25 (50%)	5 (10%)	7 (14%)	6 (12%)	1 (2%)	5 (10%)	1 (2%)

Texas/50/2012 (H3N2) обратный титр более 80. С этими сыворотками была поставлена РТГА с антигеном A/Novosibirsk/29/14 (H3N2), выделенным в Новосибирске в марте 2014. Результаты исследования 50 сывороток в РТГА со штаммом A/Novosibirsk/29/14 (H3N2) представлены в табл. 3.

Исследование показало, что только 40% ($\pm 7\%$) из 1383 положительных к вакцинному штамму сывороток имели значимые титры с эпидемическим штаммом A/Novosibirsk/29/14 (H3N2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сероэпидемиологические исследования заболеваемости гриппом позволяют получить наиболее объективную информацию о коллективном иммунитете населения конкретного региона и страны в целом. Проведение исследования накануне эпидемии дает возможность прогнозировать последствия эпидемии, а мониторинговые исследования, проводимые в течение ряда лет, помогают корректировать противоэпидемические мероприятия [7].

Особое значение имеют серологические данные для надзора за вирусами с пандемическим потенциалом: A(H5N1) и A(H7N9) [Mai-Juan Ma. et al, 2015]. При бессимптомном или легком течении болезни мониторинговые серологические исследования групп риска помогут отследить, когда вирусы приобретут способность передаваться от человека к человеку.

Для контроля за коллективным иммунитетом населения к сезонным вирусам гриппа, а также для надзора за появлением в сыворотках крови людей антител к вирусам гриппа с пандемическим потенциалом было проведено настоящее исследование.

Всего было проанализировано 3888 образцов сыворотки крови, собранных в 25 регионах России в октябре-ноябре 2014 года, и 4548 образцов, собранных осенью 2015 года в 35 регионах РФ. Сыворотки собирали после отлета перелетных птиц и накануне сезонной эпидемии гриппа.

Ни в одном образце антитела к вирусам гриппа A(H5N1) и A(H7N9) обнаружены не были: ни одна из исследованных сывороток не взаимодействовала в РТГА с этими антигенами даже в разведении 1:10.

Анализ сывороток, собранных в 2014 году, показал, из 1383 сывороток, положительных к вакцинному штамму A/Texas/50/2012 (H3N2), только 40% ($\pm 7\%$) имели значимые титры с эпидемическим штаммом A/Novosibirsk/29/14 (H3N2).

Наши данные коррелируют с результатами Xie et al., которые показали, что поствакцинальные сыворотки, собранные в 2014 — 2015 гг., дали снижение среднего геометрического титра более чем на 50% против эпидемических штаммов A(H3N2) [12].

В 2015 году эпидемический подъем заболеваемости гриппом в России начался на 5 календарной неделе (25.01 — 01.02), пик эпидемии был пройден на 8 неделе (16.02 — 22.02), снижение активности регистрировалось до 13 недели. Более 59% из всех выделенных штаммов в России пришлось на вирус гриппа A(H3N2), около 37% на вирус гриппа B, доля вирусов A(H1N1pdm) составила менее 4% [2]. Эксперты из ЦС ВОЗ по гриппу подтвердили, что вакцинный штамм A/Texas/50/2012 был недостаточно эффективен против циркулировавших штаммов A(H3N2) вируса гриппа [3].

Популяционный иммунитет к гриппу осенью 2015 года в основном существенно различался в разных регионах России. Так, количество положительных сывороток к вирусу A/California/07/09 (H1N1pdm09) было несколько выше в Европейской части РФ (43,6%), чем на Урале и Западной Сибири

(29,7%) или в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке РФ (29,4%). Однако весьма тревожные данные получены в отношении популяционного иммунитета к вирусу А(Н3N2): в среднем только 8% сывороток из всех регионов были положительными к А/Switzerland/9715293/13, за исключением Уральского ФО, а среди образцов из Восточной Сибири и Дальнего Востока этот показатель еще ниже — 5,2%. В целом можно заключить, что популяционный иммунитет только к вирусу В (Yamagata) находился на среднем уровне накануне эпидемического сезона 2015 — 2016 гг.: количество позитивных образцов было около 50%.

В 2015 — 2016 гг. резкий подъем заболеваемости гриппом начался на второй неделе 2016 года. К 12 неделе эпидемический сезон по гриппу завершился. По результатам лабораторного мониторинга было подтверждено более 28,2 тыс. случаев заболевания, вызванного вирусами гриппа, в том числе около 28 тыс. вирусом гриппа А, из которых на долю вируса гриппа А(Н1N1)2009 пришлось около 93%. Однако сегодня следует обратить особое внимание на крайне низкий уровень популяционного иммунитета к вакцинному штамму А/Switzerland/9715293/13 (Н3N2). Поскольку накануне эпидемии 2015 — 2016 гг. уровень популяционного иммунитета был низким, а во время эпидемии циркулировали в основном штаммы другого субтипа, то к концу 2016 года естественный иммунитет к вирусу А(Н3N2) снизится еще больше. Вероятность того, что в эпидемию 2016 — 2017 гг. будет доминировать субтип А(Н3N2), довольно высока, а следовательно, социально значимые последствия от эпидемии гриппа во многом будут зависеть от кампании по вакцинации населения осенью 2016 года.

Авторы выражают глубокую благодарность коллегам из Центров гигиены и эпидемиологии субъектов РФ за сбор и своевременную доставку в ГНЦ ВБ «Вектор» образцов сывороток крови. Анализ сывороток против эпидемического штамма проведен при поддержке гранта РФФИ 15-15-00047.

ЛИТЕРАТУРА

1. Онищенко Г.Г., Ильичева Т.Н., Курская О.Г., Колодий К.М., Ясинская Л.М., Дурьманов А.Г., Игнашкина М.Б., Зайковская А.В., Шестопалов А.М., Дроздов И.Г. Случаи выявления антител к вирусу гриппа А/Н5N1 у жителей Российской Федерации. Журн. микробиол. 2010, 2: 13-16.
2. Постановление по гриппу от 20.08.2015 № 39. http://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/2b9/postanovlenie-po-grippu-ot-20.08.2015-_-39.pdf.
3. CDC. Early estimates of seasonal influenza vaccine effectiveness — United States, January 2015. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 2015, 64 (01): 10-15.
4. Goma M. R., Kaye A. S., Elabd M. A. et al. Avian influenza A(H5N1) and A(H9N2) seroprevalence and risk factors for infection among Egyptians: a prospective, controlled seroepidemiological study. JID. 2015, 211: 1399-1407.
5. Ilyicheva T.N., Abdurazhitov M.A., Durymanov A.G., Susloparov I.M., Goncharova N.I., Kolosova N.P., Mikheev V.N., Ryzhikov A.B. Herd immunity and fatal cases of influenza among the population exposed to poultry and wild birds in Asian Russia in 2013-2014. J. Med. Virol. 2015, Jun 23. doi: 10.1002/jmv.24301.
6. Laurie K.L., Huston P., Riley S. et al. Influenza serological studies to inform public health action: best practices to optimise timing, quality and reporting. Influenza Other Respir. Viruses. 2013, Mar; 7 (2): 211-224. doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.0370a.x. Epub. 2012 Apr 30.
7. Lipsitch M., Riley S., Cauchemez S. et al. Managing and reducing uncertainty in an emerging influenza pandemic. New Engl. J. Med. 2009, 361: 112-115.
8. Marchenko V.Y., Susloparov I.M., Kolosova N.P., Goncharova N.I., Shipovalov A.V., Durymanov A.G., Ilyicheva T.N., Budatsirenova L.V., Ivanova V.K., Ignatyev G.A., Ershova

- S.N., Tulyahova V.S., Mikheev V.N., Ryzhikov A.B. Influenza A(H5N8) virus isolation in Russia, 2014. Arch. Virol. 2015 Nov; 160 (11): 2857-2860. doi: 10.1007/s00705-015-2570-4. Epub. 2015 Aug 26.
9. Marchenko V.Y., Susloparov I.M., Goncharova N.I., Kolosova N.P., Shipovalov A.V., Ilyicheva T.N., Durymanov A.G., Chernyshova O.A., Kozlovskiy L.I., Chernyshova T.V., Pryadkina E.N., Karimova T.V., Mikheev V.N., Ryzhikov A.V. Highly pathogenic influenza H5N1 virus of clade 2.3.2.1c in Western Siberia. Arch Virol. 2016 Jun; 161 (6): 1645-9. doi: 10.1007/s00705-016-2800-4. Epub. 2016 Mar 3.
 10. Tewawong N., Prachayangprecha S., Vichiwattana P. et al. Assessing antigenic drift of seasonal influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 viruses. PLoS One. 2015 Oct; 10 (10): e0139958. doi: 10.1371/journal.pone.0139958. eCollection 2015.
 11. World Health Organization Surveillance Network: Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva, WHO, 2011, p. 59-62.
 12. Xie H., Wan X.F., Ye Z. et al. H3N2 mismatch of 2014-15 northern hemisphere influenza vaccines and head-to-head comparison between human and ferret antisera derived antigenic maps. Sci. Rep. 2015 Oct; 16;5:15279. doi: 10.1038/srep15279.

Поступила 10.09.16

Контактная информация: Ильичева Татьяна Николаевна, д.б.н., 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово, р.т. (383)363-47-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Д.В.Танальский¹, Д.Р.Петренив², О.М.Храмченкова³, А.С.Дорошкевич¹

АНТИМИКРОБНАЯ И ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЛИШАЙНИКОВ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

¹Гомельский государственный медицинский университет, ²Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель; ³Гомельский государственный университет, Беларусь

Цель. Изучение спектра и выраженности антибактериальных и противогрибковых свойств экстрактов лишайников. **Материалы и методы.** Антимикробную активность ацетоновых экстрактов из лишайников *Hypogymnia physodes*, *Xanthoria parietina*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria*, *Cladonia arbuscula* определяли методом микро-разведений в бульоне в диапазоне концентраций от 4 до 500 мкг/мл в отношении 13 штаммов из коллекции АТСС и 6 клинических изолятов. **Результаты.** Выявлена высокая антибактериальная активность экстрактов *H.physodes* и *C.arbuscula* в отношении стафилококков и энтерококков (МПК 31 — 62 мкг/мл). Антимикробная активность в отношении энтеробактерий и *Pseudomonas aeruginosa* отсутствовала у всех экстрактов. Экстракты *E.prunastri*, *H.physodes* и *C.arbuscula* были активны в отношении штаммов *Stenotrophomonas maltophilia* (МПК 250 — 500 мкг/мл). Противогрибковая активность (МПК 500 мкг/мл для 4 штаммов *Candida*) выявлена только для экстракта *E.prunastri*. **Заключение.** Лишайники *H.physodes* и *C.arbuscula* можно рассматривать в качестве перспективных источников антибактериальных веществ, эффективных против антибиотикорезистентных штаммов стафилококков, стрептококков *S.maltophilia*.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 60—65

Ключевые слова: лишайники, экстракты, антибактериальная активность, *Stenotrophomonas maltophilia*

ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LICHENS PREVALENT IN BELARUS

¹Gomel State Medical University, ²Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel; ³Gomel State University, Belarus

Aim. Study spectrum and expressiveness of antibacterial and antifungal properties of lichen extracts. **Materials and methods.** Antimicrobial activity of acetone extracts from *Hypogymnia physodes*, *Xanthoria parietina*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria*, *Cladonia arbuscula* lichens was determined by micro-dilution methods in broth for 4 — 500 mcg/ml concentrations against 13 strains from ATCC collection and 6 clinical isolates. **Results.** High antibacterial activity of *H. physodes* and *C. arbuscular* extracts against staphylococci and enterococci was detected (MIC 31 — 62 mcg/ml). Antimicrobial activity against enterobacteria and *Pseudomonas aeruginosa* was absent for all the extracts. *E.prunastri*, *H.physodes* and *C. arbuscula* extracts were active against *Stenotrophomonas maltophilia* strains (MIC 250 — 500 mcg/ml). Antifungal activity (MIC 500 mcg/ml for 4 *Candida* strains) was only detected for the *E. prunastri* extract. **Conclusion.** *H.physodes* and *C. arbuscula* lichens can be examined as a perspective source of antibacterial substances, effective against antibiotics resistant staphylococci, streptococci and *S. maltophilia* strains.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 60—65

Key words: lichens, extracts, antibacterial activity, *Stenotrophomonas maltophilia*

ВВЕДЕНИЕ

Лишайники представляют собой симбиотические ассоциации грибов и микроскопических водорослей или цианобактерий. Для них характерен медленный рост и способность к существованию практически во всех наземных экосистемах от арктической тундры до пустынь. Устойчивость лишайников к экстремальным воздействиям связана с продукцией ими многочисленных вторичных метаболитов — алифатических, циклоалифатических, гетероциклических и терпеновых соединений, которые могут составлять до 30% от сухой массы слоевищ. Вторичные метаболиты лишайников служат главным образом для поглощения света, защиты фотобионта от ультрафиолетового излучения и подавления роста микроорганизмов. Также описана противовирусная, цитостатическая и фермент-ингибирующая активность многих из них [9].

Лишайники широко использовались в традиционной медицине для лечения заболеваний дыхательной системы и желудочно-кишечного тракта. Терапевтическая активность приписывается главным образом представителям родов *Cladonia*, *Evernia*, *Lobaria*, *Parmelia*, *Peltigera*, *Pertusaria*, *Physcia*, *Roccella*, *Usnea*, *Xanthoria*. Интенсивное изучение антибактериальной активности экстрактов из различных лишайников, а также отдельных содержащихся в них вторичных метаболитов ведется с середины 1950-х годов [2]. Для многих видов лишайников активность выявлена главным образом в отношении грамположительных бактерий, включая микобактерии, и грибов. Антибактериальные свойства усниновой кислоты, содержащейся во многих лишайниках, позволили использовать ее в качестве препаратов для местной антисептики (например, натрия уснинат 1% спиртовой раствор), а также в составе жидкости для полоскания рта и зубных паст [7].

Стремительное распространение множественной устойчивости к антибиотикам среди возбудителей бактериальных инфекций требует поиска соединений с новыми механизмами противомикробного действия. Лишайники и их многочисленные вторичные метаболиты рассматриваются в качестве перспективных источников таких соединений [Srivastava P. et al., 2013]. Работы по исследованию антибактериальной активности лишайников интенсивно проводятся в последнее десятилетие в ряде европейских стран [1, 4, 6, 10, 11]. Среди огромного видового разнообразия лишайников только относительно небольшое их количество (не более 70 — 100 видов) было скринировано на присутствие антимикробных свойств, при этом более чем у половины исследованных видов такие свойства удавалось выявить.

Цель исследования — изучение спектра и выраженности антибактериальных и противогрибковых свойств у видов лишайников, широко представленных в лишенофлоре Беларуси.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из более чем 600 видов лишайников, встречающихся на территории Беларуси, в исследование включены 5 наиболее распространенных видов с хорошо описанным составом вторичных метаболитов: *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach., *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot.

Слоевища лишайников отбирали в июле 2015 г. на типичных для каждого вида субстратах. Сбор эпифитных видов (*H. physodes*, *X. parietina*, *E. prunastri* и *R. pollinaria*) производился на высоте 1,3 м; отделяли слоевища вместе с фрагментом коры дерева. Массу лишайников отделяли от субстрата и сушили до воздушно-сухого состояния. Эпигейный лишайник *C. arbuscula* собирали на почве в сухом средневозрастном сосняке. Массу лишайника сушили до воздушно-сухого состояния, тщательно выбирали лиственной и хвойный опад, другие растительные остатки, при сушке удаляли остатки почвы, отбрасывали нижнюю часть слоевища — около 5 мм.

Для извлечения вторичных метаболитов воздушно-сухую массу лишайников измельчали при помощи лабораторной мельницы. Навеску 50 г воздушно-сухого измельченного лишайника помещали в патрон из фильтровальной бумаги, извлечение проводили ацетоном в аппарате Сокслета на протяжении 6 часов при температуре, не превышающей температуру кипения растворителя. После фильтрации растворитель испаряли при комнатной температуре. Выход ацетоновых экстрактов (в пересчете на сухую массу) составил для *H. physodes* — 11,8%, *X. parietina* — 9,2%, *E. prunastri* — 12,2%, *R. pollinaria* — 9,9%, *C. arbuscula* — 13,7%.

В панель микроорганизмов для тестирования включены 13 эталонных штаммов из Американской коллекции типовых культур (ATCC), из них 5 штаммов грамположительных бактерий (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. casseliflavus* ATCC 700327, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538, *S. saprophyticus* ATCC ВАА-750), 4 штамма грамотрицательных бактерий (*Enterobacter hormaechei* ATCC 700323, *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 17666) и 4 штамма грибов рода *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 14053, *C. albicans* ATCC 90029, *C. parapsilosis* ATCC 22019). Дополнительно в исследование включены 6 клинических изолятов грамотрицательных неферментирующих бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам (*P. aeruginosa* G-150, *S. maltophilia* 20014-163, *S. maltophilia* 20014-

279, *S. maltophilia* 20014-283, *S. maltophilia* 2014-785, *S. maltophilia* 2014-1262).

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) экстрактов определяли методом микроразведений в стерильных полистироловых плоскодонных 96-луночных планшетах (Sarstedt, Германия). Сухие ацетоновые экстракты растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO), концентрация экстракта в DMSO — 20 мг/мл. Далее из раствора в DMSO готовили двукратные серийные разведения экстрактов в бульоне Мюллера-Хинтона (BD, США) и в бульоне Сабуро (HiMedia, Индия) в диапазоне концентраций от 500 до 4 мкг/мл. Для улучшения визуализации в бульоны предварительно был внесен метаболический индикатор — трифенилтетразолия хлорид в концентрации 200 мкг/мл. Поскольку DMSO, используемый в качестве первичного растворителя для экстрактов, имеет собственную антибактериальную активность, в предварительном исследовании было показано, что в используемых концентрациях (не более 5%) он не подавляет рост всех включенных в исследование культур. Из суточных культур тестируемых микроорганизмов, выращенных на ГРМ-агаре (бактерии) или агаре Сабуро (грибы), в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия готовили бактериальные суспензии с оптической плотностью 0,5 МакФарланд ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). По 1,5 мкл полученной суспензии вносили в лунки планшета, содержащие по 150 мкл серийных разведений экстрактов лишайников. Последнюю лунку, содержащую 150 мкл питательной среды и 1,5 мкл микробной суспензии, использовали в качестве контроля роста.

Планшеты инкубировали в шейкере-термостате 18 ч, 35°C (бактерии) или 48 ч, 38°C (грибы) с постоянным низкоамплитудным встряхиванием 90 об./мин. Учет МПК проводили по отсутствию видимого роста микроорганизмов, сравнивая опытные и контрольные лунки, а также лунки с инокулированной питательной средой. Для определения минимальных бактерицидных концентраций (МБК) выполняли высев 10 мкл содержимого каждой лунки на сектор плотной питательной среды (ГРМ-агар для бактерий или агар Сабуро для грибов). После 24-часовой инкубации оценивали рост микроорганизмов, минимальную концентрацию, предотвращающую микробный рост, указывали как МБК.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты определения МПК экстрактов лишайников представлены в табл. Отмечена выраженная антибактериальная активность экстрактов

МПК экстрактов лишайников для бактерий и грибов

Микроорганизмы	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл			
	<i>E.prunastris</i>	<i>H.physodes</i>	<i>C.carbuscula</i>	<i>R.pollinaria</i>
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	250	62	31	250
<i>E.casseliflavus</i> ATCC 700327	250	62	62	125
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	250	62	62	250
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	500	62	62	250
<i>S.saprophyticus</i> ATCC BAA-750	250	125	31	125
<i>E.hormaechei</i> ATCC 700323	>500	>500	>500	>500
<i>E.coli</i> ATCC 25922	>500	>500	>500	>500
<i>Paeruginosa</i> ATCC 27853	>500	>500	>500	>500
<i>Paeruginosa</i> G-150	>500	>500	>500	>500
<i>S.maltophilia</i> ATCC 17666	250	125	125	250
<i>S.maltophilia</i> 2014-163	250	250	500	>500
<i>S.maltophilia</i> 2014-279	500	500	>500	>500
<i>S.maltophilia</i> 2014-283	250	250	500	>500
<i>S.maltophilia</i> 2014-785	>500	500	>500	500
<i>S.maltophilia</i> 2014-1262	500	250	500	>500
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	500	>500	>500	>500
<i>C.albicans</i> ATCC 14053	500	>500	>500	>500
<i>C.albicans</i> ATCC 90029	500	>500	>500	>500
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	500	>500	>500	>500

Примечание. Экстракт *X. parientina* не был активен в отношении всех тестируемых микроорганизмов (МПК >500).

H. physodes и *C. arbuscula* в отношении стафилококков и энтерококков (МПК 31 — 62 мкг/мл), экстракт *R. pollinaria* был активен против них в концентрациях 125 — 250 мкг/мл. Антимикробная активность в отношении штаммов энтеробактерий и *P. aeruginosa* отсутствовала в тестируемом диапазоне концентраций у всех экстрактов. Выявлена активность экстрактов *E. prunastri*, *H. physodes* и *C. arbuscula* (МПК 250 — 500 мкг/мл) в отношении всех штаммов *S. maltophilia*. Экстракт *X. parietina* не был активен в отношении всех тестируемых микроорганизмов. Противогрибковая активность (МПК 500 мкг/мл для всех штаммов *Candida*) выявлена только для экстракта *E. prunastri*.

МБК для большинства экстрактов с выявленной антимикробной активностью были равны МПК или отличались от нее не более чем на 1 разведение, что свидетельствует о преимущественно бактерицидном действии комплекса содержащихся в экстрактах вторичных метаболитов лишайников на микробную клетку.

ОБСУЖДЕНИЕ

Противомикробная активность экстрактов лишайников проявлялась главным образом в отношении грамположительных бактерий, что согласуется с результатами ранее проведенных исследований. Показан преимущественно бактерицидный характер антимикробного действия. Антибактериальная активность была выражена сильнее, чем противогрибковый эффект. Это согласуется с результатами ранее проведенных исследований [5, 8] и может быть обусловлено значительными отличиями в строении клеточной стенки бактерий и грибов, а также различной ее проницаемостью для антибактериальных компонентов экстрактов.

Заслуживает особого внимания выявленная антимикробная активность экстрактов *E. prunastri*, *H. physodes* и *C. arbuscula* в отношении *S. maltophilia* — грамтрицательной неферментирующей бактерии с природной устойчивостью к большинству антибиотиков. Ранее противомикробная активность экстрактов лишайников и их отдельных компонентов многократно тестировалась на большом количестве эталонных и клинических штаммов микроорганизмов из различных таксономических групп, включая грамтрицательные неферментирующие микроорганизмы, однако данные по чувствительности штаммов *S. maltophilia* отсутствуют в доступной литературе. Увеличение частоты выделения *S. maltophilia* из клинического материала при внутрибольничных инфекциях и от амбулаторных пациентов документировано в большом количестве публикаций. Непрерывно расширяется разнообразие клинических форм инфекций, ассоциированных с *S. maltophilia* (бактериемия и сепсис, поражения дыхательных и мочевых путей, раневые инфекции, эндокардиты, инфекции центральной нервной системы). В связи с множественной лекарственной устойчивостью клинических штаммов *S. maltophilia* возможность выбора химиотерапевтических препаратов для лечения инфекций, вызванных этим микроорганизмом, крайне ограничена [3]. В этой связи, лишайники можно рассматривать как возможный источник получения антимикробных соединений с антистенотрофомонадной активностью.

Чувствительность стенотрофомонад к экстрактам из *H. physodes* и *C. arbuscula* характеризовалась штаммовой специфичностью (отличия МПК в 2 — 4 раза для различных клинических изолятов *S. maltophilia*). По этой причине для получения сопоставимых данных по антибактериальной активности в

различных исследованиях необходимо включать в панель тестируемых микроорганизмов преимущественно эталонные штаммы из международных коллекций.

Направлением дальнейших исследований может стать выделение, очистка и изучение спектра антибактериальной активности отдельных вторичных метаболитов, входящих в состав *H. physodes* и *C. arbuscula*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Basile A., Rigano D., Loppi S. et al. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16 (4): 7861-7875.
2. Boustie J., Grube M. Lichens — a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant. Genet. Resour.* 2005, 3: 273-278.
3. Chang Y.T., Lin C.Y., Chen Y.H., Hsueh P.R. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front. Microbiol.* 2015, 6: 893.
4. Grujicic D., Stosic I., Kosanic M. et al. Evaluation of in vitro antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *Cetraria islandica*. *Cytotechnology.* 2014, 66 (5): 803-813.
5. Gulluce M., Aslan A., Sokmen M. et al. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine.* 2006, 13 (7): 515-521.
6. Kosanic M., Manojlovic N., Jankovic S. et al. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuracea* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food. Chem. Toxicol.* 2013, 53: 112-118.
7. Kosanic M., Rankovic B., Stanojkovic T. et al. Biological activities and chemical composition of lichens from Serbia. *EXCLI J.* 2014, 13: 1226-1238.
8. Mitrovic T., Stamenkovic S., Cvetkovic V. et al. *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. *EXCLI J.* 2014, 13: 938-953.
9. Oksanen I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 73 (4): 723-734.
10. Rankovic B., Mistic M., Sukdolac S. Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Br. J. Biomed. Sci.* 2007, 64 (4): 143-148.
11. Studzinska-Sroka E., Holderna-Kedzia E., Galanty A. et al. In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds isolated from *Cladonia uncialis*. *Nat. Prod. Res.* 2015; 29 (24): 2302-2307.

Поступила 05.09.16

Контактная информация: Тапальский Дмитрий Викторович, к.м.н.,
246050, Беларусь, Гомель, ул. Ланге, 5

Г.Б.Алексамян¹, Э.А.Ахматова², Н.К.Ахматова²,
Е.А.Курбатова², Д.Н.Панченков¹, В.В.Зверев²

БАЛАНС Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 ЦИТОКИНОВ В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ У ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ПЕЧЕНИ

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова, ²НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Оценка цитокинового статуса у пациентов со злокачественными опухолями печени, перенесшими оперативное вмешательство. *Материалы и методы.* В исследование включены 33 пациента от 35 до 76 лет. Забор крови осуществляли перед операцией и в послеоперационном периоде: через 6, 24 часа и на 7 сутки. Оценивали цитокиновый профиль (IL-1b, IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-9, IL-17a, IL-22) с помощью тест-системы Multiplex-13 (Bender MedSystems, Австрия). *Результаты.* Уровень всех исследуемых цитокинов (Th1/Th2/Th9/Th17/Th22) у больных был повышен уже до операции, что свидетельствует о наличии воспалительного процесса, связанного с активацией эффекторов иммунной системы. *Заключение.* Дисбаланс системы цитокинов хелперных клеток, приводящий к функциональным и органическим нарушениям через индукцию «цитокинового шторма», может усугублять состояние этих пациентов. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, направленные на коррекцию системы цитокинов у больных данного профиля.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 66—74

Ключевые слова: цитокины, злокачественные опухоли печени

G.B.Aleksanyan¹, E.A.Akhmatova², N.K.Akhamtova²,
E.A.Kurbatova², D.N.Panchenkov¹, V.V.Zverev²

BALANCE OF Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 CYTOKINES IN POST-OPERATION PERIOD IN PATIENTS WITH MALIGNANT TUMOR OF LIVER

¹Evdokimov Moscow State Medical-Stomatological University, ²Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Evaluate cytokine status in patients with malignant liver cells after surgery. *Materials and methods.* 33 patients aged 35 to 76 years were included into the study. Blood was obtained before the operation and in the post-operation period: after 6 and 24 hours and at day 7. Cytokine profile (IL-1b, IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-9, IL-17a, IL-22) was evaluated using Multiplex-13 system (Bender MedSystems, Austria). *Results.* In patients levels of all the studied cytokines (Th1/Th2/Th9/Th17/Th22) were already increased before the operations, that gives evidence of the presence of an inflammatory process connected with activation of immune system effectors. *Conclusion.* Disbalance of cytokine system helper cells resulting in functional and organic alterations through induction of the “cytokine storm” may aggravate the state of these patients. Further studies on the correction of cytokine system in these patients are thus needed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 66—74

Key words: cytokines, malignant tumors of liver

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в большинстве стран проблемы хирургической гепатологии вышли на первый план. Однако резекции печени по-прежнему ассоциируются с частыми послеоперационными инфекционными осложнениями. Иммунные реакции после резекций печени могут иметь решающее значение в патогенезе послеоперационных осложнений и потенциальной долгосрочной выживаемости. Важнейшую роль в межклеточных взаимодействиях на уровне врожденного иммунитета, регуляции иммунной дифференцировки Т-лимфоцитов и определении направления развития иммунных процессов играют цитокины.

Цитокины, как правило, не обладают ферментативной активностью и проявляют свои биологические эффекты только после связывания с рецепторами на клетках-мишенях, индуцируя специфические внутриклеточные сигнальные пути. Это приводит к экспрессии либо ингибированию определенных групп генов, кодирующих различные функции клеток (метаболическая активация, пролиферация, рост и дифференцировка, ингибирование деления, апоптоз). Активация гепатоцитов, например, ведет к увеличению синтеза белков острой фазы, в том числе сывороточного амилоида А и маннозосвязывающего белка, которые обеспечивают эффективную опсонизацию бактерий, тем самым способствуя их удалению [2].

Однако защитная роль провоспалительных цитокинов значительно снижается при повреждении уже морфологически измененной печени. Сравнение печени здоровых крыс и крыс, повергнутых хроническому воздействию этанола, выявило у последних уязвимость к летальным сигналам, которые запускаются активацией I типа рецепторов TNF- α . Опосредуемое TNF- α усиление продукции гепатоцитами активных кислородных радикалов приводит к их повреждению [13].

Увеличение продукции острофазных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF- α) необходимо лишь на короткий период, чтобы инициировать рост клеток. Бесконтрольность процесса приводит к стадии острофазового ответа со стимуляцией выработки амилоидных пептидов, угнетению синтеза белка гепатоцитами, ингибированию глюконеогенеза, нарушению митохондриального дыхания и индукции гепатоцеллюлярного апоптоза. Более того, стойкое увеличение уровня провоспалительных цитокинов может приводить к прогрессированию течения цирроза печени и конвертированию звездчатых клеток в коллаген-продуцирующие клетки пораженной ткани либо хронизации процесса при нарушении регуляции [16].

Цитокины регулируют слаженное функционирование практически всех систем в организме — свертывающей, нервной, иммунной, эндокринной, соединительной, костной и мышечной тканей, что обеспечивает удаление микробных антигенов из циркуляции, ограничение очага воспаления и последующую регенерацию. Одним из самых драматичных свойств цитокинов является их плеiotропия, т.е. способность одновременно влиять на несколько признаков [5].

