

2015

# ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ



# Микробиология XXI века MALDI Biotyper®

## Система быстрой идентификации микроорганизмов MALDI Biotyper:

- Идентификация микроорганизмов за 1 минуту
- Открытая база данных клинически значимых микроорганизмов (более 2000 видов)
- Простой и удобный пользовательский интерфейс
- Применима для идентификации бактерий, дрожжей и грибов
- Прямая идентификация из биологических жидкостей
- Определение чувствительности к антибиотикам

Для получения более подробной информации и демонстрации систем обращайтесь к нам!

ООО „Брукер“  
г. Москва  
8(495) 517-9284  
8(495) 517-9285

[ms.rus@bruker.com](mailto:ms.rus@bruker.com)  
[www.bruker.com](http://www.bruker.com)

Реклама

# ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

июль–сентябрь  
2015, том 5

№ 3

*Журнал издается при участии Отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов по Санкт-Петербургу и Ленинградской области*

## Главный редактор

**Жебрун А.Б.**

д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, зав. лабораторией иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

## Заместитель главного редактора

**Тотолян Арег А.**

д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зам. директора по научной работе Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, зав. лабораторией молекулярной иммунологии и серозэпидемиологии, Санкт-Петербург, Россия

## Редакционная коллегия

**Апт А.С.**

д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

**Барбеито Л.**

д.м.н., профессор, директор Института Пастера, Монтевидео, Уругвай

**Брей П.**

д.б.н., профессор, директор Института Пастера в Лаосе, зав. лабораторией медицинской энтомологии и биологии переносчиков болезней, Вьентьян, Лаос

**Гинцбург А.Л.**

д.м.н., профессор, академик РАН, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

**Дозо Ч.**

д.б.н., профессор, директор Национального научно-исследовательского центра — Институт имени Арманда Фраппьера, Квебек, Канада

**Киселев О.И.**

д.б.н., профессор, академик РАН, директор НИИ гриппа, Санкт-Петербург, Россия

**Лобзин Ю.В.**

д.м.н., профессор, академик РАН, директор НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург, Россия

**Лоузир Э.**

профессор, директор Института Пастера Туниса, Тунис

**Львов Д.К.**

д.м.н., профессор, академик РАН, директор НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва, Россия

**Мануссакис М.**

директор Института Пастера Греции, Афины, Греция

**Медуницын Н.В.**

д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, Москва, Россия

**Михайлов М.И.**

д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, Москва, Россия

**Мукомолов С.Л.**

д.м.н., профессор, зав. лабораторией вирусных гепатитов Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

**Найденски Х.**

д.м.н., профессор, директор Института микробиологии им. Стефана Ангеловфа, зав. отделом инфекционной микробиологии, София, Болгария

**Онищенко Г.Г.**

д.м.н., профессор, академик РАН, помощник Председателя Правительства РФ, Москва, Россия

**Покровский В.В.**

д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель Федерального НМЦ по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва, Россия

**Сантони А.**

зам. директора по научной работе Института Пастера в Риме, профессор иммунологии и иммунопатологии отдела молекулярной медицины Университета Сапиенца в Риме, Рим, Италия

**Симбирцев А.С.**

д.м.н., профессор, директор ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Тотолян Артем А.**

д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

**Фрейдлин И.С.**

д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела иммунологии НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

**Хайтов Р.М.**

д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

**Черешнев В.А.**

д.м.н., профессор, академик РАН, директор Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

**Шпигель А.**

д.м.н., профессор, директор Института Пастера, Дакар, Сенегал

## Редакционный совет

- Алешкин В.А.** д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия
- Бухарин О.В.** д.м.н., профессор, академик РАН, директор Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия
- Вишневский Б.И.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия
- Долгушин И.И.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, ректор Южно-Уральского государственного медицинского университета, Челябинск, Россия
- Зверев В.В.** д.б.н., профессор, академик РАН, директор НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
- Зуева Л.П.** д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
- Кафтырева Л.А.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией бактериальных кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Кашкин К.П.** д.м.н., профессор, академик РАН, зав. кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава РФ, Москва, Россия
- Кубарь О.И.** д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Малеев В.В.** д.м.н., профессор, академик РАН, зам. директора по научной и клинической работе ЦНИИ эпидемиологии Минздрава РФ, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия
- Мокроусов И.В.** д.б.н., ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Нарвская О.В.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Савичева А.М.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия
- Сельков С.А.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия
- Тец В.В.** д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
- Харит С.М.** д.м.н., профессор, руководитель отдела профилактики инфекционных заболеваний НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург, Россия
- Ценева Г.Я.** д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. лабораторией бактериальных капельных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Чекнев С.Б.** д.м.н., зам. директора по научной работе НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, зав. лабораторией межклеточных взаимодействий, Москва, Россия
- Шкарин В.В.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Нижегородской государственной медицинской академии, зав. кафедрой эпидемиологии, Нижний Новгород, Россия

**Ответственный секретарь:** Лаврентьева И.Н., д.м.н. (Санкт-Петербург)

**Редактор перевода:** Семенов А.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

**Выпускающий редактор:** Мурадян А.Я., к.м.н. (Санкт-Петербург)

---

### Учредители

Северо-Западное отделение РАМН  
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера  
Санкт-Петербургское региональное отделение Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов

Журнал зарегистрирован Управлением Федеральной службы по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций по Санкт-Петербургу и Ленинградской области  
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00578 от 26 апреля 2010 г.  
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00910 от 24 июня 2011 г.