Нормальный ответ на инфекцию либо другой стрессовый фактор является самолимитирующимся процессом, который благодаря преходящей экспрессии регуляторов и эффекторных молекул способствует ликвидации иницирующего сигнала. Неспособность разрешить причинное событие или восстановить баланс провоспалительных и противовоспалительных агентов

приводит к поражению и деструкции тканей, что характеризует хроническое воспаление [18].

Исследования по изучению роли цитокинов в повреждении, поддержании активности воспалительного процесса и регенерации измененной печени в настоящее время немногочисленны.

Целью работы является оценка цитокинового статуса пациентов со злокачественными опухолями печени, перенесшими оперативное вмешательство, в сравнении с контрольной группой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование осуществлялось на базе Московского клинического научно-практического центра Департамента здравоохранения города Москва и НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова. В исследование включены 17 пациентов с опухолями печени различных локализаций от 35 до 76 лет. В контрольную группу вошли 16 практически здоровых лиц. Все исследования выполнены с информативного согласия пациентов.

Забор крови осуществляли натощак в утренние часы в контрольной группе. В основной группе забор крови выполнялся перед операцией и в послеоперационном периоде: через 4 — 6 часов после вмешательства, 24 часа и на 7 сутки соответственно. Цитокиновый профиль оценивали по содержанию про- и противовоспалительных цитокинов: IL-1b, IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-9, IL-17a, IL-22.

Уровень цитокинов в крови определяли методом проточной цитометрии (Cytomix FC-500, Beckman Coulter, США) с помощью тест-системы Multiplex-13 (Bender MedSystems, Австрия). Анализ результатов проводили с использованием программы Statistica 10. Статистическая значимость различий уровня цитокинов между группами оценивали непараметрическими методами исследования с помощью критерия Манна-Уитни. Статистически достоверными считали различия при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень всех цитокинов (за исключением IL-12 и IL-4) у больных как до операции, так и после нее был статистически значимо повышен по сравнению с показателями здоровых лиц.

Уровень IL-1b у больных до операции был повышен в 4,5 раза ($p < 0,05$) сравнительно нормативных значений, после операции содержание данного цитокина постепенно повышалось и достигало уровня 963 ± 209 пкг/мл ($p < 0,05$), что было выше нормы в 7,5 раза, а исходных значений в 1,7 раза ($p > 0,05$).

Концентрация IL-2, обеспечивающего пролиферацию и дифференцировку Th1 клеток, у больных была выше нормы в 1,34 раза (соответственно 556 ± 68 и $114 \pm 35,3$ пкг/мл). Лапаротомия вызывала кратковременное снижение этого показателя на 6 часов (до $502 \pm 101,7$ пкг/мл) с последующим повышением уровня IL-2 через 1 и 7 сутки (соответственно 584 ± 136 и 745 ± 92 пкг/мл).

У больных в дооперационном периоде отмечалось умеренное ($p < 0,05$) повышение IFN- γ (до 87 ± 12 пкг/мл) в сравнении со здоровыми лицами ($55 \pm 4,6$ пкг/мл) и резкое повышение (в 4 раза) уже через 6 часов до 356 ± 162 пкг/мл с последующим достижением максимальных значений (460 ± 213 пкг/мл) на 7 сутки наблюдения.

В отношении IL-12 наблюдалась несколько иная картина. Уровень его у больных в предоперационном периоде несущественно ($p > 0,05$) отличался от

нормальных показателей. Но после хирургического вмешательства резко повышался на 6 час (в 2,3 раза, $236,7 \pm 26,3$ пкг/мл), затем медленно снижался практически до исходного уровня. Таким образом, у больных изначально отмечалось повышение концентраций всех Th1 цитокинов (кроме IL-12). Лапаротомические операции индуцировали повышение этих цитокинов в динамике, которые достигали максимального уровня к концу наблюдения (7 сутки).

Аналогичная картина наблюдалась в отношении Th2 цитокинов. Уровень IL-4 в предоперационном периоде незначимо отличался от показателей здоровых лиц, но после операции происходило постепенное его повышение, которое на 7 сутки наблюдения достигало максимального значения (повышение в 3,9 раза, $589,7 \pm 191$ пкг/мл против $151,3 \pm 72$ пкг/мл до операции).

IL-5 у больных изначально был повышен в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми. Спустя 6 часов после оперативного вмешательства уровень этого цитокина повышался в 1,95 раза (до $1784,6$ пкг/мл), а через 7 суток — в 2,4 раза (до $2231,6$ пкг/мл).

Исходный уровень IL-6 у больных был выше уровня ($p < 0,05$) нормальных показателей в 3,4 раза (соответственно 734 ± 176 пкг/мл против $216,4 \pm 16,8$ пкг/мл). Через 6 часов после операции уровень данного интерлейкина повышался в 1,4 раза и был стабильно высоким в течение всего периода наблюдения (978 ± 150 пкг/мл — 24 ч, $1031,6$ пкг/мл — 7 сут).

В отношении другого противовоспалительного цитокина IL-10 также отмечался его высокий уровень в дооперационный период ($563,5 \pm 139,5$ пкг/мл против $129,9 \pm 14,5$ пкг/мл в контроле) и значительно высокая концентрация в послеоперационный период ($649 \pm 138,7$ пкг/мл — 6 ч, $793,4 \pm 177,6$ пкг/мл — 24 ч, $1215,8 \pm 499$ пкг/мл — 7 сут).

То есть, у больных синтез Th2 цитокинов (IL-5, IL-6 и IL-10) в крови статистически значимо был повышен по сравнению со здоровыми лицами и в динамике наблюдения отмечалось еще более интенсивное его и IL-4 повышение в послеоперационном периоде.

CD4 Т-хелперы — важные медиаторы клеточного иммунного ответа. Предполагается, что эти популяции существуют как дихотомические линии так называемых Th1 и Th2 хелперных клеток. Тип 1 цитокинов включает IL-2, IFN- γ , IL-12 и TNF- α , в то время как тип 2 — IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13. В настоящее время обнаружены и охарактеризованы также и другие субпопуляции эффекторных Т-клеток хелперов: Th17, Th9 и Th22 [9, 12, 17].

Концентрация IL-9 в дооперационный период повышалась в более чем 3 раза ($576,5 \pm 37,6$ пкг/мл против $175,5 \pm 25,7$ пкг/мл в контроле). В последующие сроки постоперационного периода отмечалось ее последовательное повышение до $643,6 \pm 71,7$ пкг/мл на 7 сутки. Аналогичная картина наблюдалась в отношении IL-22, когда его содержание в крови у больных возрастало в 4,7 раза по сравнению со здоровыми ($4671 \pm 747,9$ пкг/мл против $1000 \pm 26,8$ пкг/мл), также существенно повышалось через 6 часов (5031 пкг/мл) и стабильно сохранялось на высоком уровне в последующие сроки наблюдения.

IL-17a в сыворотке крови в предоперационный период у больных был также повышен в 3,8 раза по сравнению с контрольной группой ($236 \pm 83,7$ пкг/мл против $62,2 \pm 5,5$ пкг/мл). После операции его уровень повышался в 2,2 — 2,8 раза (518 пкг/мл — 6 ч, $626,8$ — 24 ч, 658 пкг/мл — 7 сут).

Следует отметить, что уровень всех цитокинов — Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 у больных был повышен уже до операции, что свидетельствует о наличии воспалительного процесса, связанного с активацией эффекторов иммунной си-

Таблица 1. Коэффициенты баланса Th1/Th2, Th1/Th9, Th1/Th17 и Th1/Th22 у больных, перенесших оперативные вмешательства по поводу злокачественных опухолей печени

Время забора крови	IL-1b/ IL-4	IL-1b/ IL-5	IL-1b/ IL-6	IL-1b/ IL-10	IL-1b/ IL-17a	IL-1b/ IL-22	IL-1b/ IL-9
Контроль	0,6	0,3	0,6	0,9	2,0	0,1	0,7
0 ч	0,8 ↑	0,6 ↑	0,8 ↑	1 ↑	2,4	0,1	1 ↑
6 ч	0,7 ↑	0,4 ↑	0,7 ↑	1,1 ↑	1,4 ↓	0,1	1 ↑
24 ч	0,9 ↑	0,3	0,9	1,1 ↑	1,3 ↓	0,2 ↑	1,1 ↑
7 сут	0,9 ↑	0,4 ↑	0,9	0,8 ↓	1,4 ↓	0,2 ↑	1,5 ↑
Время забора крови	IL-2/ IL-4	IL-2/ IL-5	IL-2/ IL-6	IL-2/ IL-10	IL-2/ IL-17a	IL-2/ IL-22	IL-2/ IL-9
Контроль	1,9	0,9	1,9	3,2	6,6	0,4	6,6
0 ч	0,7 ↓	0,6 ↓	0,7 ↓	0,9 ↓	2,3 ↓	0,1 ↓	2,3 ↓
6 ч	0,4 ↓	0,3 ↓	0,5 ↓	0,7 ↓	0,9 ↓	0,1 ↓	0,9 ↓
24 ч	0,6 ↓	0,3 ↓	0,6 ↓	0,7 ↓	0,9 ↓	0,1 ↓	0,9 ↓
7 сут	0,7 ↓	0,3 ↓	0,7 ↓	0,6 ↓	1,1 ↓	0,1 ↓	1,1 ↓
Время забора крови	TNF-α/ IL-4	TNF-α/ IL-5	TNF-α/ IL-6	TNF-α/ IL-10	TNF-α/ IL-17a	TNF-α/ IL-22	TNF-α/ IL-9
Контроль	0,7	0,3	0,7	1,2	2,4	0,1	0,9
0 ч	1,6 ↑	1,3 ↑	1,6 ↑	2,1 ↑	5 ↑	0,2 ↑	2 ↑
6 ч	1,3 ↑	0,7 ↑	1,3 ↑	2,1	2,7 ↑	0,3 ↑	1,9 ↑
24 ч	1,3 ↑	0,6 ↑	1,3 ↑	1,6 ↑	2,1 ↓	0,3 ↑	1,7 ↑
7 сут	1,6 ↑	0,7 ↑	1,6 ↑	1,4 ↑	2,5 ↑	0,3 ↑	2,6 ↑
Время забора крови	IFN-γ/ IL-4	IFN-γ/ IL-5	IFN-γ/ IL-6	IFN-γ/ IL-10	IFN-γ/ IL-17a	IFN-γ/ IL-22	IFN-γ/ IL-9
Контроль	0,2	0,1	0,2	0,4	0,9	0,05	0,3
0 ч	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,01	0,1
6 ч	0,3 ↑	0,12 ↑	0,3 ↑	0,5 ↑	0,7 ↑	0,1 ↑	0,5 ↑
24 ч	0,5 ↑	0,2 ↑	0,5 ↑	0,6 ↑	0,8 ↑	0,1 ↑	0,6 ↑
7 сут	0,4 ↑	0,2 ↑	0,4 ↑	0,4 ↑	0,7 ↑	0,1 ↑	0,7 ↑
Время забора крови	IL-12p70/ IL-4	IL-12p70/ IL-5	IL-12p70/ IL-6	IL-12p70/ IL-10	IL-12p70/ IL-17a	IL-12p70/ IL-22	IL-12p70/ IL-9
Контроль	0,4	0,2	0,4	0,6	1,3	0,08	0,5
0 ч	0,1 ↓	0,1 ↓	0,1 ↓	0,2 ↓	0,4 ↓	0,02 ↓	0,2 ↓
6 ч	0,2 ↓	0,1 ↓	0,2 ↓	0,4 ↓	0,4 ↓	0,05 ↓	0,3 ↓
24 ч	0,2 ↓	0,1 ↓	0,2 ↓	0,2 ↓	0,3 ↓	0,04 ↓	0,2 ↓
7 сут	0,1 ↓	0,1 ↓	0,1 ↓	0,1 ↓	0,2 ↓	0,03 ↓	0,2 ↓

Примечание. ↑ повышение и ↓ снижение коэффициента баланса Th1/Th2/Th9/Th/17/Th22 цитокинов относительно контроля.

стемы. Оперативное вмешательство более интенсивно индуцировало повышение данных цитокинов, приводя к так называемому «цитокиновому шторму», что усугубляло состояние этих пациентов.

По полученным данным были рассчитаны коэффициенты баланса Th1/Th2/Th9/Th/17/Th22 цитокинов у онкобольных с опухолями печени и обследуемых контрольной группы (табл. 1). Коэффициенты рассчитывались как отношения концентрации Th1 и Th2, Th1 и Th9, Th1 и Th17, Th1 и Th22, а также Th2 и Th9, Th2 и Th17, Th2 и Th22 цитокинов, являющихся агонистами:

IL-1b/IL-4, IL-1b/IL-5, IL-1b/IL-6, IL-1b/IL-10, IL-1b/IL-17a, IL-1b/IL-22, IL-1b/L-9, IL-4/IL-17a, IL-4/IL-22, IL-4/IL-9, IL-5/IL-17a, IL-5/IL-22, IL-5/IL-9, IL-6/IL-17a, IL-6/IL-22, IL-6/IL-9, IL-10/IL-17a, IL-10/IL-22, IL-10/IL-9.

Как видно из табл. 1 и 2, был выявлен дисбаланс соотношения пяти типов Т-хелперных клеток. А данные табл. 2 демонстрируют, что значения коэффициентов баланса Th2/Th9/Th17/Th22 типов цитокинов при оперативных вмешательствах на печени у пациентов меняются разнонаправленно относительно контрольной группы.

Поддержание эффективного иммунного ответа при нарушении цитокинового баланса становится невозможным. Увеличение концентрации провоспалительных цитокинов в крови пациентов служит основой для развития Th1/Th9/Th17/Th22 воспалительной реакции при лапаротомических оперативных

Таблица 2. Коэффициенты баланса Th2/Th9, Th2/Th17 и Th2/Th22 у больных, перенесших оперативные вмешательства по поводу злокачественных опухолей печени

Время забора крови	IL-4/IL-17a	IL-4/IL-22	IL-4/IL-9
Контроль	1,2	0,07	0,4
0 ч	0,6 ↓	0,03 ↓	0,3 ↓
6 ч	0,5 ↓	0,05 ↓	0,3 ↓
24 ч	0,5 ↓	0,07	0,4
7 сут	0,9 ↓	0,1 ↑	0,9 ↑

Время забора крови	IL-5/IL-17a	IL-5/IL-22	IL-5/IL-9
Контроль	7,1	0,4	2,5
0 ч	3,9 ↓	0,2 ↓	1,6 ↓
6 ч	3,4 ↓	0,3 ↓	2,4 ↓
24 ч	3,5 ↓	0,5 ↑	2,9 ↑
7 сут	3,4 ↓	0,4	3,5 ↑

Время забора крови	IL-6/IL-17a	IL-6/IL-22	IL-6/IL-9
Контроль	3,5	0,2	1,2
0 ч	3,1 ↓	0,1 ↓	1,3 ↑
6 ч	2 ↓	0,2	1,4 ↑
24 ч	1,6 ↓	0,2	1,3 ↑
7 сут	1,6 ↓	0,2	1,6 ↑

Время забора крови	IL-10/IL-17a	IL-10/IL-22	IL-10/IL-9
Контроль	2,1	0,2	1,2
0 ч	2,4 ↑	0,1 ↓	1,3 ↑
6 ч	1,2 ↓	0,2	1,4 ↑
24 ч	1,3 ↓	0,2	1,3 ↑
7 сут	1,8 ↓	0,2	1,6 ↑

Примечание. ↑ повышение и ↓ снижение коэффициента баланса Th2/Th9, Th2/Th17 и Th2/Th22 цитокинов относительно контроля.

вмешательствах. Это может привести к расширению очага воспаления и повреждению тканей, усилению перекисного окисления липидов и белков, накоплению свободных радикалов, стимуляции апоптоза. Преобладание Th2 цитокинов может свидетельствовать о подключении компенсаторных гуморальных механизмов иммунного ответа.

Как показывают наши исследования, у больных с онкопатологией печени после оперативного вмешательства наблюдается дисбаланс Th1, Th2, Th9 и Th17 и Th22 цитокиновой системы. До начала операции в спектре Th1 цитокинов отмечалась их повышенная концентрация, которая является ключевой провоспалительной составляющей иммунного ответа. TNF-α, синтезируемый преимущественно клетками миеломоноцитарного ряда и играющий важную роль при метаболическом синдроме, оказывает влияние на функционирование эндотелия, продукцию IL-1, IL-6, IL-8, IFN-γ и активацию лимфоцитов. IL-1β, обеспечивая резистентность к патогенам, также может усугублять повреждение тканей при хронических заболеваниях и острой травме [10].

IL-2, оказывая непосредственное воздействие на лимфоциты, приводит к дифференци-

ции некоторых незрелых Т-клеток в регуляторные Т-клетки, которые подавляют аутореактивные клоны. Также под воздействием IL-2 Т-клетки дифференцируются в эффекторные и клетки памяти, тем самым обеспечивая быстрое реагирование иммунной системы на повторное вторжение патогенов [1]. При этом IFN- γ , являясь активатором макрофагов, может вызывать как защитные, так и патологические эффекты. Этот интерферон индуцирует дифференцировку миелоидных клеток костного мозга, в результате которой они приобретают высокоаффинные Fc γ -рецепторы для связывания мономерной формы IgG. IFN- γ активирует и антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), осуществляемую зрелыми гранулоцитами [4].

Важными медиаторами иммунного ответа являются цитокины Th2-типа, включающие IL-4, IL-5 и IL-13, которые ассоциируются с индукцией IgE и эозинофильных ответов при атопии [14], а также IL-10, который характеризуется большей способностью индуцировать противовоспалительный ответ. IL-10, продуцируемый моноцитами/макрофагами, активированными В-клетками и Th1 и Th2 клетками, подавляет синтез Th1 цитокинов, включая IFN- γ , IL-2 и TNF- α с Th1 клетками и IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 и GM-CSF моноцитами/макрофагами. В избытке Th2 ответ противодействует Th1 опосредованному бактерицидному действию [11]. Поэтому для поддержания адекватного иммунного ответа важен баланс ответа Т-хелперов Th1/Th2/Th9/Th17/Th22. Как видно из наших исследований, уровень Th2 цитокинов остался достаточно высоким по сравнению с группой здоровых лиц.

В наших исследованиях в целом по группе больных оперативное вмешательство привело к повышению уровня Th9/Th17/Th22 цитокинов. Известно, что IL-17а продуцируется уникальной субпопуляцией Т-хелперных клеток независимо от Th1/Th2 клеточного развития. Th17 клетки играют роль в защите организма от внеклеточных патогенов посредством «рекрутирования» нейтрофилов и макрофагов в инфицированные ткани. Кроме того, становится очевидным, что aberrантная регуляция Th17 клеток может играть значительную роль в патогенезе многочисленных воспалительных и аутоиммунных нарушений [3].

Th17-клетки продуцируют IL-17, IL-17F и IL-22, тем самым, вызывая массовую реакцию тканей вследствие широкого распространения IL-17 и IL-22 рецепторов. Через секрецию IL-21 Th17 клетки могут взаимодействовать с клетками иммунной системы. Недавно были идентифицированы дифференцировочные факторы (TGF- β плюс IL-6 или IL-21), факторы роста и стабилизации (IL-23), а также транскрипционные факторы (STAT3, ROR γ t и ROR α), участвующие в развитии Th17 клеток. Участие TGF- β в дифференциации Th17 клеток проводит тесную параллель между Th17 и CD4+/CD25+/Foxp3+ регуляторными Т-клетками (T-reg) [15].

Недавно открытая субпопуляция Т-хелперных клеток — Th9. TGF- β , который является критически важным в дифференцировке Th17 клеток, индуцирует реорганизацию Th2 клеток в Th9, которые характеризуются секрецией IL-9. Th9 клетки могут также быть дериватами наивных CD4+ Т-клеток, продуцирующих TGF- β и IL-4. IL-9 является членом общего цитокинового рецептора γ цепь-зависимого семейства цитокинов, которые также включают IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 и IL-21. Благодаря плейотропным эффектам в отношении Th2 лимфоцитов, В лимфоцитов, тучных клеток, эозинофилов, а также эпителиальных клеток кишечника и респираторного тракта Th9 вовлекаются в патогенез астмы и других аллергических заболеваний [6].

IL-22 — член IL-10 цитокинового семейства, который преимущественно

секретируются Th17 клетками. IL-23 и IL-6 могут непосредственно стимулировать наивные Т-клетки к продукции IL-22. Недавно было показано, что IL-22 способен защитить от бактериальной инфекции в легких и кишечнике. Недавно была открыта собственная Т-клеточная популяция, именуемая Th22. Эти клетки инфильтрируют эпидермис у индивидов с воспалительными нарушениями кожи и характеризуются секрецией IL-22 и TNF- α , но не IFN- γ , IL-4 или IL-17 [8].

На тканевом уровне Th цитокины ответственны за развитие воспаления, а затем и за регенерацию тканей. При развитии системной воспалительной реакции цитокины влияют практически на все органы и системы организма, участвующие в регуляции гомеостаза. Попадание цитокинов в кровяное русло, безусловно, означает, что местная защита не справилась с патогеном и требуется включение системной воспалительной реакции для предотвращения распространения патогена и противодействия развитию сепсиса [7].

Однако в наших исследованиях уровень всех про- и противовоспалительных цитокинов у больных был повышен уже до операции в результате физического стресса, обусловленного наличием опухолевого процесса, инфекции или сопутствующей патологии, что свидетельствует о наличии воспалительного процесса, связанного с активацией эффекторов иммунной системы. При этом определялся дисбаланс системы цитокинов хелперных клеток, который может приводить к функциональным и органическим нарушениям через индукцию «цитокинового шторма» и усугублять состояние этих пациентов. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, направленные на коррекцию системы цитокинов у больных данного профиля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balkhi M.Y., Ma Q., Ahmad S., Junghans R.P. T cell exhaustion and interleukin 2 down-regulation. *Cytokine*. 2015, 71 (2): 339-347.
2. Borlak J., Chatterji B., Londhe K.B., Watkins P.B. Serum acute phase reactants hallmark healthy individuals at risk for acetaminophen-induced liver injury. *Genome Med*. 2013, 5 (9): 86.
3. Hasan M., Neumann B., Hauptelshofer S., Stahlke S. Activation of TGF- β -induced non-Smad signaling pathways during Th17 differentiation. *Immunol. Cell Biol*. 2015, 3: 216-223.
4. Hoeksema M.A., Scicluna B.P., Boshuizen M.C. et al. IFN- γ priming of macrophages represses a part of the inflammatory program and attenuates neutrophil recruitment. *J. Immunol*. 2015, 3 (2): 329-335.
5. Holdsworth S.R., Gan P.Y. Cytokines: names and numbers you should care about. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2015, May 4. pii: CJN.07590714.
6. Hoppenot D., Malakauskas K., Lavinskienė S., Bajoriūnienė I. Peripheral blood Th9 cells and eosinophil apoptosis in asthma patients. *Medicina*. 2015, 51 (1): 10-17.
7. Hotchkiss R.S., Sherwood E.R. Immunology. Getting sepsis therapy right. *Science*. 2015, Mar 13; 347 (6227): 1201-1202.
8. Jia L., Wu C. The biology and functions of Th22 cells. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2014, 841: 209-230.
9. Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K. IL-17 and Th17 cells. *Ann. Rev. Immunol*. 2009, 27: 485-517.
10. Lopez-Castejon G., Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011, Aug; 22 (4): 189-195.
11. Muraille E., Leo O., Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front. Immunol*. 2014, 5: 603.
12. Naji N., Smith S.G., Gauvreau G.M., O'Byrne P.M. T helper 17 cells and related cytokines

- after allergen inhalation challenge in allergic asthmatics. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 2014, 165 (1): 27-34.
13. Petrasek J., Iracheta-Vellve A., Saha B. et al. Metabolic danger signals, uric acid and ATP mediate inflammatory cross-talk between hepatocytes and immune cells in alcoholic liver disease. *J. Leukoc. Biol.* 2015, May 1. pii: jlb.3AB1214-590R.
 14. Redpath S.A., Heieis G., Perona-Wright G. Spatial regulation of IL-4 signalling in vivo. *Cytokine.* 2015, 4 (1): 112-116.
 15. Rodríguez-Reyna T.S., Furuzawa-Carballeda J., Cabiedes J. Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: a cross-sectional study. *Rheumatol. Int.* 2012, 32 (9): 2653-2660.
 16. Shi X., Li D., Deng Q. et al. NEFAs activate the oxidative stress-mediated NF- κ B signaling pathway to induce inflammatory response in calf hepatocytes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2015, Jan; 145: 103-112.
 17. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 2007, 13 (2): 139-145.
 18. Xiu F., Catapano M., Diao L. et al. Prolonged er stressed-hepatocytes drives an alternative macrophage polarization. *Shock.* 2015, 5 (2): 125-131.

Поступила 26.09.16

Контактная информация: Ахматова Э.А.,
105064, Москва, М.Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

В.Н.Царев, Е.В.Инполитов, Е.Н.Николаева

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У БИОПЛЕНКО-ФОРМИРУЮЩИХ ШТАММОВ ОБЛИГАТНЫХ И ФАКУЛЬТАТИВНЫХ АНАЭРОБОВ

Московский государственный медико-стоматологический университет

Цель. Сравнительный анализ частоты выявления генетических маркеров устойчивости к антибиотикам, формирующейся у анаэробных бактерий в условиях смешанных биопленок в клинических условиях, и сравнение данных фенотипических и генотипических методов исследования. *Материалы и методы.* Исследовали 66 штаммов бактерий, образующих биопленку, у которых определяли гены резистентности к антибиотикам с помощью ПЦР: *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, и анаэробных патогенов — *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*. Проводили моделирование микробных биопленок *in vitro* и сканирующую электронную микроскопию. *Результаты.* Установлено, что исследуемые штаммы резидентной и патогенной микробиоты имеют гены, кодирующие устойчивость к β -лактамным антибиотикам, карбапенемам, макролидам, тетрациклинам. В результате ПЦР у штаммов выявлены генетические маркеры устойчивости к β -лактамным антибиотикам (STX-M и MECA — цефалоспорины), включая карбапенемы (VIM и NDM, но не Окса-48), гликопептиды (VanA и VanB), макролидам (ERM), тетрациклину (Tet) и плазмиды QNRB — фторхинолонов. *Заключение.* Наиболее часто используемые в стоматологической практике препараты — метронидазол и линкомицин (за последние 20 — 30 лет) показали наибольшее число резистентных штаммов — 52,3 и 22,7% соответственно. Частота выявления генетических маркеров резистентности к другим изученным препаратам не превышала 2,5 — 11,4%. Минимальное количество резистентных штаммов анаэробных бактерий выявлено к карбапенемам и фторхинолонам.

Ключевые слова: генетические маркеры, резистентность к антибиотикам, анаэробные бактерии, биопленки, ПЦР, сканирующая электронная микроскопия

V.N.Tsarev, E.V.Ippolitov, E.N.Nikolaeva

PREVALENCE OF GENETIC MARKERS OF RESISTANCE TO ANTIBIOTICS IN BIOFILM-FORMING STRAINS OF OBLIGATE AND ELECTIVE ANAEROBES

Moscow State Medical-Stomatological University, Russia

Aim. Comparative study of frequency of detection of genetic markers of resistance to antibiotics forming in anaerobic bacteria under the conditions of mixed biofilms in a clinical setting and comparison of data of phenotypic and genotypic methods of study. **Materials and methods.** 66 strains of bacteria forming biofilm with PCR detection of antibiotics were studied: *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and anaerobic pathogens — *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*. Modelling of microbial biofilms *in vitro* and scanning electron microscopy were carried out. **Results.** The studied strains of resident and pathogenic microbiota were established to have genes that code resistance to β -lactam antibiotics, carbapenems, macrolides, tetracyclines. Genetic markers of resistance to β -lactam antibiotics (STX-M и MECA — cephalosporines), including carbapenems (VIM and NDM, but not Oxa-48), glycopeptides (VanA and VanB), macrolides (ERM), tetracycline (Tet) and QNRB plasmids (fluoroquinolones) were detected in strains by PCR. **Conclusion.** The most frequently used preparations in dental practice — metronidazole and lincomycin (for the last 20 — 30 years) have shown the highest number of resistant strains — 52.3 and 22.7%, respectively. The frequency of detection of genetic markers of resistance to other studied preparations did not exceed 2.5 — 11.4%. Minimal quantity of resistant strains of anaerobic bacteria was detected for carbapenems and fluoroquinolones.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 74—80

Key words: genetic markers, resistance to antibiotics, anaerobic bacteria, biofilms, PCR, scanning electron microscopy

ВВЕДЕНИЕ

За последние годы получены принципиально новые данные о механизмах устойчивости к антибиотикам представителей анаэробной микробиоты организма при оппортунистических инфекциях [4, 5]. Если 10 — 15 лет назад считалось, что анаэробная флора обладает высокой чувствительностью к производным имидазола и линкосамидам, то сегодня резистентные штаммы из группы бактероидов, фузобактерий, пептострептококков, клостридий к препаратам этих классов выявляются достаточно часто [2, 5]. Кроме того, в крупных городах неуклонно растет частота выделения полирезистентных штаммов, особенно среди представителей семейства энтеробактерий, некоторые из которых колонизируют полость рта (например, *Klebsiella* spp.) [3, 7, 8].

Масштабное и долгосрочное использование ряда классов антимикробных препаратов привело к появлению и распространению микроорганизмов, реализующих лекарственную устойчивость за счет продукции различных вариантов β -лактамаз ферментов, разрушающих β -лактамы антибиотиков, модификации пенициллин-связывающих белков (ПСБ), являющихся мише-

нями действия для β -лактамовых антибиотиков, а также других достаточно хорошо изученных механизмов для ряда классов современных антибактериальных химиопрепаратов (эфлукс, гидролиз, шунтирующие ферментативные пути и т.п.) [6 — 8].

С другой стороны, по данным ряда отечественных и зарубежных исследователей значительный вклад в формирование резистентности к антибактериальным препаратам вносят адаптационные механизмы микробных популяций, связанные с их персистенцией и формированием микробных биопленок, однако решение данного вопроса находится пока в начальной фазе исследований [1, 2, 9].

Вместе с тем, разработка в нашей стране диагностических наборов для определения генов резистентности с помощью ПЦР (ООО НПФ «Литех», ООО НПФ «ГенЛаб» и др.), которые все шире внедряются в клиническую практику, позволяет в настоящее время быстро и качественно выявлять генетически обусловленную устойчивость микроорганизмов к антибиотикам и способствует выбору адекватной лекарственной терапии.

Совокупность изложенных выше вопросов определила актуальность и явилась основанием для проведения настоящего исследования: провести сравнительный анализ частоты выявления генетических маркеров резистентности к антибиотикам, формирующейся у анаэробных бактерий в условиях смешанных биопленок в клинических условиях, и сравнить данные фенотипических и генотипических методов исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

У больных хроническим генерализованным пародонтитом выделены штаммы факультативно- и облигатно-анаэробных бактерий (свыше 600). Из них было выбрано 66 штаммов, формирующих биопленку *in vitro*, которые были подвергнуты молекулярно-биологическому исследованию. В их числе оказалось 30 штаммов резидентной микрофлоры и 36 анаэробных бактерий пародонтопатогенных видов 1 и 2 порядка.

Моделирование биопленки *in vitro* проводили на твердой подложке из акриловой пластмассы в прогрессивно истощающейся среде в нашей модификации, разработанной совместно с Диденко Л.В. [1] для контроля с помощью сканирующей электронной микроскопии. Образцы полимеров (пластины размером 1x1 см) помещали в питательный бульон LB, в который предварительно засекали культуру бактерий в концентрации 10^6 /мл. Инкубацию образцов проводили при температуре 37°C в течение 1, 2, 7 и 14 суток. Сканирующая электронная микроскопия образцов биопленки на полиакрилатах проводилась с использованием сканирующего электронного двулучевого микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, США) в режиме высокого вакуума в установке SPI-Module Sputter/Carbon Coater System (SPI Inc., США).

Для генетического подтверждения пародонтопатогенов 1 порядка с помощью мультиплексной ПЦР использовали набор МультиДент-5 (ООО НПФ «ГенЛаб», Россия). Маркерные гены пародонтопатогенов 2 порядка определяли с помощью обратной гибридизации ДНК и набора Micro-IDent®plus («Hain Lifescience», Германия).

Определение генетических маркеров резистентности к антибиотикам проводили с помощью мультиплексной ПЦР. В образцах штаммов, выделенных из пародонтальных карманов, выявляли гены *Mec*, *VanA*, *VanB*, *Clx-m*, *Erm*, *Tet* и плазмиды *Qng A* и *B* с помощью ПЦР, используя мультипраймерные наборы

реагентов ООО НПФ «Литех», ООО НПФ «НПФ «Генлаб» соответственно для хромосомных и плазмидных участков (Москва). Выявление устойчивости микробов к антибиотикам проводили с помощью наборов реактивов в комплектации OneStep (ООО НПФ «Литех») для обнаружения генетически обусловленной устойчивости микроорганизмов к антибиотикам методом ПЦР.

Результаты исследования обработаны статистически по методу Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования позволили сформировать группу штаммов — клинических изолятов, у которых проведено исследование фенотипических и генотипических признаков устойчивости к антибактериальным препаратам. Способность к формированию биопленки данными штаммами была проверена с помощью сканирующей электронной микроскопии [1, 2].

В эту группу были включены штаммы биопленкопродуцирующих представителей микрофлоры пародонтального кармана — *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, а также анаэробных внутриклеточных патогенов — пародонтопатогенных видов 1 порядка: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* и 2 порядка — *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*.

В результате молекулярной детекции с помощью ПЦР у перечисленных штаммов были выявлены генетические маркеры резистентности к β -лактамным антибиотикам (СТХ-М и *MecA* к цефалоспорином), включая карбапенемы (VIM и NDM, но не OXA-48), а также к гликопептидам (*VanA* и *VanB*), макролидам (*Erm*), тетрациклинам (*Tet*) и плазмиды *QnrB* (но не *QnrA*, *QnrS*) — к фторхинолонам.

Наиболее часто у представителей резидентной микрофлоры полости рта выявляли ген СТХ-М2, ответственный за резистентность к цефалоспорином-1 (1 типа).

Он выявлен у *S. sanguis* (2 штамма), *S. salivarius* (1 штамм), *Staphylococcus spp.* (2 штамма), *E. faecalis* (1 штамм), *K. pneumoniae* (1 штамм), *V. parvula* (1 штамм), то есть у 8 из 30 исследованных штаммов (26,6%). Среди пародонтопатогенных видов ген СТХ-М-2 выявлен у *T. forsythia* (1 штамм), *P. gingivalis* (1 штамм), *P. intermedia* (1 штамм), *P. micra* (1 штамм), *S. intermedius* (2 штамма), то есть в 6 из 36 исследованных штаммов (16,7%). Различия в 1,6 раза были статистически достоверны ($p=0,026$).

Другой ген, контролирующей резистентность к цефалоспорином — *Mec-1* выявляли реже — у *S. sanguis* (2 штамма) и *S. aureus* (1 штамм), то есть у 3 из 30 штаммов (10%), а у пародонтопатогенных видов — *T. forsythia* (1 штамм), *P. gingivalis* (1 штамм), то есть у 2 из 36 (5,5%). Различия почти в 2 раза также были статистически достоверны ($p=0,031$).

Как известно, более высокий уровень устойчивости возбудителей связан с генами резистентности к карбапенемам, которые можно разделить на несколько групп. Так, ген VIM был выявлен у 1 штамма *P. aeruginosa* (частота для резидентной флоры — 3,3%) и 1 штамма *P. micra* (частота для пародонтопатогенной флоры — 2,8%).

Другой ген, кодирующий резистентность к карбапенемам 2 типа — NDM выявлен у 1 штамма *K. pneumoniae* (частота для резидентной флоры — 3,3%) и ни в одном случае — у пародонтопатогенных бактерий.

И наконец, третий ген этой группы — OXA-48 не выявлен ни в одном слу-

чае. Таким образом, обсуждая устойчивость к карбапенемам, можно сделать заключение о единичных находках генетических маркеров резистентности среди представителей резидентной и патогенной микробиоты полости рта.

Резистентность к гликопептидным антибиотикам (ванкомицину, тейкопланину) кодируется генами *VanA* и *VanB*. Среди резидентной флоры выявлен 1 штамм *E. faecalis* с геном *VanB*, кодирующим устойчивость энтерококков к ванкомицину (частота 3,3%). Среди пародонтопатогенных видов данный ген не обнаружен, но выявлен 1 штамм с геном *VanA*, кодирующим расширенный спектр как против ванкомицина, так и против гликопептидного препарата нового поколения — тейкопланина (частота 3,3%). Таким образом, обсуждая устойчивость к гликопептидам можно также сделать заключение о единичных находках генов резистентности.

Генетические маркеры группы *Erm*, кодирующие резистентность к макролидам, были выявлены у 5 штаммов резидентной флоры из 30: у *S. sanguis* (1 штамм), *S. salivarius* (1 штамм), *S. aureus* (1 штамм), *E. faecalis* (1 штамм), *K. pneumoniae* (1 штамм), то есть с частотой 16,6%. У пародонтопатогенов несколько реже — *P. gingivalis* (1 штамм), *P. micra* (1 штамм), *S. intermedius* (2 штамма), то есть с частотой 11,1%. Различия в 1,5 раза были статистически достоверны ($p=0,05$).

Генетические маркеры группы *Tet*, кодирующие резистентность к тетрациклам, были выявлены у 7 штаммов резидентной флоры из 30: у *S. sanguis* (1 штамм), *S. epidermidis* (1 штамм), *S. aureus* (1 штамм), *K. pneumoniae* (1 штамм), *P. aeruginosa* (1 штамм), *V. parvula* (2 штамма), то есть с частотой 23,3%. У пародонтопатогенов несколько реже — у 4 штаммов: *T. forsythia* (1 штамм), *P. gingivalis* (1 штамм), *P. micra* (1 штамм), *S. intermedius* (1 штамм), то есть с частотой 11,1%. Различия в 2 раза были статистически достоверны ($p=0,025$).

Плазмидная резистентность к фторхинолонам *QnrB* (но не *QnrA*, *QnrS*) выявлена у 4 штаммов резидентных бактерий: у *S. sanguis* (2 штамма), *K. pneumoniae* (1 штамм), *V. parvula* (1 штамм), то есть с частотой 13,3%, в то время как среди пародонтопатогенных видов — только в 2 случаях: *P. gingivalis* (1 штамм), *S. intermedius* (1 штамм), то есть с частотой 5,5%. Различия более, чем в 2 раза, были статистически достоверны ($p=0,025$).

Следует отметить, что среди выделенных нами культур были штаммы с множественной резистентностью к антибиотикам: *K. pneumoniae* — к 5, *S. aureus*, *S. sanguinis*, *P. gingivalis* — к 4, *Enterococcus faecalis*, *S. intermedius* — к 3 препаратам. Причем частота выявления штаммов с множественной устойчивостью среди резидентных видов составила 13,3% (4 штамма), а пародонтопатогенных — 5,5% (2 штамма). Различия почти в 2,5 раза были статистически достоверны ($p=0,025$).

Основное содержание дальнейшего исследования в этом направлении состояло в сравнении результатов фенотипического определения резистентности к антибактериальным препаратам, полученных диско-диффузионным методом, и детекции соответствующих генов резистентности с помощью ПЦР. Это позволило проследить связь между частотой встречаемости отдельных генетических маркеров резистентности и результатами стандартного метода определения чувствительности у микроорганизмов, формирующих биопленки десен (пародонтальных карманов) при воспалительных заболеваниях пародонта.

Для этого использовали следующие диски: метронидазол, линкомицин, метициллин (ампициллин), амоксициллин+клавуланат натрия, спирамицин,

ванкомицин, тетрациклин (доксциклин), имепенем, ципро- и моксифлоксацин.

Очевидно, что наиболее часто применяемые (за последние 20 — 30 лет) в стоматологической практике препараты — метронидазол и линкомицин продемонстрировали самое высокое число устойчивых штаммов — 52,3 и 22,7% соответственно, причем чувствительных к метронидазолу штаммов было в 3,9 раза меньше, чем устойчивых, а для линкомицина это соотношение приближалось к 1:1.

Количество метициллин-резистентных штаммов составило 11,4%, что коррелировало с выявлением генов резистентности СТХ-М2 у 16,7% штаммов ($r=0,789$; $p=0,032$). При использовании бета-лактамазо защищенных препаратов (амоксиклав) показатель резистентных штаммов снижался до 2,3%, что коррелировало с выявлением гена резистентности у 5,5% штаммов ($r=0,648$; $p=0,022$).

Резистентность к карбапенемам (имепенем) выявлена только у 2,3% штаммов, а ген *VIM* у 2,8%, то есть показана высокая прямая корреляционная зависимость ($r=0,799$; $p=0,01$).

Резистентность к макролидам (спирамицин) выявлена у 13,6% штаммов, а ген *Erm* выявлен у 11,1% штаммов, то есть также показана высокая прямая корреляционная зависимость ($r = 0,764$; $p = 0,01$).

Резистентность к тетрациклинам (доксциклин) выявлена только у 4,6% штаммов, а ген *Tet* — у 11,1% штаммов, то есть статистически достоверная корреляционная зависимость не выявлена ($r=0,234$; $p=0,052$).

Резистентность к гликопептидам (ванкомицин) выявлена у 13,6% штаммов, а гены *VanA* и *VanB* выявлены у 3,3% штаммов, то есть корреляционная зависимость также не выявлена ($r=0,242$; $p=0,056$).

Резистентность к фторхинолонам разных поколений — ципрофлоксацину (2 поколение) и моксифлоксацину (4 поколение) выявлена у 13,6 и 4,6% штаммов соответственно, а плазмиды *QnrV* — у 5,5% штаммов, при этом установлена прямая высокая корреляционная зависимость для моксифлоксацина ($r=0,785$; $p=0,01$).

Таким образом, для большинства изученных антибактериальных препаратов (β -лактамы, карбапенемы, макролиды, фторхинолоны) установлена достоверная взаимосвязь между наличием генов, кодирующих резистентность, и результатами фенотипического метода определения чувствительности. Случаи ее отсутствия (тетрациклины, гликопептиды) могут быть объяснены наличием дополнительных генетических маркеров резистентности, которые не учитывались в нашем исследовании, так как помимо генов *Tet*, *VanA* и *VanB*, отвечающих за устойчивость к данным антибиотикам, возможно ее кодирование другими хромосомными генами и плазмидами.

Полученные данные позволяют сделать заключение о предпочтительном использовании ряда препаратов в комплексном лечении заболеваний пародонта как варианта анаэробной неклостридиальной инфекции. На наш взгляд, к ним могут быть отнесены те антибиотики внутриклеточного действия, к которым определена минимальная частота выявления генетических механизмов резистентности: современные макролиды (klarитромицин, джозамицин), тетрациклины (доксциклин, миноциклин) и фторхинолоны 3 — 4 поколений (левофлоксацин, моксифлоксацин, гемифлоксацин). Применение препаратов этих групп показано не только для терапии в острой фазе заболевания, но и в фазе ремиссии в качестве профилактических курсов.

Что касается других групп антибактериальных препаратов с низкой частотой

той выявления генов резистентности (β -лактамазо защищенные препараты, карбапенемы, ванкомицин), то их целесообразно применять исключительно в период обострения пародонтита, так как они не обладают способностью создавать высокие концентрации в клетках десневого эпителия, фагоцитирующих клетках и тканях пародонта. Применение таких препаратов желательнее проводить в виде ступенчатой терапии, причем второй ступенью назначать пациенту антибактериальный препарат внутриклеточного действия.

Предложенное обоснование, на наш взгляд, позволит оптимизировать существующие схемы применения антибактериальных препаратов в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта, которое в настоящее время, к сожалению, проводится эмпирически и потому дает кратковременный эффект.

Разумеется это не означает ограничения применения β -лактамазо защищенных антибиотиков, карбапенемов, ванкомицина для периоперационной профилактики при амбулаторных хирургических операциях, а также при абсцессах и флегмонах челюстно-лицевой области в послеоперационном периоде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диденко Л.В., Автандилов Г.А., Ипполитов Е.В., Царева Е.В., Смирнова Т.А., Шевлягина Н.В., Царев В.Н. Формирование биопленок на стоматологических полимерных материалах как основа персистенции микроорганизмов при патологии зубов и пародонта. *Эндодонтия Today*. 2015, 4: 13-17.
2. Ипполитов Е.В. Мониторинг формирования микробной биопленки и оптимизация диагностики воспалительных заболеваний пародонта. Автореф. дисс. д.м.н. М., 2016.
3. Прямчук С.Д., Фурсова Н.К., Абаев И.В., Иванова Д.В., Сидоренко С.В., Светоч Э.А., Дятлов И.А. Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным средствам в нозокомиальных штаммах *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. и *Enterobacter* spp., выделенных в России в 2003-2007 гг. *Антибиот. и химиотер.* 2010, 55 (9-10): 3-10.
4. Царев В.Н. Лабораторная диагностика анаэробной (неклостридиальной) инфекции. В: *Руководство по медицинской микробиологии*. Под ред. А.С.Лабинской, Н.Н.Костюковой. М., Бином, 2013.
5. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д. Нейтрофилы и бактериальные биопленки: диалектика взаимоотношений. *Журн. микробиол.* 2013, 6: 105-112.
6. Baroud M., Dandache I., Araj G.F. et al. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2013 Jan; 41 (1): 75-79.
7. Flamm R.K. et al. Summary of ceftaroline activity against pathogens in the United States, 2010: report from the Assessing Worldwide Antimicrobial Resistance Evaluation (AWARE) surveillance program. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2012 Jun; 56 (6): 2933-2940.
8. Fursova N.K., Astashkin E.I., Knyazeva A.I., Kartsev N.N., Leonova E.S., Ershova O.N., Alexandrova I.A., Kurdyumova N.V., Sazikina S.Y., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Dyatlov I.A. The spread of blaOXA-48 and blaOXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2015, 14 (1): 46.
9. Lebeaux D., Chauhan A., Rendueles O., Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections pathogens. 2013. 2: 288-356.

Поступила 05.10.16

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

Д.В.Ефременко, И.В.Кузнецова, В.В.Остапович

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ РЕЖИМОВ ЭКСПЛУАТАЦИИ ПРИБОРНОЙ БАЗЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ АТМОСФЕРНОГО ВОЗДУХА НА НАЛИЧИЕ ПАТОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ В МОДЕЛЬНЫХ ОПЫТАХ

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Экспериментально определить оптимальные режимы эксплуатации неспецифического детектора ИВАС, интегрированного с пробоотборником С100, и пробоотборника BioCapture в модельных опытах при работе в различных условиях окружающей среды и при распылении биологического аэрозоля. *Материалы и методы.* Для контроля атмосферного воздуха на наличие патогенных биологических агентов (ПБА) применяли неспецифический детектор ИВАС с пробоотборником С100 и пробоотборник BioCapture. Для приготовления биоаэрозолей использовали штамм *Salmonella typhimurium* 9640 и бычий сывороточный альбумин. *Результаты.* Экспериментально установлено, что оптимально программирование ИВАС на включение биосигнализации при поддержании концентрации биоаэрозоля в атмосферном воздухе выше порогового уровня в течение 10 сек. При данном режиме работы его чувствительность составляет 1×10^3 м.к./мл аэрозоля. Продемонстрирована возможность эксплуатации изучаемой приборной базы в различных условиях окружающей среды внутри и вне помещений. *Заключение.* В результате проведенных опытов доказана эффективность применения неспецифического детектора ИВАС с пробоотборником С100 и пробоотборника BioCapture для мониторинга атмосферного воздуха на наличие ПБА. ИВАС с С100 может использоваться в качестве оборудования поста контроля атмосферного воздуха в период проведения массовых мероприятий, а BioCapture подходит для оснащения групп эпидемиологической разведки.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 81—86

Ключевые слова: детектор биологических аэрозолей, пробоотборник воздуха, патогенные биологические агенты, массовые мероприятия, пост контроля атмосферного воздуха

D.V.Efremenko, I.V.Kuznetsova, V.V.Ostapovich

DEFINITION OF THE OPTIMUM MODES OF OPERATION OF AIR-MONITORING INSTRUMENTATION FOR DETECTION OF PATHOGENIC BIOLOGICAL AGENTS IN MODEL EXPERIMENTS

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. To experimentally define the optimum modes of operation of the nonspecific detector IBAC integrated with C100 sampler and BioCapture sampler in model experiments during the work in various environmental conditions and at dispersion of the biological aerosol. *Materials and methods.* The nonspecific detector IBAC with the C100 sampler and the BioCapture sampler were used for air-monitoring test on existence of pathogenic biological agents (PBA). For preparation of the bioaerosols the strain of *Salmonella typhimurium* 9640 and a bull serum albumin were used. *Results.* It is experimentally established that programming of IBAC on turning on the bioalarm system when maintaining concentration of bioaerosol in air above threshold level during 10 sec. is optimum. Its sensitivity makes 1×10^3 m.c./ml of aerosol at this mode. The possibility of operation of air-monitoring instrumentation in various environmental conditions inside and outside is shown. *Conclusion.* As a result of the experiment the effectiveness of usage of the nonspecific detector IBAC with the C100 sampler and

BioCapture sampler for air-monitoring on existence of PBA is proved. IBAC with C100 can be used as an inventory of the station of air-monitoring during the public events, and BioCapture is suitable for equipment of the groups of epidemiological investigation.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 81–86

Key words: detectors of biological aerosols, air sampler, pathogenic biological agents, public events, station of air-monitoring

ВВЕДЕНИЕ

Посты контроля атмосферного воздуха на наличие патогенных биологических агентов (ПБА) — одно из звеньев системы профилактики и реагирования на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера. Особую актуальность использование постов контроля приобретает во время проведения массовых мероприятий, когда возрастает угроза террористических атак с применением биологического аэрозоля [1, 3 – 5].

Принципиальный и важный вопрос — выбор приборной базы для оснащения постов контроля. Исходя из решаемых задач в период массовых мероприятий с целью обеспечения мобильности нами ранее было предложено использовать небольшие по габаритным размерам и весу неспецифический детектор биологических аэрозолей IBAC, интегрированный с пробоотборником атмосферного воздуха C100, и пробоотборник атмосферного воздуха BioCapture [1, 2]. Для внедрения и применения в системе эпидемиологического надзора данного оборудования необходимо изучение его характеристик при различных условиях работы и распылении ПБА, определение оптимальных режимов эксплуатации.

Цель — экспериментально определить оптимальные режимы эксплуатации неспецифического детектора IBAC, интегрированного с пробоотборником C100, и пробоотборника BioCapture в модельных опытах при работе в различных условиях окружающей среды и при распылении биологического аэрозоля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для приготовления биологических аэрозолей использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) и штамм *Salmonella typhimurium* 9640. Чашки Петри с агаром Хоттингера (рН 7,2) с культурой *S. typhimurium* инкубировали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 1 сут. Приготовление микробных взвесей проводили по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ОСО 42-28-59-86П).

Для распыления аэрозоля использовали аэрозольный генератор САГ-2М (ООО «Центр ветеринарного обеспечения»), компрессор Fubag GMB Mod. OL 231-24 CM 2. Для контроля атмосферного воздуха на наличие ПБА применяли неспецифический детектор IBAC с пробоотборником C100 в комплекте (FLIR Systems, США) — 2 шт., пробоотборник BioCapture в комплекте (FLIR Systems, США).

Распыление аэрозоля с ПБА проводили в камере бокса микробиологической безопасности III класса объемом $0,5 \text{ м}^3$, где размещалось необходимое оборудование и материалы: 2 неспецифических детектора IBAC с пробоотборником C100; один из них был запрограммирован на включение биосигнализации при поддержании концентрации биологического аэрозоля в атмосферном воздухе выше порогового уровня в течение 10 сек. (время отклика), другой

— в течение 60 сек.; пробоотборник BioCapture; чашки Петри с агаром Хоттингера (рН 7,2) — 5 шт. (перед распылением аэрозоля крышки с чашек Петри были сняты); емкость с закрытой крышкой, в которую помещались флаконы с раствором для концентрирования пробы аэрозоля и промаркированные флаконы для пробы к пробоотборнику С100; в шлюзе находился поддон для переноса проб.

После распыления крышки чашек Петри закрывали. Проводилась первичная обработка всех поверхностей дезраствором и включалась вытяжная вентиляция на 10 мин. Из пробоотборников С100 и BioCapture извлекали пробы в соответствии с инструкциями к приборам. Все флаконы и чашки Петри обрабатывались двукратным протиранием с интервалом 15 мин. 0,1% раствором Хлормисепт-Р, затем помещались на поддон, размещенный в шлюзе и переносились в бокс биологической безопасности II класса, где осуществлялась дальнейшая работа.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью специализированного программного обеспечения, поставляемого в комплекте с ИВАС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения влияния факторов окружающей среды на работу неспецифического детектора ИВАС прибор тестировался внутри помещения при температуре $(24 \pm 4)^\circ\text{C}$, а также вне помещений при температуре $(2 \pm 1)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(95 \pm 2)\%$; при температуре $(5 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(80 \pm 2)\%$; при температуре $(9 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(65 \pm 2)\%$. ИВАС программировали на включение биосигнализации при поддержании концентрации аэрозоля в атмосферном воздухе выше пороговой последовательно в течение 10, 20, 30, 40, 50 и 60 сек.

В ходе эксперимента не было определено превышения порогового уровня величин ни по одному из показателей измерения: присутствие частиц диаметром до 1,5 мкм, присутствие частиц диаметром более 1,5 мкм, присутствие биологических частиц.

Таким образом, при эксплуатации ИВАС внутри и вне помещений при различных показателях температуры окружающей среды и влажности атмосферного воздуха отсутствовали ложноположительные результаты, что может свидетельствовать о возможности его использования на объектах при разных метеоусловиях.

Для определения оптимальных режимов эксплуатации ИВАС, интегрированного с пробоотборником С100, и пробоотборника BioCapture из культуры микробных клеток штамма *S. typhimurium* 9640 готовили микробную взвесь в дистиллированной воде в концентрации 1×10^9 м.к./мл. Конечный объем для данного разведения — 50 мл.

Распыление аэрозоля (50 мл) проводили в течение 1 мин. Неспецифический детектор ИВАС, запрограммированный на время отклика 10 сек., сработал через 30 сек. после начала распыления. Автоматический отбор пробы воздуха продолжался в течение 2 мин. ИВАС, запрограммированный на время отклика 60 сек., не сработал. Во время работы биосигнализации аэрозоль имел следующие характеристики: общее число аэрозольных частиц — $0,6 - 0,9 \times 10^6$ на 1 л обследуемого воздуха, при этом количество флуоресцирующих частиц составило $0,1 - 0,6 \times 10^6$ частиц на 1 л, $73,5 \pm 3,5\%$ подсчитанных аэрозольных частиц имели размеры от 1,5 до 10 мкм.

Пробоотборник BioCapture был запущен вручную через 40 сек. после на-

чала распыления. Отбор пробы воздуха продолжался в течение 2 мин. 30 сек. с концентрированием пробы в жидкости в течение последующих 2 мин. 30 сек.

Были сделаны посевы отобранных проб с помощью С100 и BioCapture в объеме 0,1 мл на чашки Петри с агаром Хоттингера (рН 7,2), которые затем поместили в термостат при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 24 ч. Через сутки инкубации на всех чашках с посевами как выполненных из отобранных проб с помощью С100 и BioCapture, так и контрольных, размещенных во время распыления в боксе биологической безопасности III класса, наблюдался сплошной (сливной) рост.

При исследовании нативных проб, отобранных с помощью пробоотборников С100 и BioCapture, и проб, приготовленных из посевов с культурами микроорганизмов, методом ПЦР во всех случаях была обнаружена ДНК *Salmonella* spp.

В результате проведенного испытания неспецифического детектора ИВАС, интегрированного с пробоотборником С100, и пробоотборника BioCapture установлено: ИВАС обеспечивает проведение мониторинга атмосферного воздуха на наличие ПБА в режиме реального времени; при превышении в контролируемой зоне концентрации ПБА выше порогового уровня в зависимости от запрограммированного времени отклика у ИВАС автоматически включается биосигнализация и с помощью С100 осуществляется отбор пробы воздуха; программирование ИВАС на время отклика 60 сек. не позволило обнаружить присутствие биологического аэрозоля в атмосферном воздухе; в отобранных пробах с помощью пробоотборников С100 и BioCapture методом ПЦР обнаружена ДНК *Salmonella* spp., в посевах получена культура возбудителя.

Таким образом, продемонстрирована возможность применения испытуемого оборудования для мониторинга атмосферного воздуха на наличие биологического аэрозоля с последующей специфической индикацией и выделением культуры патогена в условиях лаборатории. Однако программирование ИВАС на время отклика 60 сек. может привести к ложноотрицательным результатам определения ПБА в атмосферном воздухе.

Дальнейшей задачей была оценка пороговой чувствительности неспецифического детектора ИВАС. Для этого из культуры микробных клеток штамма *S. typhimurium* 9640 готовили микробную взвесь в дистиллированной воде в разведениях от 1×10^4 м.к./мл до 1×10^2 м.к./мл. Конечный объем для каждого разведения — 50 мл. Испытания проводили по вышеописанной методике с исследованием отобранных проб методом ПЦР. Используемый в опыте ИВАС был запрограммирован на время отклика 10 сек.

При распылении культуры ПБА в разведении 1×10^2 м.к./мл ИВАС не сработал. При использовании разведений 1×10^3 м.к./мл и 1×10^4 м.к./мл биосигнализация включилась через 34 и 37 сек. соответственно после начала распыления. Автоматический отбор пробы воздуха пробоотборником С100 продолжался в течение 75 сек. в первом случае (разведение 1×10^3 м.к./мл) и 85 сек. во втором (разведение 1×10^4 м.к./мл). При исследовании данных проб методом ПЦР была обнаружена ДНК *Salmonella* spp.

Характеристики распыляемых аэрозолей были следующие: концентрация ПБА 1×10^2 мк/мл — общее число аэрозольных частиц $0,5 - 0,9 \times 10^6$ на 1 л воздуха, число флуоресцирующих частиц в 1 л воздуха $0,05 - 0,1 \times 10^6$, соотношение крупных частиц (более 1,5 мкм) к общему числу частиц $65,0 \pm 5,0\%$; концентрация ПБА 1×10^3 мк/мл — общее число аэрозольных частиц $0,6 - 0,9 \times 10^6$ на 1 л воздуха, число флуоресцирующих частиц в 1 л воздуха $0,1 - 0,45$

$\times 10^6$, соотношение крупных частиц (более 1,5 мкм) к общему числу частиц $73,5 \pm 3,5\%$; концентрация ПБА 1×10^4 мк/мл — общее число аэрозольных частиц $0,6 - 0,9 \times 10^6$ на 1 л воздуха, число флуоресцирующих частиц в 1 л воздуха $0,1 - 0,55 \times 10^6$, соотношение крупных частиц (более 1,5 мкм) к общему числу частиц $73,5 \pm 3,5\%$.

В результате проведенного испытания установлено, что пороговая чувствительность неспецифического детектора ИВАС, запрограммированного на время отклика 10 сек., при распылении ПБА в камере объемом $0,5 \text{ м}^3$ составляет 1×10^3 м.к./мл аэрозоля с возможностью последующей специфической детекции возбудителя методом ПЦР.

Следующей задачей было тестирование ИВАС при работе на открытом пространстве. Для имитации аэрозоля с ПБА использовали раствор БСА. Навеску БСА 4,75 г растворили в 50 мл дистиллированной воды. Конечная концентрация БСА составила 0,095 г/мл.

Для детекции биологического аэрозоля использовали 2 неспецифических детектора ИВАС (один из них был запрограммирован на время отклика 10 сек., другой — 60 сек.). Распыление аэрозоля (50 мл) проводили в течение 1 мин. на открытом пространстве.

В результате ИВАС, запрограммированный на время отклика 10 сек., сработал через 30 сек. после начала распыления, а ИВАС, запрограммированный на время отклика 60 сек. — через 75 сек.

Во время работы биосигнализации распыляемый аэрозоль имел следующие характеристики: общее число аэрозольных частиц $0,8 - 0,9 \times 10^6$ на 1 л обследуемого воздуха; количество флуоресцирующих частиц $0,7 - 0,8 \times 10^6$ на 1 л; $70,0 \pm 20,0\%$ из подсчитанных аэрозольных частиц имели размеры $1,5 - 10$ мкм.

В результате проведенных экспериментов показана эффективность применения неспецифического детектора ИВАС, интегрированного с пробоотборником С100, и пробоотборника BioCapture для мониторинга атмосферного воздуха на наличие ПБА с возможностью последующей специфической индикацией возбудителя в условиях лаборатории. При работе ИВАС внутри и вне помещений при различных показателях температуры окружающей среды и влажности атмосферного воздуха отсутствовали ложноположительные результаты. Экспериментально установлено, что чувствительность ИВАС, запрограммированного на время отклика 10 сек., при распылении жидкости с ПБА в камере объемом $0,5 \text{ м}^3$ составляет 1×10^3 м.к./мл.

Таким образом, испытанное оборудование подходит для решения задач по обнаружению биологического аэрозоля. Неспецифический детектор ИВАС с пробоотборником С100 может использоваться в составе поста контроля атмосферного воздуха в период проведения массовых мероприятий внутри и вне помещений, а пробоотборник BioCapture применяться специалистами из групп эпидемиологической разведки.