---

**Электронная версия журнала:** [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

**С 2012 года журнал «Инфекция и иммунитет» входит в Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук**

**С 2014 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Ulrich's Periodicals Directory**

**Адрес редакции:**  
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.

**Издательство НИИЭМ имени Пастера**  
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.  
Тел./факс: (812) 232-07-42.  
E-mail: [izdatelstvo@pasteurorg.ru](mailto:izdatelstvo@pasteurorg.ru)

**Типография ООО «ИПК „Береста”»**  
196006, Санкт-Петербург,  
ул. Коли Томчака, 28.  
Тел./факс: (812) 388-90-00.

Подписано в печать 17.09.2015 г. Формат 60 x 90 1/8.  
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 12.  
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).  
Заказ № 1244.

© Инфекция и иммунитет  
© СЗО РАМН, 2015  
© НИИЭМ имени Пастера, 2015  
© СПб РО РААКИ, 2015



# Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet)

July–September

2015, volume 5

No. 3

*The journal is published with the assistance of the Department of All-Russian Scientific and Practical Society of epidemiologists, microbiologists and parasitologists for St. Petersburg and Leningrad region*

## Editor-in-chief

**Anatolij B. Zhebrun**

PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Pasteur Institute, Director, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

## Deputy editor-in-chief

**Areg A. Totolian**

PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, St. Petersburg, Russian Federation

## Members of editorial board

**Alexander S. Apt**

PhD, Professor, Central Research Institute of Tuberculosis, Head of the Laboratory of Immunogenetics, Moscow, Russian Federation

**Luis Barbeito**

PhD, MD, Professor, Institute Pasteur de Montevideo, Director, Montevideo, Uruguay

**Paul Brey**

PhD, Professor, Institute Pasteur du Laos, Director; Laboratory of Medical Entomology and Biology of Disease Vectors, Head, Vientiane, Laos

**Charles M. Dozois**

PhD, Professor, INRS — Institute Armand Frappier, Director, Quebec, Canada

**Alexander L. Gintsburg**

PhD, MD, Professor, RAS full member, M.F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation

**Oleg I. Kiselev**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Research Institute of Influenza, Director, St. Petersburg, Russian Federation

**Yuri V. Lobzin**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Childhood Infections, Director, St. Petersburg, Russian Federation

**Hechmi Louzir**

Professor, Institute Pasteur de Tunis, Director, Tunis, Tunisia

**Dmitry K. Lvov**

PhD, MD, Professor, RAS full member, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Director, Moscow, Russian Federation

**Menelaos N. Manoussakis**

Hellenic Pasteur Institute, Director, Athens, Greece

**Nikolai V. Medunitsyn**

PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Tarasevich State Research Institute for Standardization and Control of Medical Biological Preparations, Moscow, Russian Federation

**Michael I. Michailov**

PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russian Federation

**Sergei L. Mukomolov**

PhD, MD, Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Viral Hepatitis, St. Petersburg, Russian Federation

**Hristo Najdenski**

PhD, MD, Professor, Institute Stephan Angeloff, Director; Department of Infectious Microbiology, Head, Sofia, Bulgaria

**Gennadiy G. Onishchenko**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Assistant to the Chairman of the Government of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

**Vadim V. Pokrovskiy**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Central Research Institute of Epidemiology, Director, Head of the Federal AIDS Center, Moscow, Russian Federation

**Angela Santoni**

PhD, Professor, Institute Pasteur-Fondation Cenci Bolognetti, Scientific Director; Full Professor of Immunology and Immunopathology, Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

**Andre Spiegel**

PhD, MD, Professor, Institute Pasteur de Dakar, Director, Dakar, Senegal

**Andrei S. Simbirtsev**

PhD, MD, Professor, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Director, St. Petersburg, Russian Federation

**Artem A. Totolian**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Molecular Microbiology, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

**Irina S. Freidlin**

PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Experimental Medicine, Head of the Department of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

**Rahim M. Khaitov**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology, Scientific Adviser, Moscow, Russian Federation

**Valery A. Chereshevn**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology and Physiology, Director, Yekaterinburg, Russian Federation

## Members of editorial council

- Vladimir A. Aleshkin** PhD, Professor, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation
- Oleg V. Bukharin** PhD, MD, Professor, RAS full member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Director, Orenburg, Russian Federation
- Boris I. Vishnevsky** PhD, MD, Professor, Research Institute of Phthisiopulmonology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
- Ilija I. Dolgushin** PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Chelyabinsk State Medical Academy, Rector, Moscow, Russian Federation
- Vitaly V. Zverev** PhD, Professor, RAS full member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation, Director; I.M. Sechenov State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Moscow, Russian Federation
- Ludmila P. Zueva** PhD, MD, Professor, I.I. Mechnikov North-West State Medical University, Head of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, St. Petersburg, Russian Federation
- Lydia A. Kaftyreva** PhD, MD, Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Bacterial Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation
- Kirill P. Kashkin** PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Head of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation
- Olga I. Kubar** PhD, MD, Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Victor V. Maleev** PhD, MD, Professor, RAS full member, Central Research Institute of Epidemiology, Deputy Director on Science, Moscow, Russian Federation
- Igor V. Mokrousov** PhD, St. Petersburg Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Microbiology, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Olga V. Narvskaya** PhD, MD, Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
- Alevtina M. Savicheva** PhD, MD, Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
- Sergei A. Selkov** PhD, MD, Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation
- Viktor V. Tets** PhD, MD, Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, St. Petersburg, Russian Federation
- Susanna M. Kharit** PhD, MD, Professor, Institute of Childhood Infections, Head of the Prevention Department of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation
- Galina Ya. Tseneva** PhD, MD, Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Bacterial Respiratory Infections, St. Petersburg, Russian Federation
- Sergei B. Cheknev** PhD, MD, M.F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Intracellular Interactions, Moscow, Russian Federation
- Vyacheslav V. Shkarin** PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, State Medical Academy, President, Head of the Department of Epidemiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Assistant editor:** Irina N. Lavrentieva (St. Petersburg)

**Translation editor:** Alexander V. Semenov (St. Petersburg)

**Copy editor:** Aram Ya. Muradyan (St. Petersburg)

---

### Founders

North-West Regional Branch of Russian Academy of Medical Sciences  
Saint Petersburg Pasteur Institute  
Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists, St. Petersburg Regional Branch (SPb RAACI)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass media in Saint Petersburg and Leningrad region  
Certificate of registration PI no. TU 78–00578 from April, 26, 2010.  
Certificate of registration PI no. TU 78–00910 from June, 24, 2011.