Результаты проведенных исследований стали основанием для подготовки предложений по оснащению специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора приборной базой для детекции биоаэрозоля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ефременко Д.В., Зайцева О.А., Кузнецова И.В., Куличенко А.Н. Пост контроля атмосферного воздуха на наличие патогенных биологических агентов и его значение в системе противодействия биологической угрозе. Журн. микробиол. 2014, 1: 80-85.

2. Куличенко А.Н., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Зайцева О.А. Обеспечение готовности специализированных противоэпидемических бригад к работе при проведении массовых мероприятий. Журн. микробиол. 2014, 1: 76-80.
3. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Зайцева О.А., Ефременко Д.В. Опыт стран-организаторов Олимпиад по обеспечению защиты от биологической угрозы. Журн. микробиол. 2014, 1: 70-75.
4. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Малецкая О.В., Таран Т.В., Дубянский В.М., Семенко О.В., Агапитов Д.С., Грижебовский Г.М., Манин Е.А., Клиндухов В.П., Оробей В.Г., Антоненко А.Д. Анализ зарубежного опыта обеспечения биологической безопасности при проведении Олимпийских игр. Журн. микробиол. 2015, 2: 105-109.
5. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Топорков В.П., Смоленский В.Ю., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Современные угрозы и вызовы в области биологической безопасности и стратегия противодействия. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 3: 5-9.

Поступила 25.12.16

Контактная информация: Ефременко Дмитрий Витальевич, к. м. н., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652) 26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

С.И.Семенов, А.И.Федоров, В.Л.Осаковский, С.С.Максимова, Ф.А.Платонов

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА IL28В И ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У НАСЕЛЕНИЯ ЯКУТИИ: КЛИНИЧЕСКИЕ ИСХОДЫ

НИИ здоровья Северо-Восточного федерального университета им. М.К.Аммосова, Якутск

Цель. Изучить клинические исходы у пациентов с хроническим гепатитом С (НСV) в зависимости от генотипа вируса гепатита С и полиморфизма гена IL28В. *Материалы и методы.* Обследованы 592 человека, из них у 75 методом ПЦР определены генотипы РНК НСV. Проведено генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов SNP — rs12979860 (С/Т) и rs8099917 (Т/Г) в гене IL28В методом ПЦР в режиме реального времени. *Результаты.* У 72 обследованных жителей Якутии была выявлена РНК НСV. Генотип 1b НСV определен в 74,2% случаев, 3a — в 11,4%, 1a и 2 — по 5,7%. Частота полиморфного варианта rs12979860 СС составила 72,2%, СТ — 27,8%, полиморфного варианта rs8099917 ТТ — 61,1%, ТГ — 23,2%. *Заключение.* При сочетании НСV 1b с полиморфными вариантами гена IL28В rs12979860 СС и rs8099917 СТ наблюдалось менее агрессивное течение болезни. С другой стороны, при инфицировании вирусом гепатита С с генотипом 3a лиц с полиморфизмом rs12979860 СС или rs809917 ТТ гена IL28В наблюдается более тяжелая клиническая картина. При наличии полиморфных вариантов rs8099917 Т/Г и rs12979860 С/Т наблюдались более тяжелые клинические исходы НСV-инфекции (вирусная нагрузка до 19035212 копий, цирроз с асцитом, гепатокарцинома).

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 86—92

Ключевые слова: вирусный гепатит С, генотип 2, генотип 1b, полиморфизм гена, интерлейкин 28В, гаплотипы СС, ТТ, ТГ

FREQUENCY OF OCCURRENCE OF POLYMORPHIC VARIANTS OF IL28B GENE AND GENOTYPES OF HEPATITIS C VIRUS IN POPULATION OF YAKUTIA: CLINICAL OUTCOMES

Research Institute of Health of Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia

Aim. Study clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C depending on genotype of hepatitis C virus (HCV) and IL28B gene polymorphism. *Materials and methods.* 592 individuals were examined, 75 of those had HCV RNA genotypes determined by PCR. Genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNP) — rs12979860 (C/T) and rs8099917 (T/G) in IL28B gene was carried out by real-time PCR. *Results.* HCV RNA was detected in 72 examined residents of Yakutia. HCV 1b genotype was determined in 74.2% of cases, 3a — in 11.4%, 1a and 2 — 5.7% each. Frequency of polymorph variant rs12979860 CC was 72.2%, CT — 27.8%, rs8099917 TT — 61.1%, TG — 23.2%. *Conclusion.* Combination of HCV 1b with polymorphic variants of IL28B gene rs12979860 CC and rs8099917 CT showed a less aggressive course of the disease. On the other hand, HCV infection of individuals with genotype 3a and polymorphism rs12979860 CC or rs809917 TT of IL28B gene showed a more severe clinical presentation. The presence of polymorph variants rs8099917 T/G and rs12979860 C/T showed more severe clinical outcomes of HCV infection (viral load up to 19035212 copies, cirrhosis with ascite, hepatocarcinoma).

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 86—92

Key words: viral hepatitis C, genotype 2, genotype 1b, gene polymorphism, interleukin 28B, haplotype CC, TT, TG

ВВЕДЕНИЕ

Вирусный гепатит С является одной из актуальных и нерешенных проблем медицины и здравоохранения, что определяется его повсеместным распространением и частым развитием хронических форм заболевания. В мире инфицированы вирусом гепатита С (HCV) более 500 млн человек, что составляет около 10% всего населения нашей планеты. На сегодняшний день «тихая» эпидемия гепатита С охватила многие страны. Установлено, что HCV является причиной 70% случаев хронического гепатита, 40% случаев цирроза печени, 60% случаев гепатоцеллюлярной карциномы [3, 7, 9]. Актуальность и важность дальнейшего исследования проблемы гепатита С обусловлены ростом заболеваемости среди разных этнических групп населения, частое поражение лиц молодого возраста, высокая частота случаев перехода в хроническую стадию с возможным развитием цирроза и первичного рака печени [2, 4].

Республика Саха (Якутия) является одним из регионов Российской Федерации с наименьшей плотностью населения и относится к территориям с умеренной частотой распространения вирусного гепатита С [5]. В Якутии из известных форм гепатита С наиболее распространены генотипы 1b и 3a. В последние годы наблюдается неуклонный рост заболеваемости хроническим вирусным гепатитом С (ХВГ С) среди коренного населения региона, что становится одной из социально значимых проблем республики. Это особенно заметно на фоне успешных иммунопрофилактических мероприятий по снижению заболеваемости вирусным гепатитом В. Эффективность лечения больного ХВГ С снижена ввиду продолжительного и дорогостоящего курса лече-

ния, а также возможности развития вторичных осложнений. В сложившейся ситуации поиск генов организма человека, кодирующих защитные белки против HCV-инфекции, является приоритетной задачей научных исследований в данном направлении. Ген IL28B, кодирующий интерферон лямбда, является одним из искомым генов. Полиморфизм смежных участков данного гена определяет прогноз заболевания и влияет на эффективность лечения гепатита С в зависимости от этнической принадлежности больного. Определение полиморфизма данного гена у больных ХГС позволило бы корректировать тактику и стратегию терапии, что может способствовать значительному снижению риска развития осложнений и соответственно стоимости лечения. Целью данного исследования было изучение клинических исходов у больных ХГС в зависимости от генотипа вируса гепатита С и полиморфизма гена IL28B.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено скрининговое исследование образцов периферической крови 592 жителей Якутии с целью выявления маркеров и РНК вируса гепатита С. По результатам исследования наличие хронического вирусного гепатита С установлено у 72 лиц из числа обследованных. На образцах крови с положительными результатами теста на ХГС проведено генотипирование РНК вируса гепатита С. Группу больных ХГС составили 36 пациентов отделения вирусных гепатитов, в том числе 17 жителей сельской местности республики. Анализ генотипов вируса гепатита С и показателя вирусной нагрузки (число копий вирусной РНК в 1 мл образца) проводился методом ПЦР в лаборатории Центрального НИИ эпидемиологии (Москва). Генотипирование двух SNP — rs12979860 (C/T) и rs8099917 (T/G) гена IL28B в образцах крови больных ХВГ С (n=36) и здоровых людей (n=36) проводился в лаборатории генетических исследований НИИ здоровья Северо-Восточного федерального университета (Якутск). Генотипирование проводили с помощью набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов SNP rs12979860 (C/T) и rs8099917 (T/G) в гене IL28B (кат: г-05-100-ф) производства «ООО ИнтерЛабСервис» (Москва). Исследование проводилось методом ПЦР в режиме реального времени.

Статистический анализ полученных результатов проведен в пакете прикладных программ SPSS 20. Нормальность распределения количественных признаков проверялась при помощи одновыборочного критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения частоты качественных признаков строили таблицы сопряженности с вычислением критерия χ^2 Пирсона. При сравнении средних значений количественных показателей использовали дисперсионный анализ (при нормальном распределении исследуемых показателей). Принимали 5% уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты проведенных нами исследований показали, что в якутской популяции также чаще всего встречается генотип 1b вируса гепатита С (выявлен у 77,2% больных). В то же время, генотип 3a встречается лишь у 11,4% обследованных лиц, а частота встречаемости генотипов 1a и 2 составила всего по 5,7%.

Методом генотипирования установлена частота встречаемости полиморфных вариантов гена IL28B (CC — 72,2%, CT — 27,7%, TT — 61,1% и TG — 23,2%) у представителей якутской популяции.

Таблица 1. Распределение полиморфных вариантов гена IL28B среди больных ХГС и здоровых людей

Группы исследования	Частота полиморфных вариантов гена IL28B											
	rs129979860						rs8099917					
	CC		p	CT		p	TT		p	TG		p
	n	%		n	%		n	%		n	%	
Больные ХГС (n=36)	26	72,2	0,012	10	27,8	0,012	22	73,3	0,017	8	26,7	0,017
Здоровые (n=36)	34	94,4		2	5,6		32	94,1		2	5,9	

Таблица 2. Клинические исходы у больных ХГС при разных вариантах сочетаний вирусных генопов и гаплотипов гена IL28B

Клинические исходы	Генотипы HCV и гаплотипы IL28B		F	p
	1b	3a		
	rs12979860 (C/T)	rs8099917(T/G)		
	n=11	n=4		
Вирусная нагрузка	Низкий уровень (до 600 000 копий РНК/мл)	Высокий уровень (739 321–19 035 212 копий РНК/мл)	—	—
АЛТ, ед/л	170,9±32,6	748,7±204,3	5,4	0,038
Общий белок, г/л	69,9±1,3	72,7±4,2	0,02	0,9
Билирубин, мкмоль/л	36,2±6,3	96,7±34,6	7,4	0,017
Цирроз печени	Не выявлен	Цирроз с проявлениями асцита, варикозного расширения вен пищевода с кровотечением	—	—
Карцинома печени	Не выявлена	Диагноз установлен у 1 больного	—	—

Примечание. F — критерий Фишера, p — уровень статистической значимости.

Результаты исследования распределения полиморфных вариантов гена IL28B, проведенного среди больных ХГС и практически здоровых людей, показали, что в группе здоровых людей генотипы rs129979860 CC (p=0,012) и rs8099917 TT (p=0,017) встречаются значительно чаще, чем в группе больных хроническим гепатитом С (табл. 1).

Проведен сравнительный анализ клинических проявлений хронического вирусного гепатита С при инфицировании генотипами 1b и 3a. При этом обнаружена более высокая вирусная нагрузка с повышенной цитолитической активностью и случаи цирроза печени при инфицировании генотипом 3a (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Геном вируса гепатита С состоит из однонитевой позитивной РНК с выраженной гетерогенностью размером до 10 000 нуклеотидных оснований. В настоящее время установлено существование до 34 генотипов вируса. Наиболее значимыми для практического здравоохранения являются 5 из них. Обозначаются они как 1a, 1b, 2a, 2b и 3a [6]. В Европейской части России в большинстве случаев (до 69,6%) встречается генотип 1b. Частота встречаемости остальных генотипов незначительна. В якутской популяции также чаще всего встречается генотип 1b вируса гепатита С (выявлен у 77,2% больных). В то же время, генотип 3a встречается лишь у 11,4% обследованных лиц, а частота встречаемости генотипов 1a и 2 составила всего по 5,7%.

Известно, что у носителей генотипа rs12979860 CC и rs8099917 TT может произойти спонтанная элиминация вируса, т.е. выздоровление после острого

вирусного гепатита С и последующее исчезновение вируса из организма. У данной группы больных отмечается высокая эффективность противовирусного лечения [11]. С другой стороны, наличие аллели G в rs8099917 ассоциируется с более тяжелыми формами ХГС, и среди носителей данной аллели вероятность неэффективной противовирусной терапии очень высока [10].

Известно, что при наличии полиморфного варианта генотипа rs8099917 ТТ возможно спонтанное излечение от HCV-инфекции вне зависимости от лечения. Кроме того, у больных с данным вариантом исследуемого гена сохраняется вероятность высокой эффективности противовирусной терапии. В исследованной выборке якутского населения наблюдается высокая частота встречаемости полиморфного варианта rs8099917 ТТ (данный вид генотипа встречается у 73,3% больных ХГС и 94,1% здоровых людей).

По мнению ряда авторов, наличие аллельных вариантов гена IL28B — rs12979860 СС и rs8099917 ТТ является фактором, повышающим вероятность благоприятного исхода при HCV-инфекции [Мицура В.М. и др., 2014]. На основании литературных данных и результатов собственных исследований мы провели анализ ассоциации клинической картины хронического гепатита С с частотой полиморфных вариантов гена IL28B в якутской популяции. Результаты показали, что у 100% больных хроническим гепатитом С без цирроза печени встречаются аллельные варианты rs12979860 СС и rs8099917 ТТ.

С другой стороны, у больных ХГС с циррозом печени установлена высокая частота встречаемости генотипов TG/CT и CT, достигающая в сумме 44,5%. Степень тяжести клинических проявлений болезни также отличалась и в зависимости от полиморфизма генов IL28B. При наличии полиморфных вариантов rs8099917 T/G и rs12979860 C/T наблюдались более тяжелые последствия HCV-инфекции. У больных с данным видом генотипа развивалась тяжелая стадия цирроза печени с проявлениями асцита и варикозное расширение вен пищевода с кровотечением. Вирусная нагрузка в указанной группе пациентов колебалась от 739321 до 19035212 копий вирусной РНК в 1 мл крови. Возраст обследованных больных не превышал 48 лет. Исключение составила больная 65 лет с вирусной нагрузкой 19035212 копий вирусной РНК в 1 мл крови. На момент обследования длительность ее заболевания составила 19 лет. Длительность заболевания остальных больных с данным генотипом не превышала восьми лет. По результатам ультразвуковой диагностики, компьютерной томографии и онкотестов АФП, РАЭ, СА19,9 у одного больного из исследуемой группы был установлен диагноз гепатокарциномы. Таким образом, по результатам наших исследований аллель G в rs8099917 ассоциируется с неблагоприятным прогнозом заболевания и высокой вирусной нагрузкой до 19035212 копий вирусной РНК в 1 мл крови. В то же время, наличие полиморфизмов rs12979860 СС и rs8099917 СТ гена IL28B при HCV-инфекции с генотипом Ib, как правило, обуславливает более благоприятное течение заболевания. С другой стороны, при инфицировании вирусом гепатита С с генотипом 3a лиц с полиморфизмом rs12979860 СС или rs809917 ТТ гена IL28B наблюдается более тяжелая клиническая картина.

Аналогичные с полученными нами результатами данные о преобладании частоты встречаемости генотипа rs12979860 СС у здоровых людей по сравнению с больными ХГС приводятся в работе [8]. В разных популяциях мира полиморфные варианты генотипа rs12979860 распределены неравномерно [1]. По литературным данным частота встречаемости полиморфного варианта

rs12979860 CC в мировой популяции варьирует от 16 до 39%, а rs12979860 CT — в пределах 48 — 49%.

В якутской популяции частота полиморфного варианта rs12979860 CC составила 72,2%, CT — 27,8%. В мировой популяции вариант TT данного генотипа встречается всего в 10,1 — 36,0% случаев.

Представляется важным, что у больных с HCV 1b и полиморфными вариантами гена IL28B rs12979860 CC и rs8099917 CT показатели цитолиза клеток (АЛТ) лишь вдвое превышали норму, что свидетельствует о менее агрессивном течении болезни.

На основании результатов анализа клинических исходов у больных ХГС с разными аллельными вариантами гена IL28B, инфицированных HCV с генотипами 1b и 3a, можно предположить, что иммунная система носителей аллелей rs12979860 C/T способна подавлять вирус гепатита С с генотипом 1b. С другой стороны, наличие аллели rs8099917(T/G) у больных ХГС, инфицированных HCV 3a, сопряжено с развитием таких тяжелых клинических исходов как гепатокарцинома и цирроз печени. Также в образцах крови данной группы больных установлен высокий уровень вирусной нагрузки и онкомаркеров АФП РАЭ, СА19,9. Данное наблюдение свидетельствует о важности проведения генетических исследований наряду с другими лабораторными тестами при обследовании больных ХГС. Следует отметить, что наибольшее значение полиморфизм гена IL28B приобретает при инфицировании больных HCV с генотипами 1b и 3a, а также, что результаты исследования полиморфизма гена IL28B могут иметь важное прогностическое значение при заболевании вирусным гепатитом С.

Таким образом, по результатам наших исследований установлена возможная ассоциация полиморфизма гена IL-28B (rs12979860 и rs8099917) со степенью тяжести поражений печени у больных ХГС. В связи с этим, результаты генетических исследований для определения полиморфных вариантов гена IL28B и генотипов HCV могут служить в качестве одного из важных предикторов для прогноза клинических исходов у больных хроническим вирусным гепатитом С и подбора эффективных методов лечения.

Результаты генетических исследований по установлению генотипов вируса гепатита С (1b, 3a) и полиморфизма гена IL28B на участках rs12979860 (C/T) и rs8099917 (T/G) могут служить в качестве одного из важных предикторов при прогнозе клинических исходов у больных хроническим вирусным гепатитом С.

Разные варианты сочетаний генотипов HCV (1b, 3a) и полиморфных вариантов гена IL28B на участках rs12979860 (CC, CT) и rs8099917 (TT, TG), индивидуальные для каждого больного ХГС, с большой долей вероятности могут влиять на эффективность стандартных методов лечения.

Работа проведена в рамках Государственного задания № 17.6344.2017/БЧ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акимов И.А., Прасолова М.А., Иванов М.К. Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов в регионе, прилежащем к гену IL28B, методом ПЦР с анализом кривых плавления. *Новости «Вектор-Бест»*. 2014, 2 (72): 2-7.
2. Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Миширо С.И. др. Закономерности распространения вируса гепатита С и его генотипов в России и странах СНГ. *Вопросы вирусологии*. 1997, 4: 157-161.
3. Майер К.-П. Гепатит и последствия гепатита. Под ред. А.А. Шептулина. М., ГЭОТАР-Медиа, 1999.

4. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты в клинической практике. Санкт-Петербург, Теза, 1996.
5. Семенов С.И. Эпидемиологические особенности и клиническая характеристика вирусных гепатитов В, С и дельта в Республике Саха (Якутия). Автореф. дисс. д-ра мед. наук. М., 2007.
6. Учайкин В.Ф., Чередниченко Т.В., Смирнов А.В. Инфекционная гепатология: руководство для врачей. М., ГЭОТАР-Медиа, 2014.
7. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). М., ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003.
8. Mangia A., Thompson A.J., Santoro R. et al. An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology*. 2010, 139: 821-827.
9. Manns M.P. Hepatotropic viruses and autoimmunity. *J. Viral. Hepat.* 1997, 4 (1): 7-10.
10. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M. et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* 2009, 41: 1105-1109.
11. Thomas D.L. et al. Genetic variation in IL28 B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009, 461 (7265): 798-801.

Поступила 10.10.16

Контактная информация: Семенов Сергей Иннокентьевич, д.м.н., Республика Саха (Якутия), 677010, Якутск, Сергеляхское шоссе, 4, корпус С-2, р.т. (411-2)35-32-75

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

С.И.Семенов, А.И.Федоров, С.С.Максимова, К.М.Степанов, Ф.А.Платонов

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В, С, D И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

НИИ здоровья Северо-Восточного федерального университета им. М.К.Аммосова, Якутск

Цель. Оценить иммунный статус у больных хроническим гепатитом (ХГ) в зависимости от типа возбудителя и тяжести инфекционного процесса. *Материалы и методы.* Были обследованы 232 жителя Якутии, из них 127 больных разными формами хронического гепатита и 105 здоровых лиц. Исследован относительный уровень содержания зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов (CD4⁺), Т-супрессоров (CD8⁺), В-лимфоцитов (CD72⁺) и натуральных киллеров (CD16⁺) методом проточной цитометрии, а также концентрации сывороточных иммуноглобулинов классов А, М и G методом ИФА. *Результаты.* У больных хроническими гепатитами разных форм установлено снижение экспрессии на поверхности лимфоцитов дифференцировочных антигенов — CD3⁺, CD4⁺, CD72⁺ и концентрации сывороточных иммуноглобулинов. У больных ХГD в фазе монорепликации высокая активность инфекционного процесса сопровождается сдвигом иммунорегуляторного индекса (ИРИ) в сторону повышения активности цитотоксических клеток с одновременным развитием дефицита зрелых функционально активных Т-лимфоцитов. В группе больных гепатитом D с циррозом печени при снижении численности Т-хелперов и В-лимфоцитов сохраняется нормальная концентрация сывороточных иммуноглобулинов. *Заключение.* У больных различными формами вирусных гепатитов может возникать приобретенный иммунодефицит, часто сопровождаемый усилением активности НК-клеток.

Отмеченное снижение численности зрелых функционально активных Т-клеток, а также основных классов сывороточных антител, возможно, связанное с нагрузкой на иммунную систему при хроническом инфекционном процессе.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 92—97

Ключевые слова: вирусный гепатит, иммунный статус, цитотоксические лимфоциты, иммунодефицитное состояние

S.I.Semenov, A.I.Fedorov, S.S.Maksimova, K.M.Stepanov, F.A.Platonov

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF IMMUNE STATUS OF PATIENTS WITH CHRONIC FORMS OF VIRAL HEPATITIS B, C, D AND HEALTHY INDIVIDUALS

Research Institute of Health of Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia

Aim. Evaluate immune status in patients with chronic hepatitis (CH) depending on type of causative agent and severity of the infectious process. *Materials and methods.* 232 residents of Yakutia including 127 patients with various forms of chronic hepatitis and 105 healthy individuals were examined. Relative levels of mature T-lymphocytes (CD3⁺), T-helpers (CD4⁺), T-suppressors (CD8⁺), B-lymphocytes (CD72⁺) and natural killers (CD16⁺) were studied by flow cytometry, as well as concentration of sera immune globulins of classes A, M and G by ELISA. *Results.* In patients with chronic hepatitis of various forms, a decrease of expression of differentiating antigens — CD3⁺, CD4⁺, CD72⁺ on the surface of lymphocytes and concentration of sera immune globulins was established. In CHD patients in phase of monoreplication high activity of the infectious process is accompanied by a shift of immune regulatory index to the increase of activity of cytotoxic cells with simultaneous development of deficiency of mature functionally active T-lymphocytes. In the group of patients with hepatitis D virus with liver cirrhosis normal concentration of sera immune globulins is retained against the decrease of the number of T-helpers and B-lymphocytes. *Conclusion.* In patients with various forms of viral hepatitis acquired immune deficiency can emerge, which is often accompanied by enhancement of NK-cell activity. The noted reduction of the number of mature functionally active T-cells, as well as main classes of sera antibodies could be connected with immune system load during a chronic infectious process.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 92—97

Key words: viral hepatitis, immune status, cytotoxic lymphocytes, immune deficiency state

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наиболее распространены и относительно хорошо изучены вирусные гепатиты А, В, С и D. Течение любой вирусной инфекции определяется сложным взаимодействием многих факторов врожденного и адаптивного иммунитета. Эффективность элиминации вируса гепатита В (ВГВ) зависит от интенсивности синтеза антител против HBsAg В-лимфоцитами больного [6]. Обезвреживание вируса происходит в результате действия специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), Т-хелперов/индукторов, секретирующих провоспалительные цитокины, включая фактор некроза опухоли α (ФНО α) и γ -интерферон (ИФН- γ), подавляющих экспрессию вирусных генов. Особенностью ВГВ является его способность к внутриклеточной персистенции за счет создания мутантных копий генома, что позволяет ему

ускользнуть от иммунного ответа и выживать в условиях противовирусной терапии [1, 8, 11].

Неспособность вирусного гепатита D (ВГD) к самостоятельной репликации в организме хозяина отличает его от других гепатотропных вирусов. Синтез вирусных белков требует обязательного участия поверхностного белка ВГВ (НВsAg). При активном хроническом гепатите В и D происходит снижение количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов и нарушение иммунорегуляторного индекса ($CD4^+/CD8^+$) [4, 13]. Изменения иммунных механизмов при гепатите D затрагивают как клеточное, так и гуморальное звенья иммунитета, включая системы мононуклеарных фагоцитов и интерфероногенеза. При этом отмечается выраженный дефицит Т-лимфоцитов, нарушение иммунной регуляции за счет сокращения численности супрессорных клеток и развития выраженного клеточного иммунитета к НВsAg, а также подавление интерфероновой реакции лейкоцитов, при всех клинико-морфологических вариантах болезни наблюдается уменьшение продукции ИФН- γ [5].

Отличительной особенностью вирусного гепатита С (ВГС) является его генетическая неоднородность, способствующая длительной циркуляции инфекционного агента в организме хозяина и развитию хронического воспалительного процесса. По мнению ряда исследователей, решающую роль в формировании клинической картины и исхода ВГС-инфекции играет интенсивность Т-клеточного иммунного ответа [9, 10, 12], тогда как эффективность специфических противовирусных антител в элиминации вируса, в связи с его внутриклеточной локализацией, сильно ограничена [14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено сравнительное исследование состояния гуморального и клеточного иммунитета на выборке из 232 жителей Якутии. Группу исследования составили 127 человек с разными формами хронического гепатита, а в группу сравнения вошли 105 здоровых лиц. В лимфоцитарной фракции цельной венозной крови определяли относительный уровень содержания зрелых Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры $CD3^+$, хелперов ($CD4^+$) и супрессоров $CD8^+$, а также В-лимфоцитов ($CD72^+$) и натуральных киллеров ($CD16^+$). В сыворотке крови определяли концентрацию иммуноглобулинов классов А, М и G.

Статистический анализ результатов лабораторных исследований выполнен с помощью пакета статистических программ Statistica 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты сравнительного анализа показали, что у больных вирусным гепатитом регистрируется относительный дефицит зрелых функционально активных Т-лимфоцитов ($CD3^+$) и Т-хелперов ($CD4^+$). В среднем, уровень содержания зрелых Т-клеток у больных хроническим гепатитом В составил $37,9 \pm 1,9\%$, у больных микст-инфекцией (В+D) — $42,3 \pm 2,4\%$, у больных хроническим гепатитом С — $41,6 \pm 2,5\%$, что значительно ниже, чем у здоровых лиц из контрольной группы — $52,5 \pm 1,4\%$. Средний уровень содержания Т-хелперов у больных хроническим гепатитом В (ХГВ) составил $23,9 \pm 1,3\%$, у больных гепатитом В+D — $30,8 \pm 3,1\%$, у больных хроническим гепатитом С (ХГС) — $28,5 \pm 1,9\%$, у здоровых лиц — $32,7 \pm 1,1\%$ ($p=0,002$). С другой стороны, у больных ХГВ, В+D и ХГС регистрируется повышенный уровень содержания натуральных киллеров (НК-клеток) — $15,7 \pm 0,8$; $14,8 \pm 1,1$; $18,5 \pm 1,1\%$ соответственно по сравнению с таковым у здоровых лиц ($11,2 \pm 0,9\%$).

В группе больных ХГВ отмечено снижение средней концентрации иммуноглобулинов класса А, М и G, которая соответственно составила $0,5 \pm 0,1$; $0,7 \pm 0,2$ и $5,8 \pm 1,4$ г/л, что более чем в 2 раза ниже, чем у здоровых — $2,2 \pm 0,1$; $1,4 \pm 0,1$ и $10,7 \pm 0,4$ г/л ($p=0$).

Результаты сравнительного анализа уровня содержания субпопуляций Т-лимфоцитов в крови больных с рекомендованными нормами показали, что в крови у 26% больных ХГВ наблюдается дефицит зрелых Т-лимфоцитов и у 55% повышено содержание НК-клеток. Результаты являются статистически значимыми при $\chi^2=39,9$; $p=0$.

В группе больных с ХГД (n 7) на фоне смешанной репликации вирусов В и D отмечалось значительное (до 1,0) снижение ИРИ ($CD4^+/CD8^+$) по сравнению с таковым у здоровых лиц (1,6) с одновременным сокращением популяции Т-хелперов и В-клеток. Уровень содержания В-лимфоцитов в группе больных в среднем составил $15,5 \pm 3,4\%$ ($p<0,05$). Это почти в 2 раза ниже аналогичного показателя в контрольной группе. В крови больных средние концентрации неспецифических иммуноглобулинов классов А и G были также снижены (IgA — $1,05 \pm 0,4$ г/л, IgG — $6,3 \pm 1,2$ г/л) по сравнению с их нормальным уровнем (IgA — 1,3 — 3,1 г/л и IgG — 7,2 — 20,0 г/л.).

Сравнительный анализ показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных с различной степенью активности хронического гепатита D в фазе монорепликации показал, что число Т-лимфоцитов у этих пациентов, как правило, находится в пределах нормы, за исключением больных с наиболее выраженным вирусиндуцированным воспалительным процессом.

При высокой степени активности инфекционного процесса уровень относительного содержания Т-лимфоцитов составлял: $CD4^+$ — $26,0 \pm 4,0\%$, $CD8^+$ — $26,0 \pm 2,0\%$, что достоверно ниже соответствующих показателей в контрольной группе ($p<0,01$). ИРИ при этом был равен 1,0. При умеренно выраженной активности процесса эти показатели соответственно составляли: $CD4^+$ — $26,4 \pm 4,5\%$, $CD8^+$ — $36,0 \pm 3,0\%$, ИРИ ($CD4^+/CD8^+$) — 0,75. При слабо выраженной активности инфекционного процесса данные показатели соответственно составляли: $CD4^+$ — $37,0 \pm 10,0\%$, $CD8^+$ — $25,5 \pm 5,5\%$ и ИРИ=1,43. Во всех группах исследования, независимо от степени выраженности индуцированного вирусами инфекционного процесса, средние показатели концентрации сывороточных иммуноглобулинов практически не отличались от таковых в контрольной группе.