---

**Electronic version:** [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

**Since 2012, the *Infection and Immunity* journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science**

**Since 2014 the *Infection and Immunity* journal is included into international Ulrich's Periodicals Directory database**

**Editorial office:**  
197101, St. Petersburg, Mira str., 14.

**Publishing house of St. Petersburg Pasteur Institute**  
197101, St. Petersburg, Mira str., 14.  
Phone/fax: (812) 232-07-42.  
E-mail: [izdatelstvo@pasteurorg.ru](mailto:izdatelstvo@pasteurorg.ru)

**Produced at the Beresta Printing House**  
196084, Russian Federation, St. Petersburg,  
Koli Tomchaka str., 28.  
Phone/fax: (812) 388-90-00.

Passed for printing 17.09.2015. Print format 60 x 90 1/8.  
Offset printing. Printed sheets 12.  
Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =  
Infektsiya i immunitet  
© North-West Regional Branch of RAMS, 2015  
© St. Petersburg Pasteur Institute, 2015  
© SPb RAACI, 2015

# СОДЕРЖАНИЕ

## Обзоры

Кадникова Л.А., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

<b>КАПСУЛЬНЫЙ АНТИГЕН ЧУМНОГО МИКРОБА .....</b>	<b>201</b>
---	------------

## Оригинальные статьи

Мордык А.В., Пузырева Л.В., Батищева Т.Л.

<b>КЛЕТочНЫЕ ТЕСТЫ РЕАКТИВНОСТИ И ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫХ СОЦИАЛЬНО СОХРАННЫХ БОЛЬНЫХ С ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ .....</b>	<b>219</b>
--	------------

Борисова О.Ю., Алешкин В.А., Пименова А.С., Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Гуров А.В., Шадрин Г.Б., Товмасын А.С., Ефимов Б.А., Кафарская Л.И.

<b>МИКРОБНЫЙ СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ РОТОГЛОТКИ У БОЛЬНЫХ С ТОНЗИЛЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ .....</b>	<b>225</b>
---	------------

Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Кулешевич Е.В., Жарков Д.А., Шален К., Тотолян Артем А.

<b>НЕФРИТОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ <i>STREPTOCOCCUS PYOGENES</i> ГЕНОТИПОВ <i>emm1</i> и <i>emm12</i>, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ИСТОЧНИКУ ВЫДЕЛЕНИЯ .....</b>	<b>233</b>
--	------------

Сергеева А.В., Послова Л.Ю., Ковалишена О.В., Благоднравова А.С., Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Морозова О.В., Новикова Н.А.

<b>МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ В ДЕТСКОМ МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ .....</b>	<b>243</b>
---	------------

Буторов Е.В.

<b>КОРРЕЛЯЦИЯ CD4 ЛИМФОЦИТОВ И ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ С УРОВНЕМ L-ЛИЗИНА ПЛАЗМЫ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ .....</b>	<b>253</b>
---	------------

Елпаева Е.А., Комиссаров А.Б., Писарева М.М., Грудинин М.П., Киселев О.И.

<b>НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В К АНАЛОГАМ НУКЛЕОЗ(Т)ИДОВ M204I/V У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В .....</b>	<b>265</b>
---	------------

## Краткие сообщения

Лисаков А.Н., Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Гайдерова Л.А., Федотов А.Ю., Никулина В.Г., Гаврилова М.В.

<b>ИССЛЕДОВАНИЕ <i>IN VITRO</i> ИНТЕРФЕРОНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ .....</b>	<b>273</b>
---	------------

Бобырева Н.С., Дегтева Г.Н.

<b>АНАЛИЗ ДАННЫХ ЛАБОРАТОРНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ НА ЛЯМБЛИОЗ У РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП НАСЕЛЕНИЯ НЕНЕЦКОГО АВТОНОМНОГО ОКРУГА .....</b>	<b>279</b>
--	------------

## Некролог

<b>ПАМЯТИ АНАТОЛИЯ БОРИСОВИЧА ЖЕБРУНА .....</b>	<b>285</b>
---	------------

<b>Правила для авторов .....</b>	<b>287</b>
----------------------------------	------------

<b>Авторский указатель .....</b>	<b>290</b>
----------------------------------	------------

<b>Предметный указатель .....</b>	<b>290</b>
-----------------------------------	------------

# CONTENTS

## Reviews

*Kadnikova L.A., Kopylov P.K., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P.*

<b>CAPSULAR ANTIGEN OF <i>YERSINIA PESTIS</i>.....</b>	<b>201</b>
--	------------

## Original articles

*Mordyk A.V., Puzyreva L.V., Batishcheva T.L.*

<b>REACTIVITY AND ENDOGENOUS INTOXICATION CELLULAR TESTS OF THE FIRST TIME DIAGNOSTED SOCIALLY ADOPTED PATIENTS WITH INFILTRATIVE LUNG TUBERCULOSIS .....</b>	<b>219</b>
---	------------

*Borisova O.Yu., Aleshkin V.A., Pimenova A.S., Krukov A.I., Kunelskaya N.L., Gurov A.V., Shadrin G.B., Tovmasyan A.S., Efimov B.A., Kafarskaya L.I.*

<b>MICROBIAL LANDSCAPE OF MICROFLORA OF A PHARYNX AT PATIENTS WITH TONSILLIT'S PATHOLOGY .....</b>	<b>225</b>
--	------------

*Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Kuleshevich E.V., Zharkov D.A., Schalen C., Totolian Artem A.*

<b>NEPHRITOGENIC ACTIVITY OF <i>STREPTOCOCCUS PYOGENES</i> <i>emm1</i> AND <i>emm12</i> GENOTYPES ISOLATED FROM PATIENTS AND ASYMPTOMATIC CARRIERS .....</b>	<b>233</b>
--	------------

*Sergeeva A.V., Poslova L.Y., Kovalishena O.V., Blagonravova A.S., Epifanova N.V., Sashina T.A., Morozova O.V., Novikova N.A.*

<b>VIRAL ETIOLOGY ACUTE INTESTINAL INFECTIONS MOLECULAR MONITORING IN CHILDREN'S HOSPITAL .....</b>	<b>243</b>
---	------------

*Butorov E.V.*

<b>CORRELATION BETWEEN CD4 LYMPHOCYTES, VIRAL LOAD AND L-LYSINE PLASMA LEVEL IN HIV-INFECTED PATIENTS .....</b>	<b>253</b>
---	------------

*Elpaeva E.A., Komissarov A.B., Pisareva M.M., Grudin M.P., Kiselev O.I.*

<b>NEW METHOD FOR DETERMINING HEPATITIS B VIRUS RESISTANCE MUTATIONS M204I/V TO NUCLEOS(T)IDE ANALOGUES IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B.....</b>	<b>265</b>
---	------------

## Short communications

*Lisakov A.N., Nagieva F.G., Barkova E.P., Gaiderova L.A., Fedotov A.Y., Nikulina V.G., Gavrilova M.V.*

<b>THE IMMUNOCOMPETENT CELLS RECEPTORS RESEARCH UNDER EXPERIMENTAL INFLUENZA INFECTION <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>273</b>
--	------------

*Bobyreva N.S., Degteva G.N.*

<b>LABORATORY TESTING RESULTS ANALYSIS OF GIARDIASIS PREVALENCE AMONG DIFFERENT POPULATION GROUPS IN THE NENETS AUTONOMOUS DISTRICT .....</b>	<b>279</b>
---	------------

## Obituary

<b>IN MEMORY OF ANATOLIY B. ZHEBRUN .....</b>	<b>285</b>
---	------------

<b>Instructions to Authors .....</b>	<b>287</b>
--------------------------------------	------------

<b>Author index .....</b>	<b>290</b>
---------------------------	------------

<b>Subject index .....</b>	<b>290</b>
----------------------------	------------



# КАПСУЛЬНЫЙ АНТИГЕН ЧУМНОГО МИКРОБА

Л.А. Кадникова, П.Х. Копылов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболensk, Московская область, Россия

**Резюме.** Чума — зоонозное заболевание, вызванное грамотрицательной бактерией *Yersinia pestis*, которая, как правило, передается человеку от зараженных грызунов через укус инфицированной блохи. Данный микроорганизм убил больше людей, чем все войны в истории человечества. Циркулирующая *Y. pestis* в природных очагах чумы обеспечивается целым рядом факторов патогенности различной функциональной направленности. В обзоре рассматривается один из них — капсульный антиген чумного микроба (F1 или Caf1). Описаны история открытия, генетический контроль, условия биосинтеза, выделение, очистка и физико-химические свойства капсульного антигена, а также обсуждается его вклад в патогенез чумы и его использование в качестве основного компонента чумных вакцин. Визуально аморфная при световой микроскопии капсула *Y. pestis* при электронной микроскопии высокого разрешения представляет собой структуру, сформированную из отдельных фимбриеподобных тяжей длиной до 200 нм, расходящихся в разные стороны от поверхности бактерии. При температуре 37°C образуется в 800–1000 раз больше капсульного антигена, чем при 28°C. Гены, кодирующие белок Caf1 с молекулярной массой субъединицы 17,6 kDa, состоящей из 170 аминокислот, локализованы в *caf1* опероне на плазмиде pFra. На основе анализа первичной нуклеотидной последовательности *caf1* оперона было установлено его филогенетическое родство с кластерами генов, кодирующих секреторируемые с помощью шаперон/ашерных систем пилевые адгезины не только других энтеробактерий, но и еще шесть адгезинов чумного микроба. Размножение клеток *Y. pestis* внутри макрофагов является обязательным этапом патогенеза чумы, а вирулентность чумного микроба коррелирует не с устойчивостью к захвату фагоцитами, а со способностью выживать и размножаться в фаголизосомах фагоцитарных клеток за счет подавления антибактериальных функций фагоцитов. Капсула, образованная из агрегатов Caf1, защищает клетки *Y. pestis* от захвата интактными фагоцитами хозяина, препятствует инициации альтернативного пути активации комплемента. Молекулярный ашер Caf1A, ответственный за закрепление капсульного антигена на поверхности бактериальной клетки, имеет высокий аффинитет к человеческому интерлейкину 1β. Caf1 может вступать в конкуренцию с интерлейкинами 1α, 1β и 1γ за связывание с рецепторами на лимфоидных клетках, препятствуя развитию адекватного иммунного ответа. Иммунодиагностика чумы построена на выявлении Caf1 или анти-Caf1-антител, так как этот антиген *Y. pestis* видоспецифичен. Покрывающий поверхность микробных клеток капсульный антиген — важнейший составной элемент всех современных чумных вакцин. Показана его ведущая роль в создании напряженного иммунитета у белых мышей, крыс, приматов и человека. Однако в организме иммунного животного могут накапливаться бескапсульные (Caf1<sup>-</sup>) варианты *Y. pestis*, сохранившие вирулентность на уровне исходных штаммов «дикого типа». Это свидетельствует о недопустимости использования моноантигенных чумных вакцин и необходимости конструирования иммунопрофилактических препаратов, направленных на 2–3 молекулярные мишени.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, капсульный антиген, F1, Caf, фактор патогенности, патогенез, иммуногенез, чума.