При умеренно выраженной активности инфекционного процесса чаще всего отмечается экспрессия $CD8^+$, при слабо выраженной инфекции определяющее значение приобретают лимфоциты, экспрессирующие на своей поверхности молекулы $CD4^+$, в число которых входят Th1-клетки, ответственные за развитие иммунного ответа по клеточному типу, секрецию ИЛ-2 и ИФН- γ . Они составляют до 60% от общего количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов.

У 15 больных хроническим гепатитом D, страдающих циррозом печени, отмечалось снижение как относительного, так и абсолютного числа клеток с фенотипом $CD3^+$ ($p<0,001$), $CD4^+$ ($p<0,001$) и $CD70^+$ ($p<0,001$). При этом число цитотоксических Т-лимфоцитов не отличалось от такового у лиц из контрольной группы ($26,1 \pm 2,2\%$ и $36,4 \pm 5,4\%$; $p>0,05$). Наблюдаемая асинхронность изменений численности клеток $CD4^+$ и $CD8^+$ сопровождалась выраженным снижением ИРИ.

У 4 больных, находящихся в нерепликативной фазе, по результатам серологического обследования была диагностирована цитомегаловирусная инфекция. На данной стадии инфекции процентное содержание зрелых

Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов ($69,0 \pm 9,0\%$ и $33,5 \pm 3,5\%$) было сопоставимо с соответствующими показателями у лиц из контрольной группы ($58,0 \pm 7,8\%$ и $26,6 \pm 5,9\%$). Процентное содержание $CD4^+$ - и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, а также ИРИ у представителей данной группы было без особенностей. С другой стороны, у некоторых из пациентов в сыворотке крови была обнаружена высокая концентрация IgM.

Результаты анализа иммунологических показателей продемонстрировали, что у больных хроническим гепатитом D в сочетании с B и C формами заболевания, наблюдается активная репликация ВГС с одновременным подавлением размножения ВГD и ВГВ.

У больных ХГD было зарегистрировано статистически значимое сокращение числа не только различных типов Т-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой: $CD3^+$ — $16,0 \pm 2,0\%$, $CD4^+$ — $17,0 \pm 9,0\%$, $CD8^+$ — $14,5 \pm 5,5\%$ против $58,0 \pm 7,1$; $27,2 \pm 4,6$; $28,6 \pm 9,3\%$ ($p < 0,05$), но и В-лимфоцитов ($CD72^+$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдаемое у больных хроническим гепатитом D снижение экспрессии на поверхности лимфоцитов дифференцировочных антигенов $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD72^+$, а также снижение в сыворотке крови концентрации иммуноглобулинов основных изоформ является достоверным признаком дисфункции клеточного и гуморального иммунитета в фазе смешанной репликации ВГВ и ВГD [3].

На основании результатов сравнительного анализа показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных хроническим гепатитом D в фазе монорепликации можно сделать вывод, что высокая активность инфекционного процесса, как правило, сопровождается сдвигом иммунорегуляторного индекса в сторону повышения активности цитотоксических клеток с одновременным развитием дефицита зрелых функционально активных Т-лимфоцитов.

В группе больных гепатитом D с циррозом печени сокращение численности Т-хелперов и В-лимфоцитов при сохранении нормальной концентрации иммуноглобулинов А, G, и М, очевидно, может указывать на преобладание в субпопуляции Т-лимфоцитов ($CD4^+$) Th2-клеток, ответственных, как известно, за формирование ответа по антительному (гуморальному) типу. Кроме того, характеристики ИРИ, процентного содержания в крови $CD3^+$ и $CD4^+$ лимфоцитов, а также концентрации иммуноглобулинов свидетельствуют о наличии нарушений регуляторных механизмов клеточного иммунитета в данной группе больных [7].

Высокая концентрация IgM у некоторых больных, находящихся в нерепликативной фазе ХГD, по-видимому, связана с реализацией первичного иммунного ответа на цитомегаловирусную инфекцию, которая была продиагностирована по результатам серологического исследования.

Статистически значимое снижение числа различных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов у больных хроническим гепатитом D, возможно, свидетельствует о развитии выраженного иммунодефицита. Это состояние, по-видимому, является следствием истощения функциональных резервов иммунной системы под влиянием вирусной инфекции и характеризуется нарушением процессов пролиферации и дифференцировки лимфоцитов [2].

Таким образом, у больных различными формами вирусных гепатитов может возникать приобретенный иммунодефицит, часто сопровождаемый усилением активности НК-клеток, что, возможно, связано с определяющей ролью

этих клеточных элементов в разрушении и элиминации вирусного агента, имеющего, как известно, внутриклеточную локализацию. Кроме того, у больных гепатитами отмечается значительное снижение численности зрелых функционально активных Т-клеток, в том числе, Т-хелперов, а также основных классов сывороточных антител, связанное, вероятно, с избыточной нагрузкой на иммунную систему при хроническом инфекционном процессе. У больных хронической формой гепатита также обнаружено существенное изменение иммунологической реактивности — увеличение активности ЦТЛ на фоне дефицита зрелых функционально активных популяций лимфоцитов, а также снижение концентрации в крови сывороточных иммуноглобулинов.

Работа проведена в рамках Государственного задания № 17.6344.2017/БЧ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балмасова И.П., Сепиашвили Р.И., Малова Е.С. Молекулярная биология вируса гепатита В и иммунопатогенез хронического вирусного гепатита В. Журн. микробиол. 2016, 2: 119-126.
2. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Цитотоксины мононуклеарных фагоцитозов в регуляции реакции воспаления и иммунитета. Иммунология. 1995, 3: 30-42.
3. Кинго З.Н., Яковлев А.А., Виноградова Е.Н. и др. Иммунологическая характеристика больных вирусными гепатитами. Вирусные гепатиты и другие актуальные инфекции. СПб, 1997.
4. Нечаев В.В., Иванов А.К., Пантелеев А.М. Социально-значимые инфекции. СПб, Береста, 2011.
5. Учайкин В.Ф., Нисевич Н.И., Чередниченко Т.В. Вирусные гепатиты у детей. М., 1994.
6. Хронический вирусный гепатит. Под ред. В.В. Серова, З.Г. Апросимовой. М., Медицина, 2004.
7. Яригин А.А., Пинчук В.Г., Гриневич Ю.А. Структура тимуса и дифференцировка Т-лимфоцитов. Киев, 1991.
8. Ganem D., Schneider R.J. Hepadnaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe D.M. et al. (ed.). Fields Virology, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 2001, p. 2923-2969.
9. Naoumov N.V. Hepatitis C virus-specific CD4⁺ T cells: do they help or damage? Am. J. Gastroenterol. 1999, 117: 1012-1014.
10. Pawlotski J.M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. Trends Microbiol. 2004, 12: 96-102.
11. Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. J. Viral. Hepat. 2005, 12 (2): 111-124.
12. Shoukry N.H., Cawthon A.G., Walker C.M. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus. Ann. Rev. Microbiol. 2004, 58: 391-424.
13. Thio C.L., Seaberg E.C., Skolasky R.J. et. al. Multicenter AIDS cohort study. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of leaver-related mortality in the multicenter cohort study. Lancet. 2002, 360: 1921-1926.
14. Yoshioka K., Kakumu S., Hayashi H. et al. Anti-hepatitis C antibodies in patients with chronics non-A, non-B hepatitis: relation to disease progression and effect of interferon alpha. Am. J. Gastroenterol. 1991, 86: 1495-1499.

Поступила 10.10.16

Контактная информация: Семенов Сергей Иннокентьевич, д.м.н., Республика Саха (Якутия), 677010, Якутск, Сергеляхское шоссе, 4, корпус С-2, р.т. (411-2)35-32-75

ОЦЕНКА ОТНОШЕНИЯ К ИММУНОПРОФИЛАКТИКЕ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП НАСЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Цель. Изучение отношения населения к иммунопрофилактике. *Материалы и методы.* Проведено анкетирование 1209 респондентов: 1031 студент (медицинского, технического и гуманитарного университетов) и 178 родителей детей в возрасте до 2 лет по вопросам отношения к вакцинопрофилактике. *Результаты.* Наиболее негативное отношение (33%) отметили студенты гуманитарной специальности, а положительное отношение отметили всего 24%. Среди студентов технической специальности положительных ответов больше (37%), чем отрицательных (23%). Самое позитивное отношение к вакцинации показали студенты медицинской специальности и родители — 77% и 71% соответственно. Большинство респондентов отмечают дефицит знаний в области иммунопрофилактики, при этом менее 50% респондентов получают информацию от врачей. Остальные получают информацию из других источников, прежде всего из интернета. Около 80% всех групп респондентов предпочли бы получать информацию и ответы на свои вопросы о вакцинации в интернете, в том числе на официальных сайтах. *Заключение.* Приверженность населения РФ к вакцинопрофилактике имеет достаточно низкий уровень. Основной причиной этого является отсутствие знаний и доступности достоверной информации о вакцинации. Необходимо использовать различные варианты информирования населения о значимости и безопасности иммунопрофилактики, в том числе посредством интернет технологий и СМИ.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 98—103

Ключевые слова: вакцинация, приверженность к иммунопрофилактике, информированность об иммунизации, эффективность вакцинации

N.I.Briko, A.Ya.Mindlina, R.V.Polibin, N.P.Galina, A.S.Gorokhova, A.V.Ushanova

ASSESSMENT OF ATTITUDES TOWARDS IMMUNIZATION IN DIFFERENT GROUPS OF POPULATION OF THE RUSSIAN FEDERATION

Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. The study the attitude of population towards the necessity of vaccination. *Materials and methods.* The survey about the attitude towards vaccination among different groups of population was held. In total there were 1209 respondents: 1031 students of medical, humanitarian and technical universities and 178 parents of children under 2. *Results.* The most positive attitude towards vaccination was shown by medical students (77%) and parents (71%) and only 33% and 37% of humanitarian and technical students correspondently realize the significance of vaccination. It is worth noting that large number of people could not define their attitude to vaccination. The majority of respondents notices the lack of knowledge about vaccination wherein less than 50% of respondents get the information from doctors. The rest gets it from different sources mostly from the Internet. About 80% of respondents would prefer to get answers to their questions about vaccination in the Internet. *Conclusion.* The adherence of population of Russia to vaccination has a rather low level. The main reason for it is the lack of knowledge and availability of true information about vaccination. It is necessary to use diverse sources of information to provide the population with true facts about vaccination, its significance and safety via mass media and the Internet as well.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 98—103

Key words: vaccination, the adherence to vaccination, the commitment to immunization, vaccination effectiveness

ВВЕДЕНИЕ

Вакцинопрофилактика является наиболее эффективным мероприятием в отношении инфекционных болезней. Благодаря проведению вакцинации удалось существенно снизить заболеваемость многими антропонозными инфекциями. Однако до сих пор как в России, так и в других странах понимание значимости иммунопрофилактики для сохранения здоровья остается на невысоком уровне. Обращает на себя внимание недостаточное понимание необходимости проведения иммунопрофилактики и в среде медицинских работников. Остается актуальной проблема отказа от вакцинации. Согласно статистике ВОЗ 18,7 млн детей грудного возраста в мире все еще не получают основных вакцин как в странах с низким уровнем жизни, так и в развитых странах [8]. Именно для непривитых детей представляют смертельную опасность такие инфекции как коклюш, корь, ветряная оспа, пневмококковая, менингококковая инфекции и другие [3, 9].

Очевидным достоинством вакцинации является ее высокая эффективность [4, 11]. Однако снижение заболеваемости и поддержка ее на низком уровне на фоне вакцинации приводит к заблуждению как родителей, так и медицинских работников, которые считают, что нет необходимости прививать детей, поскольку нет эпидемий и вероятность заболеть очень мала.

В США основным барьером к вакцинации является отсутствие у населения уверенности в безопасности вакцин. Сомнение в качестве вакцин и их составе пугает не только американских родителей, но и родителей из других стран [1].

Интересным является исследование ученых из Швейцарии. Эта страна с высоким уровнем жизни, и основной проблемой, с которой сталкиваются врачи-педиатры, это убежденность родителей в здоровом образе жизни. Проведенный опрос родителей из Швейцарии показал, что основной причиной отказа от вакцинации является мнение, что здоровый образ жизни способен защитить их ребенка от инфекции. Помимо здорового образа жизни, родители считают, что вторжение в естественный иммунитет ребенка — это нарушение законов природы. Сама болезнь, по их мнению, не страшна, тренировать иммунитет нужно естественным образом, а именно — переболеть. Интересным является еще тот факт, что большинство опрошенных родителей были работниками здравоохранения [12].

Работники здравоохранения входят в группу риска по отказам от вакцинации не только в Швейцарии, но и в Дании.

По данным литературы можно выделить основные факторы, влияющие на отказ от вакцинации [5]: Сомнение в безопасности вакцин; Зависимость от наличия образования; Родители работники в сфере здравоохранения; Недоверие к сотрудникам здравоохранения и государству; Количество детей; Уровень жизни; Психологические факторы; Сомнение в безопасности вакцин.

Многие родители мало информированы, и недостаток знаний приводит к формированию негативного отношения к вакцинации за счет получения информации от противников вакцинации, которая является необъективной и недостоверной [6].

В частности, на всех антипрививочных сайтах в Канаде присутствуют темы риска для здоровья от применения вакцин. Каждый сайт утверждает, что вакцины являются ядовитыми и вызывают идиопатические заболевания [13]. В Великобритании до сих пор некоторые родители предпочитают не делать прививку против кори, краснухи и эпидемического паротита, считая ее фактором, вызывающим аутизм [16]. Во Франции верят в связь между прививкой от гепатита В и рассеянным склерозом [17]. Многие родители боятся развития таких осложнений, как астма или аллергия. Помимо этого, антипрививочники утверждают, что вакцины не только не безопасны, но и способны вызывать инфекционные заболевания, так как в составе вакцины находятся живые или убитые возбудители [13].

Следует отметить, что наличие образования является спорным фактором, влияющим на отношение к вакцинации, и результаты весьма противоречивы. В странах с низким уровнем жизни родители, имеющие высшее образование, склонны прививать своих детей [14], но в развитых странах этот показатель ведет себя по-разному. С одной стороны, родители с высшим образованием из Нидерландов чаще всего относятся

негативно к вакцинации. С другой стороны, исследования в США показывают, что более образованные родители менее обеспокоены безопасностью вакцины и, следовательно, склонны прививать своих детей [16]. Ученые из Великобритании сделали вывод, что семьи с большим количеством детей чаще склонны отказываться от прививок, чем семьи с одним ребенком [16]. Уровень жизни, социальное положение является важным критерием только для тех стран, где прививки платные, в других странах этот показатель не является значимым [17].

История доказывает, что массовые отказы от вакцинации приводят к различным эпидемиям. В настоящее время во всем мире проводятся провакцинальные кампании, которые опираются на рациональное обоснование необходимости прививок и преследуют цель разъяснить населению значимость и пользу иммунопрофилактики, а также предоставить объективную доказанную информацию о безопасности вакцин. Однако без понимания населением значимости иммунопрофилактики для сохранения здоровья достигнуть надлежащего уровня привитости невозможно [10].

В связи с этим, целью нашего исследования было изучение отношения различных групп населения РФ к необходимости проведения вакцинации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами было проведено анкетирование по вопросам отношения к вакцинопрофилактике различных групп населения. Анкета включала 25 вопросов. Общее количество респондентов составило 1209 человек, из них: 555 студентов медицинского ВУЗа, 338 студентов высшего и среднего образовательных учреждений технического профиля, 138 студентов гуманитарных ВУЗов, а также 178 родителей детей в возрасте до 2 лет. Родители детей в возрасте до 2 лет в рамках исследования были выбраны в качестве респондентов, т.к. большая часть прививок в рамках Национального календаря делается именно в первые 2 года жизни и родители стоят перед вопросом выбора тактики иммунопрофилактики. Студенты медицинских вузов были выбраны, т.к., с одной стороны, они являются будущими врачами, от которых зависит реализация программы иммунизации, а с другой стороны, также, как и студенты других специальностей, являются потенциальными родителями. При этом студенты гуманитарных и технических специальностей не получают информацию о вакцинопрофилактике в рамках образовательных программ. Оценка достоверности различий проводилась с использованием доверительных интервалов и критерия хи-квадрат.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ анкет показал большой процент лиц, относящихся к иммунопрофилактике негативно, а также крайне низкую информированность по вопросам вакцинации. На вопрос об отношении к иммунопрофилактике наибольший удельный вес негативных ответов был получен от студентов технического и гуманитарного профиля. Среди студентов технического профиля положительное отношение показали всего 37%, а гуманитарных — 33%, при этом более 40% затрудняются ответить на этот вопрос. Следует отметить, что достоверных различий между ответами «положительное отношение» и «негативное» среди студентов гуманитарных ВУЗов, а также «положительное отношение» и «затрудняюсь ответить» не выявлено, что свидетельствует о подавляющем большинстве студентов, настроенных негативно в отношении иммунопрофилактики.

Отношение родителей детей в возрасте до 2 лет было намного позитивнее: 71% опрошенных относятся к ней положительно, 11% отрицательно и 18% имеют неопределенное отношение ($p < 0,05$).

Самое позитивное отношение к иммунопрофилактике наблюдалось у студентов медицинского ВУЗа. Большинство из них (77%) положительно относятся к иммунопрофилактике, однако 17% затрудняются ответить на этот вопрос, и 6% ответили, что их отношение отрицательно ($p < 0,05$), это свидетельствует о том, что даже в медицинской среде присутствуют антивакцинальные тенденции.

Разницы в ответах юношей и девушек среди студентов не установлено. При этом, отношение к вакцинации зависело от степени образования (высшее или среднее специальное). Студенты высших учебных заведений технической и гуманитарной

направленности относятся к проведению иммунопрофилактики позитивнее (37%), чем студенты средних специальных учебных заведений (28%) ($p < 0,05$).

При анализе ответов среди опрошенных родителей установлено, что более молодые родители относятся позитивнее к вакцинации (20 — 30 лет — 84%, 30 — 40 лет — 67%, старше 40 лет — 69%).

Анализ ответов респондентов, отметивших отрицательное отношение, показал, что большинство (59%) указали на боязнь возникновения осложнений в ходе вакцинации и недостаток информации о безопасности вакцин.

Среди студентов гуманитарного профиля 42% считают, что вакцинация снижает заболеваемость, 38% не согласны с этим утверждением, 20% не определились, 44% студентов технической специальности высказались в пользу снижения заболеваемости, 23% — против, 33% не определились с ответом. Большинство студентов-медиков (87%) признают вакцинацию эффективной, 5% считают, что зависимость нет, и 8% затрудняются с ответом; 71% опрошенных родителей детей до 2 лет придерживаются точки зрения, что прививки убергут их детей от инфекционных заболеваний и их осложнений, 10% считают, что от прививок больше вреда, чем пользы, и 19% затрудняются ответить. Отсутствие достоверности различий в ответах студентов гуманитарных ВУЗов может быть связано с низким уровнем осведомленности о значении вакцинации в профилактике инфекционных болезней.

При этом, студенты, обучающиеся в высших учебных заведениях, в большей степени считают, что за счет иммунопрофилактики заболеваемость снижается — 51%, 26% не согласны с этой позицией, 22% затрудняются с ответом. Достоверных различий в ответах студентов, обучающихся в средних специальных учебных заведениях, нет, что также можно объяснить низкой информированностью в вопросах иммунопрофилактики.

Подавляющее большинство (93%) студентов-медиков планирует прививать своих детей в будущем, а среди студентов гуманитарного и технического профиля — всего лишь 67%. Среди родителей детей в возрасте до 2 лет делают прививки своим детям 90%, однако здесь прослеживается связь с возрастом, респонденты, которым больше 40 лет, преобладают в группе тех, кто отказывается от прививок (7% — 20 — 30 лет, 10% — 30 — 40 лет, старше 40 лет — 18%) ($p < 0,05$).

Следует отметить, что большинство респондентов собирается прививать своих детей лишь от части инфекций: гепатит В (86%) и туберкулез (77%). При этом отмечается низкий процент респондентов, планирующих прививать своих детей против пневмококковой инфекции (37%), прививка против которой включена в Национальный календарь профилактических прививок относительно недавно. Определяется этот факт недостаточной осведомленностью населения о значимости этой инфекции. Эта проблема существует не только в России, но и в других странах.

Изучение вопросов осведомленности населения о необходимости вакцинации против пневмококковой инфекции в различных европейских странах [15] показало, что всего 29% осведомлены о пневмококковой инфекции. Эта цифра колебалась от 14% (Франция) до 48% (Португалия).

Информированность населения по вопросам иммунопрофилактики в целом недостаточна для формирования приверженности к ней. Всего лишь 27% студентов технической и гуманитарной специальностей ответили, что имеют достаточно информации об иммунопрофилактике и ее значении, 56% ответили, что информацией в должном объеме не располагают, и 17% вообще не нуждаются в подобной информации. Отсутствие достоверных различий в ответах среди студентов-медиков свидетельствует о том, что даже в этой группе имеется дефицит информации.

Основным источником получения информации по вопросам иммунопрофилактики должны быть медицинские работники. В европейских странах 92% населения получают информацию о необходимости проведения прививок от врачей [15]. В России явно прослеживается недостаточная приверженность самих медицинских работников к вопросам иммунопрофилактики. Об этом свидетельствует неполный охват прививками против пневмококковой инфекции и гриппа, частое нарушение своевременности сроков вакцинации и необоснованность медицинских отводов [2]. Кроме того, 61% опрошенных студентов технической и гуманитарной специальностей и 58% студентов-медиков ответили, что не получают информацию о вакцинации на приеме у врачей

первичного звена в амбулаторно-поликлинических учреждениях. С другой стороны, прослеживается недостаточная степень доверия к медицинским работникам со стороны населения, предпочитающего получать сведения из средств массовой информации.

На сегодняшний день среди отечественных и зарубежных сайтов антипрививочная пропаганда, активно разворачиваемая в интернете, способствует поддержанию так называемых мифов о прививках, с одной стороны, и служит препятствием на пути формирования у населения приверженности к вакцинопрофилактике, с другой [7].

Среди родителей детей до 2 лет провакцинальную информацию в СМИ и интернете слышали 54%, антивакцинальную — 38%, остальные не встречали вообще никакой информации по вопросам иммунопрофилактики. Среди студентов всех специальностей около 30% ответили, что слышали позитивную информацию из СМИ о вакцинации, остальные указали, что информацию не получали ($p < 0,05$).

Студенты медицинского университета активнее интересуются темой вакцинопрофилактики — 78% хотели бы получать больше информации, однако 22% данной темой не интересуются. Среди студентов технического и гуманитарного профиля более 55% не интересуются этой темой, 83% родителей хотят получать больше информации об иммунопрофилактике ($p < 0,05$).

Предпочтительной формой получения информации для более чем 80% респондентов является интернет, на втором месте по значимости источника информации выбрана реклама в виде листовок, брошюр, плакатов в общественных местах, транспорте, поликлиниках. На третьем месте по популярности получения информации находится радио и телевидение.

При поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации разработан интернет-сайт <http://www.yarprivit.ru/>, направленный на популяризацию и устранение информационного дефицита среди населения в вопросах иммунопрофилактики. На сайте проводится голосование «Прививаете ли вы своих детей?». Более 80% посетителей сайта ответили в пользу вакцинации. Кроме того, создание этого сайта позволило сократить число негативных высказываний в отношении иммунопрофилактики в блогосфере. Большинство респондентов (около 70%) видят необходимость в расширении информации на этом сайте.

В мире существуют разные подходы к увеличению привитости населения. В США большую роль отводят вопросам государственного регулирования в области иммунопрофилактики. Например, отказ от вакцинации может привести к удорожанию врачебной страховки, а власти штата Калифорния приняли закон, запрещающий родителям отказываться от прививок без разрешения врача. В России в настоящее время обсуждается вопрос введения юридической ответственности родителей за отказ от вакцинации детей.

Однако идею о принудительной вакцинации поддержали 47% студентов-медиков, 19% затруднились с ответом, а 34% относятся к таким мерам отрицательно. Студенты гуманитарного и технического профиля обучения в большей степени против подобных мер — 68%, затруднились с ответом 27%, а положительно ответили только 5%. Таким образом, большинство респондентов не поддерживают введение принудительной вакцинации, отмечая недостаток информации как ведущий фактор отказа от вакцинации.

Решение проблемы повышения приверженности к вакцинации как медицинских работников, так и населения в настоящее время должно носить комплексный характер и осуществляться по разным направлениям. В первую очередь, для повышения доверия населения к иммунопрофилактике необходимо всестороннее освещение, в том числе в СМИ, объективной и достоверной информации о безопасности и эффективности вакцин. Назрела необходимость включения в систему высшего медицинского образования для обучающихся по всем специальностям группы здравоохранения отдельной дисциплины «Имунопрофилактика». Такая дисциплина включена в учебный план по специальности «медико-профилактическое дело» с 2014 года. Однако студенты, обучающиеся по клиническим специальностям, отмечают нехватку информации по вопросам иммунопрофилактики. Необходимо постоянное обучение вопросам иммунопрофилактики врачей. Сегодня целесообразно организовывать школы по иммунопрофилактике в рамках профессиональных конференций.

В Российской Федерации уровень осведомленности населения как в отношении

ущерба, наносимого инфекционными болезнями здоровью, так и роли вакцинации в его сохранении остается недостаточным. Приверженность населения Российской Федерации к вакцинопрофилактике на сегодняшний день имеет достаточно низкий уровень. Основной причиной этого является отсутствие знаний и доступности достоверной информации о вакцинации. Необходимо использовать различные варианты информирования населения о значимости и безопасности иммунопрофилактики, в том числе посредством интернет-технологий и СМИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байбусинова А.Ж., Мусаханова А.К., Шалгумбаева Г.М. Отношение, барьеры и проблемы вакцинопрофилактики в современном мире: обзор литературы. Наука и здравоохранение. 2016, 3: 123-134.
2. Баранов А.А., Брико Н.И., Намазова-Баранова Л.С., Федосеев М.В. Правовые и этические основы информированного согласия на вакцинацию в России: необходимость изменения подхода. Педиатрическая фармакология. 2016, 13 (2):116-130. doi:10.15690/pf.v13i2.1552.
3. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Таточенко В.К. Научное обоснование вакцинации детей с отклонениями в состоянии здоровья. Педиатрическая фармакология. 2010, 7 (2): 6-24.
4. Брико Н.И., Лобзин Ю.В., Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Ильина С.В., Королева И.С., Харит С.М., Сидоренко С.В., Таточенко В.К., Маянский Н.А., Куличенко Т.В., Полибин Р.В., Сабитов А.У., Ковтун О.П., Романенко В.В. Оценка эффективности вакцинации: основные подходы и спорные вопросы. Педиатрическая фармакология. 2014, 11 (4): 8-15. doi: 10.15690/pf.v11i4.1057.
5. Кригер Е.А., Самодова О.В., Рогушина Н.Л., Борисова Т.А. Отношение родителей к вакцинации детей и факторы, связанные с отказом от прививок. Педиатрия. 2016, 2 (95): 91-95.
6. Куличенко Т.В., Дымшиц М.Н., Лазарева М.А., Бабаян А.Р., Бокучава Е.Г. Нарушение календаря вакцинопрофилактики детей: взгляд врачей и родителей на проблему. Педиатрическая фармакология. 2015, 12 (3): 330-334. doi: 10.15690/pf.v12i3.1361.
7. Саперкин Н.В., Кукунова В.В. Вопросы вакцинопрофилактики и интернет-пространство. Медицинский альманах. 2013, 2 (26): 75-78.
8. Охват иммунизацией. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). <http://www.who.int/ru/>.
9. Сидоренко С.В., Лобзин Ю.В., Харит С.М., Королева И.С., Таточенко В.К. Пневмококковая инфекция и современные возможности ее профилактики — эпидемиологический обзор ситуации в мире и в России. Вопросы современной педиатрии. 2010, 9 (1): 62-69.
10. Солондаев В.К., Конева Е.В., Черная Н.Л. Психологические факторы принятия решения о вакцинации. Сибирский психологический журнал. 2016, 59: 125-136.
11. Фельдблюм И.В. Эпидемиологический надзор за вакцинопрофилактикой. Медиаль. 2014, 3 (13): 37-55.
12. Gross K. et al. I know it has worked for millions of years: the role of the natural in parental reasoning against child immunization in a qualitative study in switzerland. BMC Public Health. 2015, 15: 373. doi 10.1186/s12889-015-1716-3.
13. Kata A. A postmodern pandora's box: anti-vaccination misinformation on the internet. Vaccine. 2010, 28: 1709-1716. doi 10.1016/j.vaccine.2009.12.022.
14. Miyahara R., Jasseh M., Gomez P. et al. Barriers to timely administration of birth dose vaccines in the Gambia, West Africa. Vaccine. 2016, 34 (29): 3335-3341. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.05.017.
15. PnevVUE Report. 2016. <http://www.slideshare.net/IpsosMORI/pnevvue-adult-pneumonia-vaccine-understanding-in-europe>.
16. Smith A. et al. Salisbury tracking mothers' attitudes to mmr immunisation 1996-2006. Vaccine. 2007, 25: 3996-4002.
17. Stefanoff P., Mamelund S.E., Robinson M. et al. Tracking parental attitudes on vaccination across european countries: the vaccine safety, attitudes, training and communication project (VACSATC). Vaccine. 2010, 28 (35): 5731-5737. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.009.

Поступила 15.01.17

Контактная информация: Брико Николай Иванович, д.м.н., проф.,
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, р.т. (499)248-04-13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Д.И.Каминский, В.В.Лобанов, К.К.Рожков, А.Б.Мазрухо

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ НЕКОТОРЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Методы выявления эпидемически значимых микроорганизмов разнообразны, однако золотым стандартом бактериологической диагностики остается культивирование на питательных средах. Выбор среды зависит от условий, в которых бактерии существовали ранее и находятся в настоящее время. Естественные условия жизни определяют их физиологические особенности, а метаболическая пластичность обеспечивает выживание и сохранение вирулентности. В данном обзоре на примере *Yersinia pestis* и *Vibrio cholerae* представлены наиболее эффективные разработки питательных сред. Приведены доказательства перспективности широкого использования белкового гидролизата дрожжей в качестве основы питательных сред.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 104—110

Ключевые слова: питательные среды, физиология микробов, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*

D.I.Kaminsky, V.V.Lobanov, K.K.Rozhkov, A.B.Mazrukho

EVALUATION OF NUTRIENT MEDIA TO GROW SOME INFECTION DISEASES CAUSATIVE AGENTS

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

The detection methods for microbial agents that have epidemiological significance are diversity but cultivation on nutritional media remains the gold standard in microbiological diagnostics. Choice of medium depends on the conditions in which bacteria were early and is present. The nature life determines its physiological peculiarity then a metabolic plasticity promote to survive and to save the virulence. In this review on the example of *Yersinia pestis* and *Vibrio cholerae* performed evaluations of the efficient decisions for the bacterial media development. It is declared advantage of baker's yeast hydrolysate as the nutrition media base.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 104—110

Key words: nutrient media, microbial physiology, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*

Современная концепция надзора за опасными для человека болезнями предусматривает не только решение чисто медицинских вопросов, но также держит в поле зрения общегосударственные проблемы, связанные с экономикой и импортозамещением [28, 31]. Предстоит большая работа в области производства питательных сред, в частности, обеспечивающих мониторинг особо опасных инфекций — чумы и холеры. Диагностика их требует использования метода культивирования бактерий в соответствии с новейшими научными знаниями.

1. *Формирование современных принципов разработки бактериологических питательных сред.* Первоначально для выращивания микроорганизмов с научными целями применяли только питательные отвары и бульоны. Богатые питательными веществами жидкие среды (в особенности мясной бульон) позволяли накапливать бактериальную массу, но она была неоднородна, и Роберт Кох ввел принцип работы с «чистой

культурой» на плотных питательных средах. Открытие С.Н.Виноградским (1856 — 1953 гг.) хемосинтеза — жизни микроорганизмов за счет окисления неорганических веществ и разработка им метода «элективных культур» дали развитие разработке новых питательных сред [11]. Широкое использование бактериологических методов и создание сред разнообразного назначения, многие из которых применяют многие десятилетия, помогли установить этиологическую природу чумы, холеры, сибирской язвы, туберкулеза, дифтерии, почти всех возбудителей кишечных инфекций [28]. В 1930 г. Левин и Шенлейн классифицировали более двух тысяч питательных сред для культивирования микроорганизмов, идентификации, выделения ферментов, антигенов, токсинов [22]. И все же ко второй половине XX в. сформировалось мнение, что невозможно приготовить универсальную питательную среду, на которой могли бы развиваться любые микробы [12]. Однако в настоящее время широко используют сложные по составу базовые питательные среды, поддерживающие рост различных систематических групп за счет пептона, дополнительные компоненты определяются индивидуально [28]. Пептоны, представленные в руководстве фирмы «Merck», основанной их производство более 80 лет назад, отличаются по химическим характеристикам, количеству общего и аминного азота [42], и поэтому можно констатировать, что «пептон» — химически неопределенный термин, используемый для обозначения разнообразных белковых гидролизатов.

Вещества, необходимые для жизнеобеспечения микроорганизмов, определяет эволюционный путь формирования вида. И генетическая неоднородность заставила расширить качественный диапазон лабораторных питательных сред от растворов минеральных солей для автотрофов до мясных гидролизатов, обогащенных кровью, для бактерий, вызывающих сепсис. Стало активно развиваться научное направление: «питательные среды и микробный метаболизм» [28]. В настоящее время техника культивирования микроорганизмов позволяет моделировать условия для репродукции биохимических свойств, присущих данному виду, имитировать определенные циклы, характерные для естественных условий. Осуществляются попытки «метаболического моделирования» адаптации к условиям питания во время инфекции на молекулярном и организменном уровне [5]. Ученые разрабатывают модели, соответствующие совокупности энергетических электронных балансов, кинетике субстратного поглощения источников углерода и азота, органических и минеральных веществ [2]. Благодаря познанию тонкостей метаболических процессов в разных условиях существования в 1990-х гг. началась разработка новых способов дифференциальной диагностики бактерий — культивирования на хромогенных средах [47]. Метод, изначально выявляющий широкий спектр продуцентов β -лактамаз, вскоре был трансформирован для прямой изоляции разнообразных клинических культур на основе специфических цветных реакций на агаровой среде. В отличие от ранее используемых сред, где окраска зависела от изменения pH, новый тип диагностических сред содержит меченный хромогеном субстрат, который разлагает специфический метаболит микроба, приводя к окрашиванию отдельных колоний. Это позволяет клонировать искомого культуру в гетерогенной популяции, в том числе загрязненной посторонней микрофлорой. Подобно тому, как это делается при использовании метода бактериальной культуры, новая среда содержит все необходимое для синтеза характерного фермента или токсина, в том числе питательные основы. На рубеже XXI века физиология микроорганизмов и исследования в области генетики обогатились новыми сведениями относительно факторов, влияющих на синтез продуктов различного назначения, в том числе, на время культивирования [1, 39]. Появились автоматизированные способы выращивания микроорганизмов, ускоряющие аналитические и производственные процессы. Повысилась роль методов контроля над этими процессами [24]. В биотехнологии, помимо подбора оптимального состава питательных сред, регуляции скорости размножения путем введения добавок и изменения уровня аэрации, главенствующую роль получила генная инженерия — конструирование штаммов-продуцентов с рекомбинантной ДНК [4, 35]. Последние достижения биотехнологии делают возможным создание штаммов-продуцентов белкового сырья определенного аминокислотного состава [33].

Современная микробиологическая техника, используя соответствующие пита-

тельные среды и регуляторы метаболизма, способна влиять на физиологические процессы, происходящие при культивировании, в частности, сохранение вирулентных свойств патогенных бактерий, хотя потребности бактерий в питательных веществах, ионах, кофакторах, зависимость ферментативных реакций от pH, температуры, наличия кислорода разнообразны [28]. Общепринято считать, что самый главный индикатор состояния метаболизма у микробов — формирование биомассы, и это свойство, нередко связанное с паразитизмом, у вирулентных для человека бактерий имеет «функциональные аналогии», определяемые жизнью в другом организме [39, 43]. Поскольку холерный вибрион и микроб чумы близки в этом отношении, аналогия привлекает внимание возможностью использовать одинаковые источники питания для выращивания представителей обоих видов.

2. *Разработка питательных сред для Yersinia pestis и Vibrio cholerae.* В нашу задачу входит поиск общности метаболических свойств *Y. pestis* и *V. cholerae*, и чтобы найти сходство, мы обращаемся к «Определителю бактерий Берджи» [27]. Оба представителя грамотрицательных бактерий — факультативные анаэробы, хемоорганотрофы, обладающие и дыхательным, и бродильным типами метаболизма. Катаболизируют D-глюкозу. Восстанавливают нитрат. Сероводород не образуют. Они используют окислительно-восстановительные реакции как источник энергии, а для роста и размножения в хозяине им требуются органические вещества в качестве основного источника углерода [8, 14, 27]. Ауксотрофные мутанты нуждаются в готовых витаминах, например, никотиновой кислоте в форме NAD и NADP для осуществления окислительно-восстановительных процессов [23].

Следует сказать, что *Y. pestis* близкородственна некоторым энтеритическим патогенам (*Y. pseudotuberculosis*), но в процессе эволюции потеряла специфические гены, необходимые для колонизации кишечника, стала локально адаптирована в своих зоотических резервуарах [40]. И все же ее трансмиссионный механизм определяет пищевой путь — рост в виде биопленки в преджелудке блох [32]. Метаболизм *Y. pestis* связан с обменными процессами, происходящими в организме инфицированных грызунов или человека, фагоцитах, макрофагах, нейтрофилах [30]. Это медленно растущий «К-стратег», внутриклеточный паразит [43], проявляющий зависимость от температуры, а также определенных аминокислот, гемина, нуклеиновых оснований, витаминов. Под влиянием специфических сигналов повышения температуры: «37°C» и «37°C — Са» (сигнал низкого содержания ионов кальция в среде) происходит смена метаболических процессов, связанных в том числе, с капсульным антигеном [7]. Проблема патогенности *Y. pestis* занимает заметное место в специальной литературе [8]. Вследствие адаптационной изменчивости *Y. pestis* может формировать слабо-вирулентные культуры [8], но следует помнить: бактерия чумы — возбудитель опасного острого инфекционного заболевания, с высокой летальностью, тяжелым течением, угрозой массового распространения, в том числе, в результате актов биотерроризма [26, 45].

В практическом руководстве [14] сообщается, что штаммы из некоторых природных очагов имеют дополнительные потребности, а большинство нуждается в трех аминокислотах — метионине, фенилаланине и треонине. В Российской Федерации для диагностики *Y. pestis* рекомендуется питательный агар с мясным или казеиновым гидролизатами, которые содержат названные аминокислоты. ВОЗ (со ссылками на международных экспертов) предлагает посеvy крови или тканевого материала на кровяной агар SBA (sheep blood agar), brain-heart infusion agar, Mac-Conkey agar [45]. Обычно микроб чумы культивируют в присутствии сульфата натрия (натрий сернистокислый), который обладает свойствами восстановителя и поддерживает окислительно-восстановительный потенциал питательной среды. Оптимальные условия выращивания: 28°C, pH 7,0 — 7,2. При 37°C возникают дополнительные питательные потребности, при этом на агаре Мак-Конки через 24 ч колонии слабо различимы [14].

Холерные вибрионы — типичные «г-стратеги», характерной чертой которых является наличие в жизненном цикле взрывного роста популяции как в кишечнике человека, так и в водной среде [34]. Верхний отдел кишечника человека, где возбудитель холеры в начале инфекционного процесса обеспечен всем необходимым для

бурного развития, имеет слабо щелочную реакцию среды, низкое содержание кислорода, повышенную энергетику анаэробнозиса. К исходу заболевания, которое может продолжаться несколько часов, питательные субстраты истощаются, рост замедляется, увеличиваются впитывающая активность внешней мембраны, интенсивность окислительного метаболизма железа; усиливается транскрипция генов, необходимых для адаптации в голодной среде [10, 31, 48]. В межэпидемический период популяция холерных вибрионов представляет собой либо свободноживущие планктонные, либо неподвижные клетки, связанные с биотической или абиотической поверхностью, сгруппированные в биопленке [41]. Высокая активность хитинолитической системы обуславливает пропитание путем паразитирования на покрытых хитином поверхностях животных [9]. Потенциальная способность к микроэволюции вплоть до появления вирулентных клонов, вероятно, связана с периодом повышения температуры воды и цветения [38]. Смена температурных условий — 37°C в человеке и 15 — 25°C в воде — играет важнейшую роль в функции контроля за процессами питания и секреции [49]. При температуре 35 — 37°C и рН 7,6 — 8,0 холерные вибрионы хорошо растут на питательных средах, содержащих компоненты мяса: 1% пептонной воде, пептоне Мартена, настое сердечной мышцы, агаре Хоттингера, мясо-пептонном агаре, а также средах, содержащих препараты из крови. Используя такие среды, *in vitro* можно влиять на токсигенность, синтез холерогена, от которого зависит симптоматика и исход болезни [6, 10, 37, 50]. *V. cholerae* и *Y. pestis*, подобно многим патогенным микроорганизмам, часто культивируют на мясном или казеиновом пептоне, но уже давно не вызывает сомнения необходимость замены такой базовой основы экономически более выгодным препаратом [12, 14, 21 — 23, 28].

3. *Перспективы совершенствования бактериологических питательных сред.* При лабораторном исследовании многих бактерий метод культивирования является международным стандартом, хотя имеет недостатки: для выделения чистой культуры и ее идентификации необходимо примерно 48 часов; чувствительность метода, как правило, низкая; трудности представляют «новые» инфекции. В связи с этим, предпринимались многочисленные попытки заменить его хромогенным или молекулярно-биологическим методами [46].

Совершенствование бактериологической лабораторной работы заключается как в инновационных разработках, так и в модификации старых методов. Проводят перспективные исследования в направлении обновления основ питательных сред, в том числе, замены мясного сырья, предлагают новые питательные среды для автоматизированных технологий и молекулярной биологии [31]. В качестве сырья используют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* — естественный концентрат белка, который в своем составе содержит лизин, лейцин, изолейцин, триптофан, аргинин, гистидин, цистеин, фенилаланин, метионин, треонин, глутаминовую и аспарагиновую кислоту [28, 36]. Среди бактериологических препаратов общего назначения разработана дрожжевая основа ПППД — панкреатический перевар пекарских дрожжей [15]. Упрощенный, совершенный в одну стадию процесс гидролиза легко управляем благодаря легкости дозирования компонентов белкового переваривания. Стандартность обеспечена во многом с помощью применения панкреатина и хлебопекарных дрожжей, соответствующих требованиям государственных и отраслевых стандартов. Ферменты панкреатина включены в процесс лизиса стенки клеток дрожжей. Он необходим для выделения структурного белка, который составляет примерно 85% от общего количества [3, 13, 25]. Была проведена сравнительная оценка различных белковых гидролизатов, используемых в настоящем для диагностики чумы и холеры, и новый белковый гидролизат не уступил им ни по одному показателю [17]. Особый интерес представляют питательные среды для культивирования *Y. pestis*, изготовленные на этой основе. Впервые для выделения микроба чумы из экспериментально зараженных пищевых продуктов с положительным эффектом была применена среда ЧДС-37 [29]. Среда ЧДС-37 и ЧДС-28 использовались в ходе тактико-специального учения СПЭБ, результаты которого показали, что она может быть рекомендована в качестве элемента мобилизационной составляющей резерва питательных сред СПЭБ [18]. Новые среды на основе ПППД: ХДС-Н, ХДС-агар, ХДС-бульон использовались в качестве аналогов пептонных сред в диагностике холеры [19, 20]. Таким образом, гидролизат

белка ПППД явился основным питательным компонентом сред, предназначенных для выделения двух опасных для человека возбудителей: *Y. pestis* и *V. cholerae* [16, 18]. Среды нового поколения, которые позволяют проводить быстрое (в течение суток) обнаружение и идентификацию микроорганизмов, также нуждаются в дрожжевых добавках. В 2012 г. было постулировано [48], что в составе дифференциально-диагностической среды CHROMagar Orientation (France) кровь, ранее используемая в составе сред аналогичного назначения, заменена дрожжевым экстрактом, который часто вводят как фактор роста.

В итоге можно сказать, что новый белковый гидролизат — панкреатический переработанный пекарских дрожжей — может быть эффективно использован в производстве целого ряда питательных сред микробиологического назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.А., Викторов Д.В. О совершенствовании средств иммунодиагностики инфекционных болезней. Пробл. особо опасных инф. 2016, 1: 48-51.
2. Ахапкина И.Г., Блинкова Л.П. Питательные среды как искусственная среда роста и развития микроорганизмов. Журн. микробиол. 2001, 6: 99-104.
3. Берри Д. Биология дрожжей: перевод с англ. М.: Мир, 1985.
4. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М., Колос С, Химия, 2004.
5. Бухарин О.В. Инфекция — модельная система ассоциативного симбиоза. Журн. микробиол. 2009, 1: 83-86.
6. Вертиев Ю.В. Токсин-опосредованная обусловленность инфекционных заболеваний. Журн. микробиол. 1987, 3: 86-93.
7. Водопьянов С.О. Влияние сигнала «37°С — низкий рН» на клетки чумного микроба. Микробиол. журнал. 1990, 52 (5): 88-92.
8. Домарудский И.В. Чума. М.: Медицина, 1998.
9. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Романова Л.В., Титова С.В. Хитинолитический комплекс *Vibrio cholerae*: состав и роль в персистенции. Журн. микробиол. 2016, 5: 94-101.
10. Заднова С.П. Штаммы *Vibrio cholerae* с измененной экспрессией генов вирулентности. Автореф. дис. д-ра биол. наук. Саратов, 2009.
11. Кажал Н., Ифтимович Р. Из истории борьбы против микробов и вирусов. Бухарест, Научное изд-во, 1968.
12. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской микробиологии. М.: Медгиз, 1950.
13. Коновалов С.А. Биохимия дрожжей. М.: Пищевая промышленность, 1980.
14. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Г.Г. Онищенко, В.В.Кутырев (ред.). М.: Шико, 2013.
15. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Алутин И.М., Рожков К.К. Способ получения белкового гидролизата. Патент RU №2375441. Дата публикации 10 декабря 2009 г. Бюл. № 34.
16. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Телесманич Н.Р. Использование новых питательных сред на этапах подготовки сотрудников специализированных противоэпидемических бригад к работе в зонах чрезвычайных ситуаций. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2010, 3: 75-80.
17. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Рожков К.К., Кругликов В.Д. Сравнительная оценка белковых гидролизатов при создании на их основе универсальной питательной среды для диагностики чумы и холеры. Клин. лаб. диагн. 2011, 6: 46-49.
18. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Рожков К.К., Кругликов В.Д. Новая питательная среда для культивирования и выделения чумного микроба ЧДС-37 как элемент мобилизационного резерва специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора. Клин. лаб. диагн. 2011, 4: 48-50.
19. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Рожков К.К., Алутин И.М., Кругликов В.Д., Пухов Ю.М., Прометной В.И., Тришина А.В. Алгоритм и тактика обеспечения питательными средами специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора в очаге холеры. ЗНиСО, 2009, 11: 8-16.
20. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Рожков К.К., Алутин И.М. Среда обогащения для выявления холерного вибриона. Патент РФ 2392310. Публикация патента 20.06.2010.

21. Меджидов М.М., Султанов З.З. Использование непищевого сырья в производстве микробиологических питательных сред. Махачкала, Дагестанское книжное издательство, 1986.
22. Мейнел Дж., Мейнел Э. Экспериментальная микробиология: перевод с англ. М.: Мир, 1967.
23. Методы общей бактериологии. Т. 1. Ф.Герхардт (ред.): перевод с англ. М.: Мир, 1983.
24. МУК 4.2.2136-08. Методы контроля бактериологических питательных сред: методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.
25. Оганесянц Л.В., Бакулин В.П., Рейтблат Б.Б. Патент RU № 2375440. Способ получения автолизата дрожжей. Дата публикации 10.12.2009.
26. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Жилина Н.Я. и др. Практическое пособие для подготовки врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму. Волгоград, 2004.
27. Определитель бактерий Берджи. Т. 1. Дж.Хоулт, Н.Криг, П.Снит (ред.): перевод с англ. М.: Мир, 1997.
28. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской микробиологии. СПб, ЭЛБИ — СПб, 2008.
29. Способ определения зараженности продовольствия патогенными биологическими агентами в условиях чрезвычайных ситуаций. Патент RU № 2350656. Публикация патента 27.03.2009.
30. Сулейменов Б.М. Энзоотия и эпизоотия чумы. Алматы, 2009.
31. Шепелин А.П., Миронов А.Ю., Шепелин К.А. Питательные среды. Справочник бактериолога. М.: Эпидбиомдиагностика, 2015.
32. Chouikha Iman, Hinnebusch B.J. Silencing urease: a key evolutionary step that facilitated the adaptation of *Yersinia pestis* to the flea-borne transmission route. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014, 111 (52): 18709-18714.
33. Crèpin L. Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. Appl. Environ. Microbiol. 2012, 78 (22): 8102-8111.
34. Faruque S., Choudhury N., Kamruzzaman M. et al. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera endemic area. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101 (7): 2123-2128.
35. Guthke R., Linde J., Mech F., Fisse T. Systems biology of microbial infectious. Front Microbiol. 2012, 3: 328.
36. Hanscho M., Ruckebauer D.E., Chauhan N. et al. Nutritional requirements of the BY of *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications. FEMS Yeast Res. 2012, 12 (7): 796-808.
37. Iwanaga M., Yamamoto K. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. J. Clin. Microbiol. 1985, 22 (3): 405-408.
38. Kirchberg P.C., Orata F.D., Barlow E.J. et al. A small number of phylogenetically distinct clonal complexes dominate a coastal *Vibrio cholerae* population. Appl. Environ. Microbiol. 2016, 82 (18): 5576-5586.
39. Koch A.L. Microbiol physiology and ecology of slow growth. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997, 61 (3): 305-318.
40. Lenz J.D., Temple B.R.S., Miller V.L. Evolution and virulence contributions of avtotransporter proteins Yap and YapK of *Yersinia pestis* CO92 and their homologs in *Yersinia pseudotuberculosis* JP32953. Infect. Immun. 2012, 80 (10): 3693-3705.
41. Liu Zhi, Stirling Fine R., Jun Zhu. Temporal quorum-sensing induction regulates *Vibrio cholerae* biofilm architecture. Infect. Immun. 2007, 75: 122-126.
42. Microbiology manual: LPRO UBA-V. Product management microbial. Merck. 1996, 2 (1): 321.
43. Moulder J.W. Comparative biology of intracellular parasitism. Microbiol. Rev. 1985, 49 (3): 298-337.
44. Nordmann P., Girlich D., Poirel L. Detection of carbapenemase produce in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. J. Clin. Microbiol. 2012, 50 (8): 2761-2766.
45. Plague manual: Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control. Laboratory Diagnosis. Mode of access: <http://www.who.int/WHO/CDS/CSR/EDS/99/2/En>.
46. Rosec J.P., Causse V., Cruz B. et al. The international standard ISO/TS 21872-1 to study the occurrence of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in seafood:

- ITS improvement by use of chromogenic medium and PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 157 (2): 189-194.
47. Sarma Z., Heifetz M., Talmor J. et al. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36 (4): 990-994.
48. Sikora A.E., Beyhan S., Yildiz F.H. Cell envelope perturbation induces oxidative stress and changes in iron homeostasis in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2009, 191 (17): 5398-5408.
49. Townsley L., Mangus M.P.S., Mehic S., Yildiz F.H. Response of *Vibrio cholerae* to low-temperature shifts: CspV regulation of VI secretion, biofilm formation, and association with zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, 82 (14): 4441-4452.
50. Xu Q., Dziejman M., Mekalanos J.J. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003, 100 (3): 1285-1291.

Поступила 15.11.16

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*И.А.Иванова, Б.Н.Мишанькин, И.А.Беспалова,
Н.Д.Омельченко, Е.С.Шипко, А.В.Филиппенко*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ И ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Потребность в эффективной и экономичной вакцине против холеры продолжает оставаться актуальной в связи с появлением новых штаммов, которые вызывают тяжелые клинические формы холеры и могут вытеснить штаммы седьмой пандемии, а также угрозе выноса инфекции из эндемичных стран. В обзоре представлены литературные данные об использовании белков наружных мембран, везикул, «теней» возбудителя холеры для специфической профилактики и диагностики этого заболевания.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 110—115

Ключевые слова: белки наружных мембран, везикулы, «тени» возбудителя холеры, вакцина

*I.A.Ivanova, B.N.Mishankin, I.A.Bespalova,
N.D.Omelchenko, E.S.Shipko, A.V.Filippenko*

USE OF *VIBRIO CHOLERAE* SURFACE STRUCTURES FOR SPECIFIC PROPHYLAXIS AND DIAGNOSTICS OF CHOLERA

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

The need for efficient and cost-effective cholera vaccine hasn't lost its actuality in view of the emergence of new strains leading to severe clinical forms of cholera and capable to replace strains of the seventh cholera pandemic, and in connection with the threat of cholera spreading beyond the borders of endemic countries. In this review data from literature sources are presented about the use of outer membrane proteins, vesicles, cell ghosts of the cholera causative agent in specific prophylaxis and diagnostics of the disease.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 110—115

Key words: outer membrane proteins, vesicles, cell ghosts of cholera causative agent, vaccine

Во время текущей пандемии получены противоречивые данные об эффективности специфической профилактики холеры и ее применении в случаях завоза инфекции из внеэндемичных территорий. В соответствии с этим менялась официальная точка зрения экспертов ВОЗ и национальных служб здравоохранения на эту проблему [10]. Идеальной вакцины, которая бы отвечала всем требованиям ВОЗ, до сих пор не существует [24]. Аттenuированные вакцины способны индуцировать мощный протективный ответ после однократного применения, но могут оказывать и негативное действие на больных с ослабленным иммунитетом. Убитые вакцины с успехом продемонстрировали свой потенциал по защите населения эндемичных районов, однако не способны обеспечить долгосрочную защиту и не подходят для детей в возрасте до двух лет. Кроме того, они принимаются в несколько доз [30]. Существенным препятствием для усовершенствования химических вакцин против холеры является недостаточность сведений о природе протективных антигенов холерного вибриона. Вместе с тем, установлено, что антигены, ответственные за формирование антибактериального иммунитета, локализованы, главным образом, на наружных мембранах (НМ) возбудителя, поэтому исследования по совершенствованию средств иммунопрофилактики и иммунодиагностики холеры тесно связаны с поверхностными структурами холерного вибриона [3].

Белки наружной мембраны различных бактерий играют двойственную роль во взаимоотношениях патогена с иммунной системой организма-хозяина. С одной стороны, наружные белки являются факторами патогенности, подавляющими отдельные стадии иммунной защиты хозяина, с другой — представляют собой молекулы-мишени для системы врожденного иммунитета макроорганизма, активируя факторы немедленной защиты и участвуя в формировании специфического иммунного ответа [8]. Поэтому понимание структуры и свойств белкового состава бактериальной наружной мембраны необходимо при разработке противоинфекционных препаратов и вакцин [17]. Кроме того, препараты, созданные на основе белков НМ бактерий, могут защищать от инфекции, вызываемой всеми типами данного вида микроорганизма, и являются перспективными для профилактики родственных инфекций [8].

Наружные мембраны *Vibrio cholerae* содержат белки (Omp), продукция которых регулируется в ответ на желчь, осмолярность, колебания рН и другие сигналы окружающей среды. В составе мембранных пузырьков поверхностные белки могут принимать участие в транспорте различных токсинов, ферментов, ДНК и т.д. в клетки хозяина во время колонизации кишечника [21], что предполагает их важную роль в индукции иммунного ответа макроорганизма. Белки внешней мембраны возбудителя холеры являются видоспецифическими антигенами и способны вызывать образование агглютинирующих и вибриоцидных антител, перекрестно реагирующих с вибрионами разных серогрупп [16]. Ранее сообщалось о наличии иммуногенной активности у белка OmpW (22 кДа), присутствующего практически у всех исследованных штаммов холерных вибрионов [16], и OmpV (25 кДа), связанного с пептидогликаном белка теплового шока [35]. Мишанькиным Б.Н. и др. [5] получены данные о наличии протективных и иммуногенных свойств у OmpT (около 40 кДа) возбудителя холеры, что может быть полезным для совершенствования специфической профилактики этого заболевания.

Иммуногенными свойствами обладают и токсин-корегулируемые пили адгезии (Tcp) [11, 33]. Антитела против Tcp, образующиеся непосредственно к белкам, входящим в состав дисульфидной петли, оказывают протективное действие при экспериментальной холере [27], предотвращая развитие инфекционного процесса на его первой стадии — колонизации. Включение Tcp в состав вакцинных препаратов может усилить их иммуногенность [2], так как адгезины вызывают выработку секреторных антител класса А, предотвращающих колонизацию кишечника. Фактор колонизации белок TcpF, продуцируемый *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, вызывает интерес исследователей как потенциальный протективный антиген. При оценке иммуногенности и протективности выявлен дополнительный протективный эффект при сочетании его с В субъединицей холерного токсина (ХТВ) [31]. Показано, что рекомбинантная субъединица А токсин-корегулируемых пилей (TcpA) холерного вибриона может использоваться в качестве носителя в оральной вакцине против холеры как самостоя-

тельно [19], так и совместно с ХТВ в качестве иммуногенов при разработке эффективной мультивалентной субъединичной вакцины против *V. cholerae* [32].

Экстрацеллюлярная секреция продуктов является основным механизмом «общения» грамотрицательных возбудителей с макроорганизмом. Патогенные и непатогенные виды грамотрицательных бактерий выделяют везикулы (пузырьки), которые служат транспортным средством для секретируемых белков и липидов и играют важную роль в колонизации, передавая факторы вирулентности в клетки хозяина, причем механизмы пузырек-опосредованной доставки токсинов очень разнообразны. Анализ биохимических и функциональных характеристик везикул продемонстрировал, что они содержат адгезины, токсины и иммуномодулирующие соединения, благодаря чему опосредуют проявление бактериальных и инвазивных свойств, являются причиной цитотоксичности, а также активируют иммунную систему макроорганизма [21, 26]. Сохранение нативной структуры мембранных антигенов и хорошая физико-химическая стабильность делают везикулы наружных мембран (ОМВ) привлекательными для использования их в качестве вакцин, адъювантов, в лекарственной терапии бактериальных и вирусных болезней [28].

Холерный вибрион, как и все грамотрицательные бактерии, выделяет для транспорта важных факторов вирулентности ОМВ, которые представляют собой образования сферической формы размером от 20 до 200 нм. Показано, что ОМВ играют важную роль в доставке ХТ к клеткам эпителия тонкого кишечника [14]. Также установлено, что взаимодействие ОМВ с эпителиальными клетками кишечника модулирует провоспалительный ответ клеток эпителия и активирует дендритные клетки, что способствует дифференциации Т-клеток в сторону Th2/Th17 ответа [15].

О возможности использования ОМВ холерного вибриона для специфической профилактики холеры свидетельствуют результаты, полученные за рубежом. Показано, что оральная или интраназальная иммунизация животных ОМВ индуцировала долгосрочную иммунную защиту от заражения холерой и защищала потомство от колонизации кишечника возбудителем. Независимо от способа иммунизации у мышей регистрировался выраженный иммунный ответ на различные антигены, присутствующие в ОМВ [23, 36, 37]. Иммунизация ОМВ холерного вибриона самок мышей снижала колонизацию бактериями кишечника новорожденных мышат, инфицированных *V. cholerae*: после заражения достоверно уменьшалось количество вибрионов, а также снижалась инфицирующая способность бактерий, выделяемых во внешнюю среду с фекалиями [12, 13]. Индийские авторы выявили, что пероральная иммунизация ОМВ *V. cholerae* вызывала формирование серогруппоспецифического иммунитета и защищала иммунизированных взрослых мышей от заражения гетерогенными штаммами этого возбудителя, что может быть полезным для создания новой вакцины против циркулирующих штаммов [38]. Японскими авторами также показано, что оральная иммунизация очищенными ОМВ холерного вибриона индуцировала высокие титры специфических антител, которые оказывали вибриоцидное действие на гомологичные и некоторые гетерологичные штаммы *V. cholerae*. Кроме того, ОМВ обладали протективными свойствами и защищали кроликов от последующего заражения холерой. Было также установлено, что ОМВ достоверно менее реактогенны, чем живые и убитые бактерии, что свидетельствует о перспективности их использования для профилактики этого заболевания [34].

Другим направлением в плане совершенствования профилактики инфекционных болезней является исследование иммуногенных и протективных свойств так называемых «теней», у которых сохраняются все поверхностные структуры. «Тени» проявляют адъювантные свойства и вызывают формирование гуморального и клеточного иммунного ответа на антигены. Протективные антигены могут быть представлены как на внутренней, так и на наружной мембране «теней». После очистки и лиофилизации препараты «теней» могут сохраняться при комнатной температуре достаточно долго. Цикл производства от исходной культуры до прививки очищенным препаратом занимает не более одного дня и, таким образом, отвечает современным критериям быстрого производства вакцин, что позволяет не хранить ее большие запасы [22]. Все вышеперечисленное обуславливает повышенный интерес исследователей к этим бактериальным структурам.