---

**Адрес для переписки:**

Кадникова Лидия Александровна  
142279, Россия, Московская область, п. Оболensk,  
ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии  
Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 (925) 848-70-29.  
E-mail: kadnikova\_lidiya@mail.ru

**Contacts:**

Lidiya A. Kadnikova  
142279, Russian Federation, Moscow Region, Obolensk,  
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology.  
Phone: +7 (925) 848-70-29.  
E-mail: kadnikova\_lidiya@mail.ru

**Библиографическое описание:**

Кадникова Л.А., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П.  
Капсульный антиген чумного микроба // Инфекция и иммунитет. 2015.  
Т. 5, № 3. С. 201–218. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-201-218

**Citation:**

Kadnikova L.A., Kopylov P.K., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Capsular antigen of *Yersinia pestis* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 201–218. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-201-218

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-15-00599).

## CAPSULAR ANTIGEN OF *YERSINIA PESTIS*

Kadnikova L.A., Kopylov P.K., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P.

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

**Abstract.** Plague is a zoonosis caused by gram-negative bacteria *Yersinia pestis*, which, as a rule, is transmitted to humans from septicemic rodents by the bites of infected fleas. This microbe killed more people than all of the wars in the human history. *Y. pestis* circulation in the natural plague foci is ensured by the whole number of pathogenicity factors with differing functional orientation. This review is devoted to one of them, *Y. pestis* capsular antigen (F1 or Caf1). The history of its discovery and studying of its genetic control, biosynthesis, isolation and purification, and physicochemical properties are reviewed. Its roles in plague pathogenesis and its application as a main component of plague vaccines are also discussed. *Y. pestis* capsule under light microscopy is visually amorphous, while high-resolution electron microscopy displays the structure formed from separate fimbria-like cords up to 200 nm long, diverging from the bacterial surface in different directions. At 37°C *Y. pestis* produce 800–1000 times more capsular antigen than at 28°C. Genes coding for 17.6-kD Caf1 protein, which contains 170 amino acids, are located in *caf1* operon of pFra plasmid. Analysis of *caf1* operon nucleotide sequence testified its close phylogenetic relationship with the gene clusters coding for pilus adhesins that were secreted with the help of chaperone/usher systems in enterobacteria including six additional adhesins in *Y. pestis*. *Y. pestis* multiplication within macrophages is the obligatory stage of plague pathogenesis, and the plague pathogen virulence correlates not with resistance to phagocyte ingesting but with bacterial ability to survive and multiply within phagolysosomes of phagocytes due to neutralization of antibacterial functions of eukaryotic cells. The capsule formed out of the Caf1 aggregates protects *Y. pestis* from ingestion by naïve host's phagocytes and prevents from initiation of the alternative pathway of the complement system. Molecular usher Caf1A responsible for capsular antigen anchoring on the surface of bacterial cell has a high affinity to human interleukin 1β. Caf1 can compete with interleukins 1α, 1β, and 1ra in binding to receptors on lymphoid cells preventing development of adequate immune response. Immunodiagnosis of plague is based on detection of Caf1 or anti-Caf1 antibodies since this *Y. pestis* antigen is species specific. Covering bacterial surfaces capsular antigen is also the paramount component of all modern plague vaccines. Its leading role in induction of intense immunity in mice, rats, monkeys, and men was shown clearly. However, non-capsulated (Caf1<sup>-</sup>) variants of *Y. pestis* keeping their virulence at the level of the wild-type strains might be selected and accumulated in immune animals. This indicates inadmissibility of application of monoantigen plague vaccines and necessity for design of immunoprophylactic preparations aimed at two or three molecular targets.

**Key words:** *Yersinia pestis*, capsular antigen, F1, Caf1, pathogenicity factor, pathogenesis, immunogenesis, plague.

### История открытия, условия биосинтеза, выделение, очистка и физико-химические свойства капсульного антигена

Наличие капсулы у возбудителя чумы было установлено еще А. Yersin [95]. Более детально феномен капсулообразования у *Y. pestis* описан S. Rowland [81] и Н. Schütze [85], которые наблюдали, что при росте на искусственных питательных средах при температуре 37°C и в организме теплокровных животных чумной микроб синтезирует желатиноподобное вещество, окружающее в виде капсулы бактериальные клетки и постепенно диффундирующее в окружающую среду. А.И. Желтенков [17] отмечал, что капсула состоит из «гомогенного вещества слизистой консистенции, плохо окрашивающегося анилиновыми красками. В некоторых случаях толщина оболочечной субстанции (капсулы) может в несколько раз превосходить толщину самой бактериальной клетки. Довольно часто оболочечная субстанция окружает не каждого микроба в отдельности, а целые группы их». Для выделения оболочечного антигена Н. Schütze [85]

выращивал культуру возбудителя чумы на агаре в течение 48 ч при температуре 37°C, затем суспендировал бактериальные клетки в физиологическом растворе и нагревал суспензию при температуре 60°C 90 мин. После центрифугирования супернатант состоял в большей своей массе из оболочечного антигена и в меньшей части — из соматического антигена.

Большинство последующих исследований по изучению физико-химических и иммунохимических свойств капсульного антигена были выполнены на основе препаратов фракции I (Ф1, FI, F1 или Caf1), выделенных из водно-солевого экстракта ацетонвысушенных клеток по способу, разработанному Baker E.E. и др. [45].

При температуре 37°C образуется в 800–1000 раз больше капсульного антигена, чем при 28°C [45]. При температуре 37°C в среду культивирования переходит 30–50% синтезируемого антигена [42]. Было принято считать, что в клетках, выращенных при температуре 28°C, капсула не образуется, а фракция I может быть выявлена после дезинтеграции клеток [58]. Однако использование высокочувствительных методов позволило обнаружить у клеток чумного микроба, выращенных при температуре 28°C, капсульный

антиген, расположенный на поверхности клетки [41]. Продукция F1 возможна в широком диапазоне pH с максимальным выходом капсульного антигена в интервале pH от 6,3 до 7,3 [76].

На уровень синтеза F1 влияет не только температура, но и состав питательной среды. Для высокого уровня синтеза питательная среда должна содержать аргинин, триптофан,  $\alpha$ -аминоасляную кислоту, тирозин, глицин, орнитин, гистидин, пантотенат кальция, глюконат кальция и витамин В1. Отсутствие в среде одного из данных веществ приводит к резкому снижению (от 40 до 83,6%) выработки антигена [37].

Классическая методика выделения фракции I по Baker E.E. и др. [45] заключается в следующем. Штамм *Y. pestis* «дикого» типа выращивают при температуре 37°C на плотной питательной среде в течение трех суток. Клетки смывают 0,9% раствором хлорида натрия и двукратно обеззараживают охлажденным ацетоном. Капсульный антиген экстрагируют из ацетонвысушенных клеток 2,5% раствором хлорида натрия в течение суток при комнатной температуре. Выделение капсульного антигена из солевого раствора проводят с помощью переосаждения насыщенным раствором сульфата аммония (pH 7,5). Препарат, преципитирующий при насыщении 0,25–0,3, был обозначен как F1A, а при 0,3–0,33 — F1B. Указанные субфракции были серологически идентичны, но фракция IA помимо белка содержала полисахаридный компонент, в то время как фракция IB — чистый белок. Основным недостатком этого метода получения антигена F1 является то, что для его выделения использовали не собственно вещество капсулы *Y. pestis*, а экстракт из разрушенных ацетоном бактериальных клеток, содержащий также компоненты клеточной стенки и протоплазмы.

Метод выделения F1 из ацетонвысушенных клеток был усовершенствован В.И. Вейнблатом [8], который для более полного извлечения антигена из водно-солевого раствора предложил его экстракцию трихлоруксусной кислотой. Это позволило получить дополнительные фракции IC и ID, серологически идентичные фракциям IA и IB по результатам реакции нейтрализации антител (РНAt) и реакции двойной иммунодиффузии в геле (РДИД). Однако, в отличие от фракций IA, IB и IC, фракция ID не реагировала в реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА). Было высказано предположение, что это «связано с более глубокой гаптенизацией препарата». По своему химическому составу фракции IC и ID оказались белковонуклеополисахаридными комплексами, поскольку содержали 60–69% белка, 28–31% полисахарида, 1–2% нуклеиновых кислот.

Исходя из того, что капсульный антиген прочно связан с микробной клеткой и легко переходит в среду культивирования [42], в последнее время его чаще всего выделяют из куль-

туральной жидкости. Препарат F1, полученный путем фракционирования культуральной жидкости сульфатом аммония [42, 78] превосходил по своей иммунохимической активности препараты, полученные по оригинальной методике Baker E.E. и др. [45]. В 1983 г. М.М. Титенко с соавт. [35] предложили метод выделения F1 из культуральной жидкости осаждением в изоэлектрической точке, что позволило значительно сократить сроки и увеличить выход конечного продукта. Л.Н. Сердобинцевым [32] был разработан метод выделения F1 из культуральной жидкости с использованием колоночной хроматографии на молекулярных ситах.

Препараты F1, выделенные из жидкой среды выращивания, были лишены полисахаридных примесей и представляли собой монокомпонентную белковую систему [9, 35, 78]. В то же время есть данные, что даже препараты F1, выделенные из супернатанта культур, выращенных на жидких средах, содержат примеси липополисахарида (ЛПС) [42]. Комплексное исследование капсулообразования с помощью иммунологических и электронно-микроскопических методов показало, что гелеподобная капсула *Y. pestis* образована F1 антигеном, постепенно переходящим в окружающую среду в процессе культивирования [18, 52]. Хотя после указанных выше экспериментов, клонирования и определения первичной нуклеотидной последовательности *cafI* (или *caf*) оперона [68], кодирующего капсулообразование у *Y. pestis*, и конструирования бескапсульных вариантов возбудителя чумы за счет делеции части структурного гена *cafI* [32], тот факт, что структурный компонент капсулы *Y. pestis* состоит из белка, получил практически всеобщее признание, периодически появляются публикации, свидетельствующие о качественно иной структуре «субстанции», ответственной за антигенную и биологическую активность капсульного материала [19, 21, 56]. На наш взгляд, основой для этого заблуждения послужила работа Glosnicka R. и Gruszkiewicz E. [63], которые в качестве источника выделения антигена «панкреатического перевара оболочки» (АППО, pancreatic envelope digest antigen) использовали ацетонвысушенные клетки штамма EV, выращенные в течение 48 ч при температуре 37°C. Антигены экстрагировали 0,9%-ным раствором хлористого натрия, а надосадочную жидкость использовали в последующих экспериментах. Неочищенный «экстракт капсульной оболочки» содержал 32% белков, 2% углеводов и значительное количество нуклеиновых кислот. Наличие в препарате последних свидетельствует о разрушении клеток в процессе подобной обработки и, на наш взгляд, термин «экстракт капсульной оболочки» неправомерен, так как помимо антигенов, находящихся на клеточной поверхности, в нем присутствуют и экстрагированные внутриклеточные компоненты.