По данным F.O. Eko et al. [18] оральная иммунизация кроликов «тенями» клеток *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп стимулировала образование высокого титра вибриоцидных антител.

Для конструирования искусственных вакцин иркутскими исследователями были использованы наружные мембраны клеток возбудителя холеры, полученные в результате разрушения и инактивации вибрионов Эль тор мочевиной с последующей обработкой их трипсином [3]. Предложенный препарат был нетоксичен, обладал иммуногенностью и протективностью, что позволило рекомендовать его в качестве основы, обеспечивающей формирование эффективного антибактериального иммунитета, для конструирования оральной бесклеточной холерной вакцины [4, 9].

В Ростовском-на-Дону противочумном институте выявлены иммуногенная и протективная активности у НМ холерного вибриона, выделенных щадящими методами из штамма *V. cholerae* El tor 18950 (ctx⁻, tcp⁻, OmpT⁺, OmpU⁻, OmpW⁺). Иммунизация мышей и взрослых кроликов НМ претовращала развитие холеры у экспериментальных животных, зараженных вирулентными штаммами возбудителя, причем этот эффект сохранялся до 5 месяцев поствакцинального периода (срок наблюдения) [6].

Антитела, полученные к белковым компонентам НМ бактериальных клеток, также обладают протективным эффектом [20, 25]. M. Das et al. [16] показали, что антисыворотки к белкам НМ холерного вибриона значительно снижают секрецию жидкости в петлях тонкого кишечника взрослых кроликов при заражении их гомологичным штаммом возбудителя холеры, а комбинация антисывороток к разным белкам — у зараженных гетерологичными вибрионами серотипа Огава и штаммов O139 животных.

В последние годы развивается направление по использованию белков наружных мембран для диагностики инфекционных болезней. Разработан быстрый MALDI-TOF MS анализ, который может выявлять эпидемические штаммы возбудителя холеры O1/O139 и другие патогенные вибрионы по различию в массе белка OmpU, аминокислотная последовательность которого у эпидемически значимых штаммов холеры является уникальной и высоко консервативной [29]. Для детекции эпидемически опасных штаммов холерных вибрионов Эль тор O1 и O139 серогрупп Евдокимовой В.В. и др. [1] получены моноклональные антитела, которые выявляют антигенные детерминанты белковой природы, представленные только у штаммов холерных вибрионов O1, O139 с генетической характеристикой ctx⁺ tcp⁻ и ctx⁻ tcp⁺.

Таким образом, знание строения и свойств поверхностных структур возбудителей может серьезно повлиять на разработку противоиных препаратов и вакцин, предназначенных для профилактики заболеваний, вызванных патогенными грамотрицательными бактериями, в том числе и холеры. Это тем более актуально, так как до сих пор отсутствуют отечественные комплексные вакцины, обеспечивающие одновременную защиту от эпидемически опасных штаммов *V. cholerae* двух серогрупп — O1 и O139. Кроме того, для производства химических холерных вакцин используют высоковирулентные штаммы, применение которых требует больших материальных затрат для обеспечения биологической безопасности. В этой связи, разработка вакцинных препаратов нового поколения, а также создание универсальной технологии их производства является важным и перспективным направлением научных исследований [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Моноклональные антитела к термостабильным поверхностным антигенам холерных вибрионов O1 и O139-серогруппы. Эпидемиол. и инф. болезни. 2015, 20 (3): 51-57.
2. Заднова С.П., Топорков А.В., Смирнова Н.И. Получение препарата токсин-регулируемых пилей адгезии холерного вибриона классического биовара и изучение его биохимических и иммунобиологических свойств. Проблемы особо опасных инфекций. 2003, 85: 69-75.
3. Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Колесник Р.С., Голубинский Е.П., Саппо С.Г., Иванова

- Т.А., Шкаруба Т.Т. Клеточные мембраны холерного вибриона как основа высокоиммунного вакцинного препарата против холеры. Бюллетень ВСНЦ ССО РАМН. 2004, 1: 127-132.
4. Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Иванова Т.А., Николаев В.Б., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Козлов С.Н. Методические рекомендации по получению высокоиммунного препарата наружных мембран холерного вибриона Эль тор. Иркутск, 2013.
 5. Мишанькин Б.Н., Иванова И.А., Дуванова О.В., Романова Л.В., Шипко Е.С., Омельченко Н.Д., Дорошенко Е.П., Беспалова И.А., Судьина Л.В., Филиппенко А.В. Мембранный белок OmpT холерного вибриона как возможный компонент химической вакцины. Цитокины и воспаление. 2014, 13 (1): 114.
 6. Омельченко Н.Д., Мишанькин Б.Н., Иванова И.А., Дуванова О.В., Романова Л.В., Шипко Е.С., Филиппенко А.В., Галичева А.Л., Беспалова И.А., Дорошенко Е.П. Изучение иммуногенных свойств наружных мембран холерного вибриона. Медицинская иммунология. 2015, 17 (3s): 120-121.
 7. Онищенко Г.Г., Попова А. Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербакова С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. Журн. микробиол. 2016, 1: 89-101.
 8. Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Вострикова О.П., Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф. Бактериальные порины как перспективные антигены для диагностики и вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний. Вестник ДВО РАН. 2004, 3: 35-44.
 9. Урбанович Л.Я. Закономерности и механизмы формирования естественной резистентности организма под влиянием иммуногенного препарата клеточных мембран холерного вибриона (экспериментальное исследование). Автореф. дисс. д-ра мед. наук. Иркутск, 2000.
 10. Шуковская Т.Н., Саяпина Л.В., Кутырев В.В. Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса. Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. 2009, 2 (45): 62-67.
 11. Asaduzzaman M., Ryan E.T., John M. et al. The major subunit of the toxin-coregulated pilus TcpA induces mucosal and systemic immunoglobulin A immune responses in patients with cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Infect. Immun.* 2005, 72 (8): 4448-4454.
 12. Bishop A.L., Schild S., Patimalla B. et al. Mucosal immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles provides maternal protection mediated by antilipopolysaccharide antibodies that inhibit bacterial motility. *Infect. Immun.* 2010, 78 (10): 4402-4420.
 13. Bishop A.L., Tarique A.A., Patimalla B, et al. Immunization of mice with *Vibrio cholerae* outer-membrane vesicles protects against hyperinfectious challenge and blocks transmission. *J. Infect. Dis.* 2012, 205 (3): 412-421.
 14. Chatterjee D., Chaudhuri K. Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.* 2011, 589 (9): 1357-1362.
 15. Chatterjee D., Chaudhuri K. *Vibrio cholerae* O395 outer membrane vesicles modulate intestinal epithelial cells in a NOD1 dependent manner and induce dendritic cell-mediated Th2/Th17 responses. *J. Biol. Chem.* 2013, 288 (6): 4299-4309.
 16. Das M., Chopra A. K., Cantu J. M., Peterson J. W. Antisera to selected outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* protect against challenge with homologous and heterologous strains of *V. cholerae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1998, 22: 303-308.
 17. Eko F.O., Mania-Pramanik J., Pais R. et al. *Vibrio cholerae* ghosts (VCG) exert immunomodulatory effect on dendritic cells for enhanced antigen presentation and induction of protective immunity. *BMC Immunol.* 2014, 15: 584-596.
 18. Eko F.O., Schukovskaya T., Lotzmanova E.Y. et al. Evaluation of the protective efficacy of *Vibrio cholerae* ghost (VCG) candidate vaccines in rabbits. *Vaccine.* 2003, 21: 3663-3674.
 19. Kiaie S., Abtahi H., Mosayebi G. et al. Recombinant toxin-coregulated pilus A (TcpA) as a candidate subunit cholera vaccine. *Iran J. Microbiol.* 2014, 6 (2): 68-73.
 20. Kubo A., Stephens R.S. Characterization and functional analysis of PorB, a *Chlamydia* porin and neutralizing target. *Mol. Microbiol.* 2000, 38 (4): 772-780.
 21. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host pathogen interaction. *Genes Dev.* 2005, 19: 2645-2655.
 22. Langemann T., Koller V.J., Muhammad A. et al. The bacterial ghost platform system production and applications. *Bioengineered Bugs.* 2010, 1 (5): 326-336.

23. Leitner D.R., Feichter S., Schild-Prüfert K. et al. Lipopolysaccharide modifications of a cholera vaccine candidate based on outer membrane vesicles reduce endotoxicity and reveal the major protective antigen. *Infect. Immun.* 2013, 81 (7): 2379-2793.
24. Lopez A.L., Gonzales M.L., Aldaba J.G., Nair G.B. Killed oral cholera vaccines: history, development and implementation challenges. *Ther. Adv. Vaccines.* 2014, 2 (5): 123-136.
25. Marandi M.V., Mittal K.R. Role of outer membrane protein H (OmpH) and OmpA specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 1997, 65 (11): 4502-4508.
26. McBroom A.J., Kuehn M.J. Release of outer membrane vesicles by gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiol.* 2007, 63 (2): 545-558.
27. Meeck M.D., Wade T.K., Taylor R.K., Wade W.F. Immune response genes modulate serologic responses to *Vibrio cholerae* TcpA pilin peptides. *Infect. Immun.* 2001, 69 (12): 7687-7694.
28. Olsen I., Amano A. Outer membrane vesicles offensive weapons or good samaritans? *J. Oral Microbiol.* 2015, 7: 27468: 1-9.
29. Paauw A., Trip H., Niemcewicz M., Sellek R. et al. OmpU as a biomarker for rapid discrimination between toxigenic and epidemic *Vibrio cholerae* O1/O139 and non-epidemic *Vibrio cholerae* in a modified MALDI-TOF MS assay. *BMC Microbiol.* 2014, 14: 158.
30. Pastor M., Esquisabel A., Talavera A. et al. An approach to cold chain free oral cholera vaccine: in vitro and in vivo characterization of *Vibrio cholerae* gastro-resistant microparticles. *Int. J. Pharm.* 2013, 448 (1): 247-258.
31. Price G.A., Holmes R.K. Evaluation of TcpF-A2-CTB chimera and evidence of additive protective efficacy of immunizing with TcpF and CTB in the suckling mouse model of cholera. *PLoS One.* 2012, 7(8): e42434.
32. Price G.A., Holmes R.K. Immunizing adult female mice with a TcpA-A2-CTB chimera provides a high level of protection for the pups in the infant mouse model of cholera. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, 8 (12): e3356.
33. Rollenhagen J.E., Kalsy A., Cerda F. et al. Transcutaneous immunization with toxin-coregulated pilin A induces protective immunity against *Vibrio cholerae* O1 El Tor challenge in mice. *Infect. Immun.* 2006, 74 (10): 5834-5839.
34. Roy N., Barman S., Ghosh A. et al. Immunogenicity and protective efficacy of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles in rabbit model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010, 60 (1): 18-27.
35. Sahu G.K., Chowdhury R., Das J. Heat shock response and heat shock protein antigens of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1994, 62 (12): 5624-5629.
36. Schild S., Nelson E.J., Bishop A.L., Camilli A. Characterization of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles as a candidate vaccine for cholera. *Infect. Immun.* 2009, 77 (1): 472-484.
37. Schild S., Nelson E.J., Camilli A. Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice. *Infect. Immun.* 2008, 76 (10): 4554-4563.
38. Sinha R., Koley H., Nag D. et al. Pentavalent outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* induce adaptive immune response and protective efficacy in both adult and passive suckling mice models. *Microbes Infect.* 2015, 17 (3): 215-27.

Поступила 10.01.17

Контактная информация: Иванова Инна Александровна, к.б.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117, р.т. (863)234-23-11

МИКРОБИОЦЕНОЗ, ИММУННАЯ СИСТЕМА И НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Российский национальный государственный медицинский университет им. Н.И.Пирогова, Москва

Формирование про-/эукариотических систем является общебиологическим механизмом становления и изменчивости фенотипа растений, животных, человека под воздействием внешней среды, т.е. становления адаптивной потенции носителя к условиям внешней среды, что существенно повышает «биологический статус» прокариотических структур в обеспечении жизнедеятельности организма носителя. Заметная роль микробиоценоза в становлении фенотипа носителя, иммунологическая толерантность (иммунологическое программирование) как основа формирования индивидуальных про-/эукариотических взаимодействий в перинатальном возрасте, доминирующая роль материнского влияния в этом процессе, с одной стороны, изменчивость микробиоценоза под влиянием внешних стрессорных воздействий, с другой, позволяет рассматривать про-/эукариотические взаимодействия как возможный механизм перинатального программирования и эпигенетического наследования и, следовательно, как один из возможных подходов коррекции хронической и врожденной патологии. Это указывает на необходимость повышения контроля за становлением микробиоценоза у детей, совершенствования методов его оценки и коррекции.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 116—126

Ключевые слова: микробиоценоз, иммунологическая толерантность, эпигенетическое наследование, перинатальное программирование, мичуринская биология

D.A.Voevodin¹, G.N.Rozanova², A.V.Poddubikov¹, N.A.Mikhailova¹

MICROBIOCENOSIS, IMMUNE SYSTEM AND HEREDITY

¹Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, ²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The formation of pro-/eukaryotic systems is the general biological mechanism of formation and variability of the phenotype of plants, animals, human beings under the influence of external wednesday, i.e. formation of adaptive potency conditions to external wednesday that increases the «biological status» prokaryotic structures in sustaining body health. Prominent role in the formation of the phenotype of micro media, immunological tolerance (immunological programming), as a basis for the formation of individual pro-/eukaryotic interactions in perinatal age, the dominant role of maternal influence in this process on the one hand, micro-variability due to external stress impact on the other, makes it possible to consider pro-/eukaryotic interaction as a possible mechanism of perinatal programming and epigenetics inheritance and therefore, as one possible approach for correction of chronic and congenital pathology. This points to the need to improve monitoring of the formation microbiocenosis of children, improve the methods of assessment and correction.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 116—126

Key words: microbiocenosis, immune tolerance, epigenetics inheritance, prenatal programming, michurinskaja biology

Проблема про-/эукариотических взаимодействий привлекает внимание специалистов разных областей биологии и медицины. Практически одновременно было предложено несколько положений, в которых, как в зеркале, отразилась профессиональ-

ная принадлежность авторов: ассоциативный симбиоз [7], про-/эукариотический химеризм [22], симбиогенетика [26]. На наш взгляд, различия в сути предлагаемой терминологии если и существуют, то не носят принципиального характера.

Микробиологи, «уравнивая в правах» про- и эукариотические структуры, сформулировали положение об ассоциативном симбиозе, т.е. тесном взаимодействии двух систем, по сути, двух организмов (организма и квазиорганизма), сосуществующих в целостном организме человека (носителя) с проявлениями взаимного влияния [7].

Медиками предложено понятие о про-/эукариотическом химеризме организма человека (медицина хомоцентрична), по которому в целостном организме про- и эукариотические системы функционируют как единое целое (функциональная химера), сформулировано положение о микробиоценозе как экстракорпоральной, цитокиноподобной, негенетически наследуемой регуляторной системе организма-носителя, т.е. про-/эукариотические химеры обладают способностью воспроизводства себе подобных химер [8, 22]. Необходимо отметить, что ранее подобная система про-/эукариотических взаимодействий была показана для растений. Парадокс, но способность продуцировать гормоны растений (цитокинины и ауксины) первоначально была выявлена у сапрофитной микрофлоры, и только много позже способность продукции этих агентов была показана для самих растений. По нашему мнению, тесное функциональное взаимодействие про- и эукариотических систем в сочетании с искусственным отбором может являться основой становления сортности у растений, породности и линейности у животных. Отсюда неустойчивость породных, линейных и сортовых характеристик при половом размножении, необходимость дополнительных усилий для их поддержания: например, формирование маточного стада для поддержания породы, создание особо благоприятных агротехнических условий при выращивании растений на семя.

Близкое положение высказано генетиками. Полагая, что фенотип целостного организма является совокупным отражением геномов как эукариот, так и прокариот, предложено понятие о симбиогеноме. «Развитие симбиозов обеспечивает формирование надорганизменных систем наследственности (симбиогеномов). Происходящее при этом развитие может быть описано в терминах эпигенетики, когда микросимбионты ... включаются в репродуктивный цикл хозяина, обеспечивая стабильное поддержание новых адаптаций ...: вновь сформированный симбиогеном приобретает свойства системы наследования благоприятных признаков [26].» Мы присоединяемся к высказанному положению, но с оговоркой. Наследуемость микросимбионтов в условиях искусственного отбора, т.е. при возникновении организмов, неспособных существовать без внешней поддержки (медицина, сельскохозяйственное животноводство и растениеводство), обеспечивает поддержание не только новых адаптаций и благоприятных признаков, но и дисадаптаций и неблагоприятных признаков: в сельском хозяйстве это повышенная продуктивность, но и повышенная уязвимость «культурных» растений и пород животных, в медицине — наследуемая склонность к возникновению патологических состояний. По нашему мнению, сельскохозяйственные модели наиболее близки к медицине как переменные (по «клиническому» проявлению) модели долгосрочного прогнозирования. Кроме того, в сельскохозяйственных моделях, также как в медицине, целью является длительное продуктивное физическое благополучие особи, в отличие от экспериментальных моделей, в которых, как правило, оценивается отвлеченный показатель с последующей, не всегда оправданной, экстраполяцией.

Под эпигенетическим наследованием (ЭН) понимают способность наследования приобретенных признаков. Полагают, что процесс связан с потенциально обратимыми изменениями в генетическом коде (метилование, ацетилирование участков ДНК), происходящих под влиянием внешних воздействий, и не затрагивает первичной структуры ДНК. Понятие ЭН тесно сопряжено с понятием о перинатальном программировании (ПП). ПП — способность адаптивной реакции организма на внешние воздействия с формированием «адаптивного фенотипа» и его сохранением на протяжении всей жизни индивида, т.е. ПП это изменение, возникающее *de novo*, а ЭН — наследование возникших изменений.

Знак равенства, который ставят авторы [26] между симбиогенетикой и эпигенетикой, предполагает еще один механизм ЭН: не изменение в геноме носителя, а из-

менения в совокупном спектре (совокупном геноме) микробиологических агентов (микробиоценоз/дисбиоз), т.е. изменения в цитокиноподобной регуляторной системе носителя. Участие микробиологических агентов в формировании фенотипа хозяина объясняет многие положения ЭН и ПП: доминирующая роль материнского наследования (микробиоценоз наследуется от матери), относительная стойкость (у индивида) и, в то же время, обратимость (в потомстве) эпигенетических изменений, адаптивная (с оговорками) роль выявляемых изменений.

Введение положений о ЭН и ПП, обобщение результатов работ по изучению наследственности в упрощенном виде позволяет разделить наследственную информацию на две категории: (1) первично неизменяемая информация и (2) первично варибельная.

К первично неизменной относятся показатели морфогенеза: любой живой организм порождает только себе подобных. Особенно внимательно, по понятным причинам, к морфогенезу относятся медики, считающие недопустимыми (как минимум настораживающими) малейшие отклонения в морфогенезе, в случае появления таковых они расцениваются как малые уродства (стигмы). Нередко очевидные стигмы сочетаются со скрытыми нарушениями морфогенеза, возможное наличие последних и вызывает особое беспокойство.

К первично варибельным, как полагают, относятся изменения обменных процессов, вызываемые внешними воздействиями в период перинатального развития индивида и направленные на адаптацию индивида к условиям внешней среды, т.е. ПП следует рассматривать как нормальный, неотъемлемый компонент становления организма человека (животных, растений), его адекватного взаимодействия с внешней средой. При этом вновь приобретенные характеристики как отражение нормальной адаптивной приспособляемости с высокой долей вероятности могут проявляться и в последующих поколениях. Влияние внешней среды на наследственную информацию со способностью ее изменения, наследуемость приобретенных изменений в настоящий момент послужило основой зарождения новой науки «эпигенетики».

Термин «эпигенетика» был предложен в середине 40-х годов XX века британским эмбриологом и морфологом К. Уолдингтоном и первоначально, по задумке автора, отражал процесс формирования из одноклеточного зародыша многоклеточного организма, состоящего из морфофункционально гетерогенных органов и клеток, т.е. отражал детерминированный (у человека не допускающий вариаций) процесс морфогенеза. Экспериментальные модели К. Уолдингтона это модели врожденных уродств, не имеющие какого-либо отношения к процессам адаптации [27]. Поэтому термин «эпигенетика» в контексте явления ПП может быть принят только при условии отсутствия более правомерной терминологии, предложенной ранее, а историю открытия и изучения ПП следует исчислять не с конца XX века, а отнести, по меньшей мере, на столетие раньше.

Нельзя утверждать, что процесс морфогенеза полностью свободен от внешних воздействий. Давно и хорошо известны уродующие эффекты радиационного излучения, химических и инфекционных агентов. Однако нельзя ставить знак равенства между травмирующим (патологическим) воздействием радиации и адаптивной (нормальной) реакцией ПП.

В отечественной литературе приходится сталкиваться с высказываниями сожаления о малом числе публикаций на русском языке по проблемам ПП и ЭН [10]. Это не совсем так. Именно отечественные авторы явились основоположниками этих направлений в биологии, опередив западную науку по животным моделям на пятьдесят, а по растительным — на сто лет. Поэтому в представленный выше перечень про-/эукариотических взаимодействий, по нашему мнению, следует включить открытые более ста лет назад И.В. Мичуриным явления «ментора», «вегетативной гибридизации» (ВГ), «воспитания» (аналог современного термина ПП), сформировавшееся в отечественном животноводстве положение о «маточном семействе», т.е. доминирующей роли материнской наследственности в формировании породных (потребительских) характеристик. Эти явления легли в основу общебиологической дисциплины «мичуринская биология», изучавшей влияние внешней среды на процессы наследования, превратившей отвлеченный тезис Ламарка в тезис-инструмент

с активным его использованием для выведения новых сортов растений и пород животных. Совокупность явлений, происходящих при этом в онтогенетически юных растительных и животных организмах, укладывается в современные понятия о ПП и ЭН.

Филогенетическая близость растительных и животных моделей как многоклеточных эукариот подтверждается структурной схожестью про-/эукариотических систем: выделение микрофлоры ризосферы и ризоплана у растений, проростковой и пристеночной микрофлоры у животных соответственно; способностью перекрестной персистенции и взаимодействия: источником инфекционного заражения человека могут быть эндوفиты растений [21], хорошо известна способность микрофлоры животных синтезировать аналоги растительных гормонов. Структурно-биологическая близость растительных и животных моделей указывает на общебиологическое значение про-/эукариотических интегральных систем, что существенно повышает «биологический статус» прокариотических структур в обеспечении жизнедеятельности организма носителя, позволяет использовать растительные модели для лучшего понимания про-/эукариотических взаимодействий в организме животных, и наоборот.

Например, много споров велось и ведется вокруг проблемы ВГ (вегетативная гибридизация). Возможно ли подобное явление? Однако признание явления ПП автоматически снимает этот вопрос, положительно отвечая на него. Нередко ВГ сравнивают с трансплантацией. Но это принципиально неверно. Утверждая подобное, авторы, ориентируясь на внешнюю схожесть манипуляций, пренебрегают сутью явления. С трансплантацией передается функция органа, с утратой трансплантата, утрачивается и функция, при ВГ передается «информация». Какая «информация» может передаваться контактно?

При ВГ как методе воспитания в результате тесного контакта идет передача интересующих нас признаков (например, крупноплодность) с онтогенетически зрелого (ментор) на онтогенетически незрелый, т.е. находящийся в возрасте ПП, организм [9]. По мнению И.В. Мичурина, юный возраст реципиента — ключевое условие образования ВГ. Контактная передача информации и является сутью менторского воспитания, с разрывом контакта информация не исчезает. Используя менторские воздействия, И.В. Мичурин предложил инструмент контролируемого (фенотип ментора известен) варьирования характеристиками юного организма. В естественных условиях роль ментора (источника информации) для растений выполняют почвенно-климатические условия (экосистема), в которых случайно может оказаться семя растения, т.е. ПП это возможность адаптации к конкретным микроусловиям произрастания. Отсюда известная способность адаптации (интродукции) растений посевом семян, комплекс агротехнических приемов (воспитание) как средство фенотип модулирующих воздействий.

Какие же механизмы могут объединять столь разные, на первый взгляд, модели: питание беременных женщин, самок животных и маточных растений, грудное вскармливание (ГВ), ВГ и агротехническое воспитание семян? По нашему мнению, все эти явления объединены общим процессом формирования ассоциативного симбиоза, а метод ментора в растениеводстве не имеет принципиальных отличий от менторского воздействия кормилицы, установленного для животных и человека. ВГ в широком смысле, это модель естественного общебиологического процесса — контактной передачи наследуемой адаптивной «информации» с формированием индивидуальной экосистемы, со становлением ассоциативного симбиоза/симбиогенома.

Современный термин (явление) «перинатальное программирование» является не более чем аналогом термина (явления) «воспитание», принятого в мичуринской биологии с оговоркой: термин «ПП» — описательный, а «воспитание» — руководство к действию.

Смена моделей, терминологические изменения, недостаточное знание истории биологии порождают иллюзию приоритета.

К сожалению, своевременная недооценка работ сторонников мичуринской биологии породила методологически ошибочные (с медицинских позиций) представления, приведшие к широкому распространению так называемых «болезней цивилизации» у человека. Сельскохозяйственные животные и растения оказались подвержены

этим «болезням» задолго до человека, возникла уникальная ситуация — медицинская модель проблемы разработана раньше, чем сформировалась сама проблема. К сожалению, медики не смогли воспользоваться предоставленным шансом.

Например, признанной моделью *in vivo* ПП и ЭН является метаболический синдром, возникающий у потомства в результате неадекватного питания беременной женщины. Но роль неадекватного питания в развитии метаболического синдрома у животных была показана на пятьдесят лет раньше, чем у человека. С целью получения высокопродуктивного (рентабельного) потомства применялось и применяется избыточное питание беременных коров [28] — фетальное программирование. Такой подход с позиций современной медицины сомнителен, хотя ранее попытки делались, но оправдан с позиций сельскохозяйственного производства, поскольку за счет анаболической реакции (акселерации) увеличивает выход товарной продукции. Но «оправдан» до определенных пределов: «Животные при интенсивном ведении животноводства более восприимчивы к действию неблагоприятных факторов внешней среды. При этом высокопродуктивные животные чувствительнее к негативному действию стресс-факторов» [20]. Вслед за отечественными животноводами по этому пути пошли все производители молочной продукции, в результате основной проблемой мирового молочного животноводства стала массовая выбраковка молодых коров (срыв адаптации) в возрасте 5 — 7 лактации (7 — 9 лет), т.е. при выходе на пик продуктивности.

Микробиоценоз как наследуемый признак. Микробиоценозы естественных полостей человека, с определенными оговорками, можно рассматривать как (1) фактор внешней среды (фактор внутренней экологии), (2) «наследуемый» признак (микробиоценоз новорожденного формируется под воздействием microbiоценозов ближайшего окружения, прежде всего матери) [11, 16, 17]. При этом ряд данных позволяет предположить, что свойства microbiоценоза как «унаследованного признака» сохраняются на протяжении всей жизни индивида и проявляют себя в формировании патологии всех возрастных групп: «...нет ни одного биохимического процесса, ни одной функции живых организмов, которые бы осуществлялись без прямого или опосредованного участия в них симбиотических микроорганизмов[29]».

Дуализм microbiоценоза как фактора внешней среды и фактора внутренней экологии обеспечивает возможность мобильности человека и животных, их высокую адаптивную способность к различным условиям внешней среды (человек носит «свою экологию» с собой), а наследуемость microbiоценоза, его участие в реализации различных функций организма позволяет рассматривать microbiоценоз как фактор ПП и ЭН.

Признанной системой взаимодействия макроорганизма и microbiоценозов является симбиоз. Однако симбиотическая система взаимоотношений сложилась не одномоментно, а является результатом длительного периода естественного отбора, в процессе которого microbiологические ассоциации, обладающие повышенной паразитарной активностью, естественным образом исключались из-за ускоренного разрушения среды обитания — гибели хозяина. В XX столетии это соотношение было в значительной степени нарушено по многим объективным и субъективным причинам. Не последнюю роль в этом процессе сыграли ошибочные медицинские направления: недооценка роли грудного вскармливания как физиологического фактора противoinфекционной защиты и протектора формирования нормальных microbiоценозов [13], раздельное содержание мать-ребенок в роддомах, увлечение заменителями грудного молока и пр. По данным литературы в настоящий момент искусственное вскармливание (ИВ) рассматривается как фактор риска развития язвенного колита, болезни Крона [37], сахарного диабета 1 типа [38, 39], аллергической патологии [16], структурно-функциональных изменений щитовидной железы [33] и нарушений нервно-психического развития у детей 1 года жизни [18]. Несомненно, что со временем этот перечень будет только расширяться.

Эти обстоятельства послужили причиной искажения биологических взаимоотношений мать-ребенок, усилению случайного (часто негативного) [12] компонента в формировании microbiоценозов естественных полостей. Следствием чего, явилась широкая распространенность состояния дисбактериоза, выявляемость которого у детей первого года жизни по разным данным составляет от 80 до 100%.

Важные параллели прослеживаются при сопоставлении времени возникновения определенных медико-социальных явлений и доминирующей на конкретном отрезке времени медицинской политики. На 50-е годы прошлого века пришелся бурный рост индустрии производства антибиотиков и широкого их применения в клинике, сделаны первые попытки широкомасштабного применения продуктов, позволяющих отказаться от естественного вскармливания, т.е. введение двух факторов, оказывающих наибольшее воздействие на эндогенные экосистемы.

К этому же периоду относится возникновение тезиса о пользе искусственного вскармливания. Основанием для выдвижения этого тезиса послужили клинические наблюдения, показавшие, что дети раннего возраста, как и сельскохозяйственные животные, находящиеся на ИВ, быстрее своих сверстников прибавляют в массовых показателях. Поэтому не случайно в 60 — 70-е годы XX столетия формируется такое явление подросткового возраста как акселерация.

Потребовалось сорок лет для доказательства пагубности этого тезиса. Дальнейшие более пристальные наблюдения показали, что опережение сроков развития у детей с ИВ во многих случаях сменяется его отставанием с повышением частоты острой и хронической патологии [24].

Подобное явление наблюдали и у детей с хронической патологией, что позволяет предполагать наличие дисбиоза как предрасполагающего фактора. Было отмечено, что на момент манифестации заболевания дети этой группы, как правило, опережают своих здоровых сверстников по показателям физического развития [4], которое по мере прогрессирования патологического процесса сменяется отставанием.

Вероятно, в приведенных ситуациях мы наблюдаем закономерную активацию анаболических механизмов как проявления попытки компенсировать негативные последствия патологического процесса, т.е. опережение физического (психологического) развития является отражением скрытого (компенсированного) этапа патологического процесса, который с высокой вероятностью может вылиться в развернутое заболевание. Поэтому закономерно, что нездоровое поколение 60 — 70-х годов стало родителями большого поколения 90 — 2000-х.