Последующее использование ферментативного переваривания панкреатином, хроматографии на колонках, содержащих смесь мембран эритроцитов человека с целитом, и рехроматографии на сефадексе G-200, позволило получить однородный препарат АППО, обладающий высокой специфичностью в серологических реакциях и рецепторной активностью по отношению к фагу чумного микроба. Изучение химических и физических свойств антигена продемонстрировало его липополисахаридную природу. Показано, что углеводная часть препарата состояла из галактозы и фукозы. Липидная фракция содержала фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин. По предварительным данным, ЛПС АППО отличался от ЛПС клеточной оболочки *Y. pestis* отсутствием глюкозы, гексаминов и наличием этаноламина. Чтобы подчеркнуть различия ЛПС АППО и эндотоксина возбудителя чумы, он был обозначен термином «галактолипид». Было высказано мнение, что за антигенную специфичность галактолипида ответственна его полисахаридная часть [63]. Другой группой исследователей из препарата капсульного антигена, полученного осаждением сульфатом аммония по Baker E.E. и др. [45], методом Вестфаля–Людерица выделен ЛПС, обладающий значительной вязкостью и не вызывающий летального шока у мышей при внутрибрюшинном введении в дозах 1–2 мг [19], что дополнительно, по мнению авторов работы, подтверждало белково-липополисахаридную организацию фракции I чумного микроба. Однако в экспериментах Baker E.E. и др. [45] F1A и F1B после обработки трипсином теряли свою иммунохимическую активность. Кроме того, простое строение галактолипида, представляющего собой по сути гаптен, не позволяет рассчитывать на его высокую иммуногенность, но он может индуцировать синтез антител к минимальным количествам примесей белка, сохранившегося в липидных мицеллах, являясь, по сути, липидным адъювантом.

Фракции IA и IB, полученные по методу Baker E.E. и др. [45], а также фракции IC и ID, выделенные по способу В.И. Вейнבלата с соавт. [9], представляли собой серии молекулярных агрегатов с молекулярными массами от 300 kDa до 1,5 MDa. Выделение капсульного антигена более щадящими методами из культуральной жидкости, исключаяющими этапы обработки ацетоном и высушивания, позволяет получать агрегат субъединиц с молекулярной массой до 2,0 MDa [42].

Определение изоэлектрической точки F1 показало, что ее величина для фракции IA составляла 4,5, а для IB — 4,7 [45], или 4,6 и 4,8 соответственно [47]. Следует отметить, что эти данные характеризуют препараты фрагментированного капсульного антигена, выделенного в достаточно жестких условиях. Значения pI для препа-

ратов выделенных из культуральной жидкости с помощью гелевой фильтрации или изоэлектрической преципитации составляло  $3,95 \pm 0,05$  [35] или  $4,1 \pm 0,05$  [9]. Изоэлектрическая точка для препаратов, полученных из культуральной жидкости высаливанием сульфатом аммония с последующей очисткой от эндотоксина с помощью хроматографии на иммобилизованном полимиксине В, находилась в диапазоне 4,3–4,5 [42]. Эти отличия могут свидетельствовать об изменении, и, может быть, определенной степени нарушения структуры и конформации макромолекул антигена, выделенного из ацетонвысушенных клеток, и влиянии на величину pI примесей липополисахарида. Изоэлектрическая точка F1, рассчитанная на основе данных о первичной нуклеотидной последовательности его субъединицы, составляет 4,3 [60].

### Структурная организация капсульного антигена

В исследованиях с применением сканирующей электронной микроскопии Т.Н. Chen и S.S. Elberg [52] показали, что капсульный антиген образует на поверхности бактерий грануляционный слой, который постепенно диффундирует в окружающую среду. Н.П. Коннов и др. [23] при негативном контрастировании клеток *Y. pestis* установили, что капсула отстояла на 0,125 нм от клеточной стенки и имела четкие контуры. Однако при достаточно интенсивном отмывании зона капсульного вещества истончалась, и образовывались участки, полностью лишенные капсулы. Совместное использование иммуноферритинового метода и электронной микроскопии позволило А.Г. Золотареву и соавт. [18] подтвердить эти данные. Капсула на электронных микрофотографиях представлена в виде обрывков фибриллярного материала (диаметр отдельных фибрилл около 3 нм) [20, 82] или внеклеточного фибриллярного матрикса [52, 82]. Однако в большинстве случаев капсула *Y. pestis* определялась как аморфное вещество (рис. 1), и только при достаточном увеличении на снимках можно было видеть элементы ячеистой структуры капсулы и отдельные «фимбриеподобные тяжи» длиной до 200 нм [82], расходящиеся в разные стороны от поверхности бактерии. Капсулы некоторых энтеротоксигенных или способных вызывать септицемию штаммов *Escherichia coli* образованы белковым антигеном CS31A, представляющим собой фимбрию диаметром 2 нм [62], а структурная субъединица этих пилей — ClpG — филогенетически родственна структурной субъединице капсульного антигена Caf1 [48].

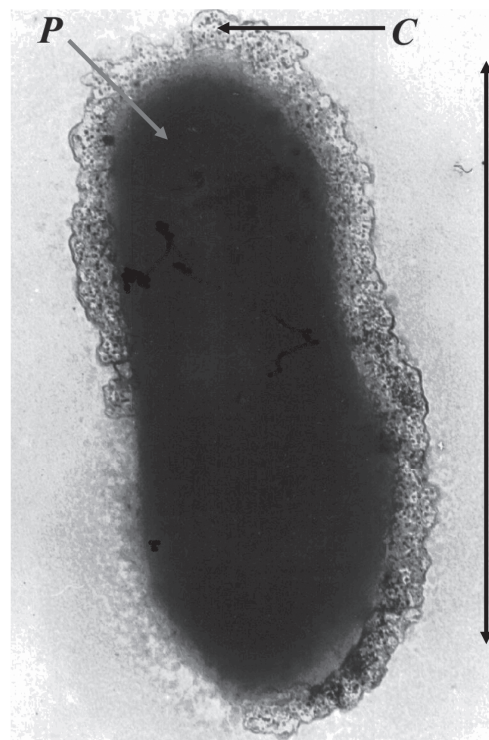
В отношении молекулярной организации капсульного антигена, большинство исследователей поддерживают точку зрения о том, что F1 состоит из большого числа субъединиц. Было



показано, что ген *cafI* кодирует белок CafI с молекулярной массой 17,6 kDa, состоящей из 170 аминокислот. При удалении сигнального пептида из CafI образуется зрелый белок с молекулярной массой 15,5 kDa [60].