Чем же обусловлено влияние матери, кормилицы, ГВ на становление обменных процессов ребенка, что может передаваться ребенку через контакт с матерью или кормилицей? Ответить на этот вопрос только с доминирующих позиций нутрициологии, традиционного понимания ПП или ЭН обменных процессов не представляется возможным.

Наиболее обсуждаемой моделью ПП и ЭН у человека является метаболический синдром. С одной стороны, убедительно показано, что метаболический синдром может формироваться *de novo* при нарушении внутриутробного питания (фетальное программирование) [10], наследоваться от матерей (ЭН) [34, 35], а с другой, оказалось, что негативные проявления метаболического синдрома (как и многих других состояний) нивелируются дисбиозом корректирующей терапией [5, 36]. За счет чего же это происходит? За счет гипоталамического и/или эпигенетического «перепрограммирования», только уже в зрелом возрасте? Маловероятно.

Таким образом, микробиоценоз (дисбиоз) как стабильный показатель, возникающий *de novo* и вызывающий стойкие изменения обменных процессов, можно рассматривать как еще один из возможных механизмов ПП, а способность передаваться по наследству — как фактор ЭН и его ведущей роли (в противовес положению о массовых генетических мутациях) в росте хронической патологии у детей.

Микробиоценоз матери оказывает влияние на состояние здоровья ребенка не только после рождения, но и в период беременности. Очевидно, что токсикоинфекционный процесс будет сопровождаться повышенным дистрофическим воздействием на плод с рождением заведомо ослабленного ребенка [12]. Многочисленные эпидемиологические наблюдения выявили взаимосвязь между формированием синдрома задержки внутриутробного развития (ЗВУР) и склонностью к развитию метаболического синдрома, аллергического процесса, остеопороза и пр. В настоящий момент ЗВУР рассматривается как одно из проявлений феномена фетального программирования [19]. В своей практике мы замечали важную особенность: у некоторых женщин на фоне беременности резко ухудшаются показатели кишечного микробио-

ценоза с самопроизвольной положительной динамикой через 2 — 4 месяца после родов. Это является причиной, по которой не всегда удается проследить роль микробиоценоза матери в формировании кишечного дисбиоза у детей при ретроспективном обследовании. Состояние материнского микробиоценоза как возможный источник инфицирования необходимо учитывать и при коррекции дисбактериоза у детей [6].

В настоящий момент активно обсуждается концепция генетической детерминированности заболеваний. Однако многие фактические данные, полученные при наблюдении за больными, не укладываются в узкие рамки генетической концепции, что послужило основой для выдвижения тезиса о лимитирующем действии факторов внешней среды на развитие врожденного патологического процесса [14, 25]. Таким разрешающим фактором внешней среды может выступать персистирующий инфекционный агент [32, 40], в том числе, можно предположить, компоненты микробиологических систем естественных полостей организма либо микробиоценоза в целом. При этом роль процессов горизонтального наследования и связанных с этим вторичных иммунологических нарушений в развитии наследственной патологии может быть более велика, чем это предполагается в настоящий момент, а ранний период формирования заставляет внимательнее рассмотреть вопрос о возможной этиологической роли дисбактериоза в манифестации хронической неинфекционной (или неинфекционной?), патологии.

Иммунологическое программирование. С иммунологических позиций процесс формирования кишечного микробиоценоза как состояния предрасположенности к тому или иному микробиологическому носительству начинается задолго до рождения ребенка, и начинается он с процесса формирования иммунологической толерантности [30], т.е. снижения ответственности иммунной системы плода, а в последующем новорожденного на микробиологические агенты, персистирующие в организме матери [8].

Вопрос о проницаемости плаценты для микроорганизмов, персистирующих в организме матери, практически не стоит. Способность большинства (по крайней мере) микроорганизмов к внутриклеточному паразитированию, с одной стороны, а с другой, феномен химеризма плода и новорожденных (проникновение клеток матери в организм плода, и наоборот) снимает вопрос — был ли контакт иммунной системы плода с микробиологическими агентами или нет, ответ только один — был. Примечательно, что при осложненной беременности феномен химеризма более выражен [23].

Формирование состояния толерантности возможно и после рождения ребенка. Наиболее опасным в этом отношении является неонатальный период [30], т.е. период постнатального программирования, отсюда неоднократно отмеченная в литературе роль полноценного ГВ как фактора долгосрочного поддержания физического благополучия индивида.

Иммунологическая толерантность неизбежно приводит к ослаблению барьерной и детоксицирующей функции по отношению к толерогену как следствие к изменению соотношения детоксикация/токсигенность в пользу относительного повышения токсигенности даже для слабовирулентных (условно патогенных) агентов с повышением их этиопатогенетической значимости.

Таким образом, иммунологическая толерантность (иммунологическое программирование в терминах ПП и ЭН), порождая условия для микробиологического паразитирования, протекающего в состоянии иммунологической (воспалительной) ареактивности, может породить иллюзию генетической обусловленности (предрасположенности) того или иного заболевания.

По нашему мнению, стабильные про-/эукариотические интегральные системы и иммунологическая толерантность (система «свой-чужой») могут являться основой ПП и ЭН. Формирование системы «свой-чужой» — та поддержка, которую оказывает макроорганизм «своей» микрофлоре, крайне затрудняет коррекцию дисбиоза, делает достижение стойкого результата, с позиций сегодняшних знаний и умений, практически невозможным. Это обстоятельство диктует необходимость повышенного внимания к профилактике дисбиоза, проводимой на этапах его становления.

ПП условно, по моменту рождения, делят на два этапа: внутриутробное (феталь-

ное) и постнатальное программирование. Также в два этапа происходит становление микробиоценоза. За «основу» берется микробиоценоз матери (отсюда доминирующая роль материнского начала в ЭН) как структуры, «положительно зарекомендовавшей себя» в обеспечении жизнеспособности носителя (производителя). На втором этапе происходит как бы «доработка» этого процесса с учетом иных внешних воздействий. Понятно, что чем более сбалансирована интегральная структура материнского организма, тем более устойчива (адаптивна) система мать/плод к внешним воздействиям (инфекционным, алиментарным, психоэмоциональным), тем менее плод подвержен внешним воздействиям. Это положение указывает на необходимость контроля становления микробиоценоза плода, начиная с внутриутробного развития (контроль и профилактика дисбиоза у беременных), и объясняет большую устойчивость одних человеческих популяций (как более сохранных) по сравнению с другими на негативные внешние воздействия. Например, резкое увеличение метаболического синдрома среди рожденных во время второй мировой войны в Бельгии (голод матерей), но отсутствие подобного негативного эффекта среди рожденных в блокадном Ленинграде [10].

Этот тезис находит косвенное подтверждение в литературе. Показано, что неонатальные заболевания увеличивают риск развития сахарного диабета 1 типа [39]. Напротив, ГВ, являясь в какой-то степени средством «заместительной противинфекционной иммунотерапии» и протектором становления иммунореактивности в раннем возрасте, фактором формирования эндогенных микробиологических систем, способно оказывать заметное позитивное влияние на формирование клинической картины как приобретенного [16, 18, 33, 37 — 39], так и наследственного патологического процесса.

Результаты работ, выполненных в 80 — 90 годы XX века, послужили основанием для развертывания активной пропаганды ГВ на современном этапе. Однако оказалось, что в настоящее время проблема ГВ не столь проста и однозначна. В работах последних лет было проведено прямое сравнение роли ГВ и ИВ на физическое развитие детей: в возрасте 6 месяцев различия были незначительны, в возрасте одного года различий выявлено не было [1]. К концу первого полугодия отставание в нервно-психическом развитии у детей на ГВ отмечалось в 19,8% случаев, при смешанном и ИВ в 33% и 31% соответственно. К двум годам отставание нервно-психического развития постепенно нивелировалось вне зависимости от вида вскармливания [1]. Подобная закономерность прослеживается и по формированию микробиоценоза. «Анализ микрофлоры кишечника детей грудного возраста выявил микробиологические нарушения различной степени у всех обследованных вне зависимости от вскармливания. В подавляющем большинстве (85,4±1%) отмечена II и III степени микробиологических нарушений.» В возрасте трех месяцев недостаток или отсутствие бифидофлоры отмечались у 73,6% детей, находящихся на ГВ и 80,1% на ИВ. К возрасту одного года ситуация несколько улучшалась и составляла 25,1% у детей на смешанном вскармливании и 63,3% на ИВ [2].

Обращаем внимание, что в представленных работах не было выявлено существенных различий в физическом развитии и показателях микробиоценоза у детей, находящихся на ИВ и ГВ, т.е. положительное протективное влияние ГВ на становление этих показателей в разных возрастных группах либо сглажено, либо практически отсутствует.

Таким образом, в последние годы наметилась негативная тенденция: снижение положительного протективного эффекта ГВ на формирование нормального микробиоценоза и здоровья детей первого года жизни. Это не значит, что протективный эффект отсутствует как таковой, но в связи с изменением состояния матерей в популяции (дисбиоз беременных и кормилиц) положительный вектор сменяется отрицательным. Есть основания полагать, что при сохранении существующего положения, тенденция будет только нарастать, а отдаленные последствия этого процесса будут принимать все более пагубный характер.

К сожалению, должной оценки эти наблюдения не получили, а они очень важны, поскольку указывают на принципиальное изменение ситуации. В 50 — 60 годах XX века дисбактериоз был относительно редким явлением, в большинстве случаев фор-

мировался *de novo*, а потому легче поддавался коррекции. В настоящий момент преобладает врожденный (унаследованный от матери) дисбиоз — состояние устойчивое, даже длительное использование средств коррекции дает только временное улучшение. Кроме того, источником грудного молока для ребенка является мать, часто компрометирующая по данному показателю. Можно задаться вопросом: способна ли компрометирующая мать (кормилица) выкормить здорового ребенка? Безусловно, нет. Это хорошо знали наши предшественники и широко использовали метод смены кормилицы для реабилитации (профилактики) детей, рожденных компрометированными матерями — сто лет назад кормилицы в привилегированных семьях имели не только социальное, но и медицинское значение.

Опыт (ныне забытый) медицинских наблюдений, достаточно многочисленные наблюдения на животных показали, что физическое благополучие, становление особенностей обменных процессов молодой особи зависят не только от того, чем вскармливала, но и от того, кто вскармливал, т.е. от состояния здоровья, особенностей обменных процессов матери (кормилицы). Например, закономерное влияние кормилицы на становление обменных процессов сосунка использовалось в животноводстве для выведения новых пород: в работах проводимых в 50 — 60-е годы XX века на базе опытного хозяйства АН СССР «Горки Ленинские» показано влияние жирномолочной коровы-кормилицы на становление уровня жирномолочности (т.е. изменение липидного обмена) у воспитуемой телки, с последующим отбором по интересующему признаку и формированием маточного стада как основы будущей породы [3]. Правомерность полученных результатов была подтверждена в более поздних наблюдениях. Например, смена кормилиц у крысят линии НИСАГ, склонных к наследственной артериальной гипертензии, на Вистар в последующем задерживает формирование ультраструктурных гистологических нарушений в миокарде [15], способствует смягчению эндокринных нарушений [31]. Таким образом, смена кормилицы (донорское молоко) может быть использована для профилактики и коррекции врожденных и наследственных состояний, но контроль за состоянием здоровья женщин-доноров должен быть усилен, поскольку использование молока от компрометированных доноров может иметь негативные последствия.

При ГВ, в результате близкого физического контакта, помимо передачи нутриентов происходит передача «информации», влияющей на становление обменных процессов индивида, определяющей характер его адаптивных реакций на протяжении всей жизни. Собственно тот же процесс происходит при ВГ у растений, при которой роль «кормилицы» (источника информации) выполняет ментор, т.е. онтогенетически зрелая особь с известными (желательными, как жирномолочность у коров) фенотипическими характеристиками. То же происходит у семян растений при изменении агрофона: бедный агротехнический фон (буквально «земля-кормилица») повышает (воспитывает) зимостойкость, богатый понижает ее, но богатый фон повышает «культурность» получаемых растений. Понятно, что «богатый агрофон» богат не только по нутриентам, но и по количеству и разнообразию микрофлоры. Отсюда предложенный И.В. Мичуриным двухэтапный подход воспитания семян.

Продолжать перечисление параллелей можно до бесконечности, приводя их мы хотим в очередной раз подчеркнуть общебиологический характер становления про-/эукариотических интегральных систем, колоссальную роль микросимбионтов в становлении фенотипа и поддержании физического благополучия носителя.

Приведенные соображения заставляют внимательнее присмотреться к микробиоценозу как к наследуемому фактору, определяющему физическое благополучие индивида, способному приводить (дисбиоз) к стойкому дисметаболизирующему (программирующему, стрессирующему) воздействию на организм носителя, поскольку такой подход порождает еще одно возможное направление для профилактики и коррекции патологических состояний.

Поэтому нам кажется оправданной необходимость сосредоточения дополнительных усилий для решения проблемы дисбиоза у человека. Разрабатываемый комплекс мер должен учитывать все возрастные категории, начиная от момента закладки микробиоценоза у плода и новорожденного до коррекции возрастного дисбиоза у лиц зрелого возраста. Необходимы меры по оздоровлению девочек и женщин детородного

возраста, ревизия критериев отбора женщин-доноров грудного молока, разработка эффективных средств и методов профилактики и коррекции дисбиоза, развитие идеологии и методологии проблемы как первоосновы практических шагов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абольян Л.В., Бердикова Т.К., Ломовских В.Е., Врублевская Е.Ю., Ерохина С.А., Паршина Л.М., Жилиева Т.Д., Малеванная Т.В., Полищук Н.П., Яковлева Т.Н. Значение исключительно грудного вскармливания для здоровья, физического и нервно-психического развития детей первого года жизни (на примере г. Волгоград). Педиатрия. 2005, 5: 53-57.
2. Алексанина Н.В., Твердохлебова Т.И. Динамика параметров микробиоценоза кишечника детей на протяжении первого года жизни в зависимости от характера вскармливания. Педиатрия. 2016, 95 (1): 156-157.
3. Беляев Д.К. О некоторых философских вопросах генетики. Новосибирск, 1965. http://www.philosophy.nsc.ru/journals/philscience/5_99/09_belyaev.htm.
4. Бойчук Е.Б., Ровда Ю.И., Тарасова О.Л., Блинова Н.Г., Подгорный А.Н., Ижмева Л.Н., Трофимов А.Ф. Темпы полового созревания и особенности функционального состояния нервной системы подростков с диффузным увеличением щитовидной железы. Педиатрия. 2000, 6: 59-61.
5. Бондаренко В.М., Малеев В.В., Лиходед В.Г. Кишечная микрофлора, ожирение и диабет 2 типа. Журн. микробиол. 2014, 3: 42-49.
6. Братонова М.З., Левин В.С., Крикунов В.П., Шибалкин В.Д. Болезнь Рейтера — этиология. Ревматология. 1983, 2: 62-65.
7. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург, УрО РАН, 2007.
8. Воеводин Д.А., Розанова Г.Н., Стенина М.А. Дисбактериоз и иммунопатологический процесс. Журн. микробиол. 2005, 2: 89-92.
9. Глущенко И.Е. Вегетативная гибридизация растений. М., ОГИЗ-СЕЛЬХОЗГИЗ, 1948.
10. Гржибовский А.М., Бигрен Л.О., Теддер Ю.Р. Внутритробное программирование хронических заболеваний взрослых. Экология человека. 2003, 5: 14-22.
11. Дешекина М.Ф., Коршунов В.М., Демин В.Ф., Холодова И.Н., Чернова Н.Д. Изучение формирования микрофлоры кишечника у новорожденных детей при совместном и раздельном пребывании с матерью. Педиатрия. 1990, 1: 13-17.
12. Дмитриева Н.В., Козлова В.В., Ткаченко Т.Г., Арнич Т.Р. Роль социальных и медицинских факторов в заболеваемости новорожденных. Вопр. охр. мат. и дет. 1991, 1: 3-7.
13. Елизарова И.П., Разумовская И.Н., Прозоровская К.Н., Тихонова И.С., Соколова З.П., Матвеева Н.К., Кудинова Т.И. Результаты изучения раннего грудного вскармливания новорожденных. Педиатрия 1984, 12: 10-13.
14. Иванов В.П. О роли наследственности и среды в проявлении неспецифической патологии детского возраста. Педиатрия. 1987, 10: 48-51.
15. Коростышевская И.М., Максимов В.Ф., Маркель А.Л., Филюшина Е.Е., Шмерлинг М.Д., Якобсон Г.С. Особенности строения миокарда у крыс с наследственной гипертензией, вскормленных нормотензивными самками. Булл. экспер. биол. 2001, 132 (9): 330-332.
16. Куваева И.Б., Ладодо К.С. Микробиологические и иммунные нарушения у детей. М., 1991.
17. Микельсаар М.Э., Кудрявцева Г.П., Сепп Э.В. Обсеменение новорожденных анаэробными и аэробными микроорганизмами в родильном доме. Вопр. охр. мат. дет. 1988, 3: 72.
18. Михеева И.Г., Курасова О.Б., Краснолобова С.А., Хачатрян Л.Г., Верещагина Т.Г., Ключник Т.П. Влияние грудного вскармливания на нервно-психическое развитие детей первого года жизни. Педиатрия 2003, 6: 83-85.
19. Нагаева Е.В., Ширяева Т.Ю. «Внутритробное программирование» гормонально-метаболических процессов и синдром задержки внутритробного развития. Пробл. эндокринол. 2010, 56 (6): 32-40.
20. Ноздрин Г.А., Иванова А.В. Теоретические и практические основы применения пробиотиков на основе бацилл в ветеринарии. Вестник НГАУ. 2011, 21 (5): 87-95.

21. Пушкарева В.И., Ермолаева С.А., Гиндбург А.Л. Роль техногенных и биологических факторов в распространении бактериальных инфекций пищевого происхождения. Журн. микробиол., 2014, 5: 111-118.
22. Розанова Г.Н., Воеводин Д.А. Случай эффективного использования пробиотиков в комплексной терапии тяжелой формы сахарного диабета 1-го типа при кишечном дисбактериозе. Клин. мед. 2008, 86 (1): 67-68.
23. Румянцев А.Г., Мареева Ю.М. Материнский микрохимеризм и его клиническое значение. Педиатрия, 2011, 90 (4): 6-11.
24. Сорвачева Т.Н., Пашкевич В.В., Конь И.Я. Сравнительная оценка состояния здоровья детей в раннем возрасте в зависимости от характера вскармливания на первом году жизни. Педиатрия, 2001 3: 72-76.
25. Старкова Н.Т. (ред.). Руководство по клинической эндокринологии. Спб, Питер Пресс, 1996.
26. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Эпигенетика экологических ниш. Эколог. ген. 2010, 8 (4): 30-38.
27. Уоддингтон К. Морфогенез и генетика. М., Мир, 1964.
28. Шаумян В.А. О положении в биологической науке. Стенографический отчет сессии ВАСХНИЛ 31 июля — 7 августа 1948 г. М., ОГИЗ-СЕЛЬХОЗГИЗ, 1948.
29. Шендоров Б.А. Медицинская микробная экология: некоторые итоги и перспективы исследования. Вестник РАМН. 2005, 12: 13-17.
30. Фонталин Л.Н., Певницкий Л.А. Иммунологическая толерантность. М., Медицина, 1978.
31. Якобсон Г.С., Антонов А.Р., Маркель А.Л., Амстиславский С.Я., Таранов А.Г., Якобсон М.Г. Влияние вскармливания гипертензивных крыс линии НИСАГ нормотензивными самками Вистар на развитие гипертензивного статуса. Бюлл. exper. биол. 2001, 132 (8): 145-148.
32. Asari S., Amino N., Horikawa M., Miyai K. Incidences of antibodies to *Yersinia enterocolitica*: high incidence of serotype 05 in autoimmune thyroid diseases in Japan. Endocrinol. Japan. 1989, 36 (3): 381-386.
33. Bohles H., Aschenbrenner M., Roth M. et al. Development of thyroid gland volume during the first three months of life in breast-fed versus iodine-free formula-fed infants. Clin. Invest. 1993, 71: 13-20.
34. Ekoe J.-M., Thomas F., Balkau B. et al. Effect of maternal diabetes on the pattern of selected insulin resistance syndrome parameters in normal glucose tolerant subjects of two algonquin Indian communities in Quebec. Diabetes Care. 1996, 19 (8): 822-826.
35. Groop L., Forsblom C., Lehtovirta M. et al. Metabolic consequences of a family history of NIDDM (The Botnia Study): Evidence for sex-specific parental effects. Diabetes. 1996, 45 (11): 1585-1593.
36. Honda K., Moto M., Uchida N. et al. Anti-diabetic effects of lactic acid bacteria in normal and type 2 diabetic mice. J. Clin. Biochem. Nutr. 2012, 51 (2): 96-101.
37. Koletzko S., Sherman P., Corey M. Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. Br. Med. J. 1989, 298: 1617-1618.
38. Mayer E.J., Hamman R.F., Gay E.C. Reduced risk of IDDM among breast-fed children. Diabetes. 1988, 37 (12): 1625-1632.
39. McKinney P.A., Parslow R., Gurney K.A. et al. Perinatal and neonatal determinants of childhood type 1 diabetes: A case-control study in Yorkshire, UK. Diabetes Care. 1999, 22 (6): 928-932.
40. Tomer Y., Davies T.F. Infection, thyroid disease, and autoimmunity. Endocrine Rev. 1993, 14: 107-120.

Поступила 29.11.16

Контактная информация: Воеводин Дмитрий Анатольевич, к.м.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-87-41

СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (ORIGINAL ARTICLES)

- Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Гасретова Т.Д., Сылка О.И., Тюкавкина С.Ю.* Антибиотикорезистентные штаммы недифтерийных коринебактерий3
Kharseeva, G.G., Voronina, N.A., Gasretova, T.D., Sylka, O.I., Tyukavkina, S.Yu. Antibiotics resistance of *Corynebacterium non diphtheriae* strains
- Селянская Н.А., Титова С.В., Головин С.Н., Егиазарян Л.А., Веркина Л.М., Тришина А.В.* Действие антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов Эль Тор8
Selyanskaya, N.A., Titova, S.V., Golovin, S.N., Egiazaryan, L.A., Verkina, L.M., Trishina, A.V. Effect of antibacterial preparations on *Vibrio cholerae* El Tor biofilms
- Иванова А.В., Попов Н.В., Куклев Е.В., Адамов А.К., Щербакова С.А.* Обзор эпидемиологической обстановки по геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС) на территории Российской Федерации за 1990 — 2015 гг.16
Ivanova, A.V., Popov, N.V., Kuklev, E.V., Adamov, A.K., Scherbakova, S.A. Review of epidemiologic situation on hemorrhagic fever with renal syndrome (HERS) in Russian Federation in 1990 — 2015
- Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Германчук В.Г., Девдариани З.Л., Кутырев В.В.* Подвидовая дифференциация штаммов *Yersinia pestis* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов22
Nikiforov, K.A., Oglodin, E.G., Kukleva, L.M., Eroshenko, G.A., Germanchuk, V.G., Devdariani, Z.L., Kutyrev, V.V. Subspecies differentiation of *Yersinia pestis* strains by PCR with hybridization-fluorescent detection
- Демидова Г.В., Соколова Е.П., Зюзина В.П., Рыкова В.А., Морозова И.В., Подладчикова О.Н., Тынянова В.И.* Влияние внехромосомных элементов наследственности на токсические свойства *Yersinia pestis*28
Demidova, G.V., Sokolova, E.P., Zyuzina, V.P., Rykova, V.A., Morozova, I.V., Podladchikova, O.N., Tynyanova, V.I. Effect of extrachromosomal elements of heredity on toxic properties of *Yersinia pestis*
- Бриль Г.Е., Егорова А.В., Бугаева И.О., Пономарев Г.В.* Влияние низкоинтенсивного красного лазера на рост штаммов *Staphylococcus aureus* и сенсibiliзирующий эффект фотодитазина34
Bril, G.E., Egorova, A.V., Bugaeva, I.O., Ponomarev, G.V. Effect of low-intensity red laser on growth of *Staphylococcus aureus* and sensitizing effect of photoditazin
- Костинов М.П., Лукачев И.В., Мещерякова А.К., Дмитриева Е.В., Ахматова Н.К., Хромова Е.А., Магаршак О.О., Сависько А.А.* Индукция эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета в процессе лечения топической формой рекомбинантного интерферона- $\alpha 2b$ при респираторных инфекциях у беременных38
Kostinov, M.P., Lukachev, I.V., Mescheryakova, A.K., Dmitrieva, E.V., Akhmatova, N.K., Khromova, E.A., Magarshak, O.O., Savisko, A.A. Induction of effectors of innate and adaptive immunity in the process of therapy of topic form of recombinant interferon- $\alpha 2b$ during respiratory infections in pregnant
- Ртищев А.А., Минтаев Р.Р., Кост В.Ю., Коптяева И.Б., Акопова И.И., Лисовская К.В., Маркушин С.Г.* Включение сайт-специфических мутаций в консервативные участки PA-гена приводит к аттенуации вирулентного штамма вируса гриппа А/WSN/3345
Rtischev, A.A., Mintaev, R.R., Kost, V.Yu., Koptyaeva, I.B., Akopova, I.I., Lisovskaya, K.V., Markushin, S.G. Inclusion of site-specific mutations into conservative segments of PA-gene results in attenuation of virulent influenza virus strain A/WSN/33
- Шиповалов А.В., Дурьманов А.Г., Петрова О.В., Иванова Е.В., Епанчинцева А.В., Святченко С.В., Мальцев С.В., Марченко В.Ю., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б., Ильичева Т.Н.* Анализ популяционного иммунитета к гриппу накануне эпидемических сезонов в 2014 г. и 2015 г.53

- Shipovalov, A.V., Durymanov, A.G., Petrova, O.V., Ivanova, E.V., Epanchintseva, A.V., Svyatchenko, S.V., Maltsev, S.V., Marchenko, V.Yu., Mikheev, V.N., Ryzhikov, A.B., Ilicheva, T.N.* Analysis of population immunity against influenza prior to 2014 and 2015 epidemic seasons
- Танальский Д.В., Петренев Д.Р., Храмченкова О.М., Дорошкевич А.С.* Антимикробная и противогрибковая активность экстрактов лишайников, распространенных на территории Беларуси 60
- Tapalsky, D.V., Petrenev, D.R., Khratchenkova, O.M., Doroshkevich, A.S.* Antimicrobial and antifungal activity of lichens prevalent in Belarus
- Александян Г.Б., Ахматова Э.А., Ахматова Н.К., Курбатова Е.А., Панченков Д.Н., Зверев В.В.* Баланс Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 цитокинов в послеоперационном периоде у пациентов со злокачественными опухолями печени 66
- Aleksanyan, G.B., Akhmatova, E.A., Akhmatova, N.K., Kurbatova, E.A., Panchenkov, D.N., Zverev, V.V.* Balance of Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 cytokines in post-operation period in patients with malignant tumor of liver
- Царев В.Н., Ипполитов Е.В., Николаева Е.Н.* Распространение генетических маркеров резистентности к антибиотикам у био пленко-формирующих штаммов облигатных и факультативных анаэробов 74
- Tsarev, V.N., Ippolitov, E.V., Nikolaeva, E.N.* Prevalence of genetic markers of resistance to antibiotics in biofilm-forming strains of obligate and elective anaerobes
- Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Остапович В.В.* Определение оптимальных режимов эксплуатации приборной базы для контроля атмосферного воздуха на наличие патогенных биологических агентов в модельных опытах 81
- Efremenko, D.V., Kuznetsova, I.V., Ostapovich, V.V.* Definition of the optimum modes of operation of air-monitoring instrumentation for detection of pathogenic biological agents in model experiments
- Семенов С.И., Федоров А.И., Осаковский В.Л., Максимова С.С., Платонов Ф.А.* Частота встречаемости полиморфных вариантов гена IL28B и генотипов вируса гепатита С у населения Якутии: клинические исходы 86
- Seменов, S.I., Fedorov, A.I., Osakovsky, V.L., Maksimova, S.S., Platonov, F.A.* Frequency of occurrence of polymorphic variants of IL28B gene and genotypes of hepatitis C virus in population of Yakutia: clinical outcomes
- Семенов С.И., Федоров А.И., Максимова С.С., Степанов К.М., Платонов Ф.А.* Сравнительная характеристика иммунного статуса больных хроническими формами вирусных гепатитов В, С, D и здоровых лиц 92
- Seменов, S.I., Fedorov, A.I., Maksimova, S.S., Stepanov, K.M., Platonov, F.A.* Comparative characteristics of immune status of patients with chronic forms of viral hepatitis B, C, D and healthy individuals
- Брико Н.И., Миндлина А.Я., Полибин Р.В., Галина Н.П., Горохова А.С., Ушанова А.В.* Оценка отношения к иммунопрофилактике различных групп населения Российской Федерации 98
- Briko, N.I., Mindlina, A.Ya., Polibin R.V., Galina, N.P., Gorokhova, A.S., Ushanova, A.V.* Assessment of attitudes towards immunization in different groups of population of the Russian Federation

ОБЗОРЫ (REVIEWS)

- Каминский Д.И., Лобанов В.В., Рожков К.К., Мазрухо А.Б.* Совершенствование питательных сред для выращивания некоторых возбудителей опасных инфекционных болезней 104
- Kaminsky, D.I., Lobanov, V.V., Rozhkov, K.K., Mazrukho, A.B.* Evaluation of nutrient media to grow some infection diseases causative agents
- Иванова И.А., Мишанькин Б.Н., Беспалова И.А., Омельченко Н.Д., Шипко Е.С., Филиппенко А.В.* Использование поверхностных структур холерного вибриона для специфической профилактики и диагностики холеры 110
- Ivanova, I.A., Mishankin, B.N., Bepalova, I.A., Omelchenko, N.D., Shipko, E.S., Filippenko, A.V.* Use of *Vibrio cholerae* surface structures for specific prophylaxis and diagnostics of cholera
- Воеводин Д.А., Розанова Г.Н., Поддубиков А.В., Михайлова Н.А.* Микробиоценоз, иммунная система и наследственность 116
- Voevodin, D.A., Rozanova, G.N., Poddubikov, A.V., Mikhailova, N.A.* Microbiocenosis, immune system and heredity

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

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

При направлении статей в ЖМЭИ авторам следует соблюдать следующие правила:

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

2. В выходных данных указывать инициалы и фамилии авторов (иностранных в иностранной транскрипции), название работы, учреждение, город. Статья должна быть подписана всеми авторами с указанием только для одного из авторов (для контактной информации) полных имени и отчества, места работы, 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.