Компьютерное сравнение аминокислотной последовательности капсульного антигена с первичными структурами других известных белков выявило несколько гомологичных участков. Установлена гомология CafI с сегментами константных доменов рецептора Т-лимфоцитов, с  $\beta$ -структурным оболочечным белком вируса иммунодефицита обезьян, а также с сегментом гемолизина холерного вибриона и предшественником аденилатциклазы возбудителя коклюша. Предполагают, что найденные гомологичные фрагменты сравниваемых белков обладают близкими структурными, а возможно, и функциональными свойствами [13].

Диссоциация агрегатов F1 на субъединицы происходила при прогревании образцов, содержащих 0,1% меркаптоэтанола и 0,25% додецилсульфата натрия (ДСН), в течение 5 мин при температуре 95°C. Устранение ДСН из препаратов белка приводило к реассоциации субъединиц в серию агрегатов, отличающихся по молекулярной массе [47]. Позднее [90] было показано, что под влиянием денатурирующих факторов, таких как температура, ДСН и мочевины, происходила диссоциация агрегированной формы капсульного антигена. Так, прогревание капсульного антигена при 100°C в течение трех минут вызывало его диссоциацию до тетрамера с молекулярной массой 55 kDa. Лиофилизированный препарат капсульного антигена под влиянием ДСН частично распадался, образуя набор олигомеров с различными молекулярными массами. Прогревание F1 в буфере, содержащем 0,1% ДСН, при 100°C в течение 3 минут приводило к образованию субъединичной формы антигена. Присутствие 0,1% ДСН в растворе капсульного антигена не влияло на иммунохимическую активность препарата. Прогревание капсульного антигена в буфере с 7 М мочевиной приводило к диссоциации до димера с молекулярной массой 25 kDa. Удаление денатурирующих агентов из раствора приводило к ассоциации субъединиц в тетрамеры. С течением времени происходила реассоциация субъединиц в олигомеры большей молекулярной массы. Характер денатурирующего воздействия температуры, вызывающей абсолютное преобладание в растворе тетрамера, указывает на то, что данная структура обладает конформационным оптимумом и обеспечивает максимальное взаимодействие комплементарных поверхностей субъединиц. Процесс формирования тетрамеров фракции I происходит в результате образования водородных связей между отдельными димерами, а формирование димеров происходит, в основном, за счет гидрофобных взаимодействий.



**Рисунок 1. Электронная микрофотография единичной клетки штамма *Y. pestis* M-493**

**Примечание.** Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки — 1 мкм. Бактерии выращивали 48 ч при температуре 37°C. P — протоплазма (protoplast). C — капсула (capsule).

О пространственной структуре агрегатов субъединиц капсульного антигена есть следующие предположения: молекула F1 в водных растворах имеет форму вытянутого эллипсоида вращения и может быть отнесена к асимметричным белкам с хаотически скрученными высоко-сольватированными полипептидными цепями [45]; по данным спектров рассеяния, структурная организация F1 не может соответствовать модели жесткой асимметричной частицы, а четвертичная структура может быть собрана непосредственно из тетрамеров [39]. В составе капсульного антигена отсутствует цистеин. Таким образом, вторичная, третичная и четвертичная структуры капсульного белка образуются без участия дисульфидных связей [60].

## Генетический контроль продукции капсульного антигена

Как показали О.А. Проценко с соавт. [27], гены, ответственные за синтез F1 и «мышинного» токсина, локализованы на внехромосомном репликоне. В результате передачи реципиентным клеткам *Y. pestis* плазмиды с молекулярной массой около 60 MDa трансформанты приобретали способность к продукции антигена F1 и «мышин-

ного» токсина. Плазмида, считавшаяся до этого криптической, была обозначена pFra/Tox (позднее название было сокращено до pFra).

Молекулярная масса репликона, кодирующего синтез F1, вариабельна и может достигать у полевых штаммов 80 MDa, а у отдельных штаммов основного подвида — 190 MDa [38]. Описан также штамм Dodson с редуцированной формой плазмиды — < 40 MDa [75]. Показана возможность обратимой интеграции плазмиды pFra в различные участки хромосомы *Y. pestis* [28, 77].

Оперон *cafI*, кодирующий продукцию капсульного антигена, был впервые клонирован из EcoRI банка больших плазмид *Y. pestis* А.В. Карлышевым с соавт. в 1984 г. в составе космидного вектора рНС79 в клетках *E. coli*. Не позднее 1987 г. аналогичные работы были проведены в НИИ микробиологии МО РФ (цитируется по И.В. Дармову с соавт. [12]), а также в 1988 г. в РосНИПЧИ «Микроб» О.Г. Шишкиной с соавт. [40].

Анисимовым А.П. с соавт. [3, 4] на основе аттенуированных штаммов *Y. pestis* были сконструированы продуценты капсульного антигена, обладающего повышенной на 3–4 порядка (по сравнению со штаммами «дикого типа») серологической активностью. Было высказано предположение, что увеличение серологической активности связано с повышенной степенью агрегации субъединиц CafI в результате повышенной экспрессии *cafI* оперона в составе мультикопийных плазмид.

Система экспрессии генов на основе рекомбинантного поксвируса енотов (рода ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*) семейства *Poxviridae*) обеспечивала уровни экспрессии F1, достаточные для защиты иммунизированных рекомбинантной вирусной вакциной животных от заражения чумой [71].

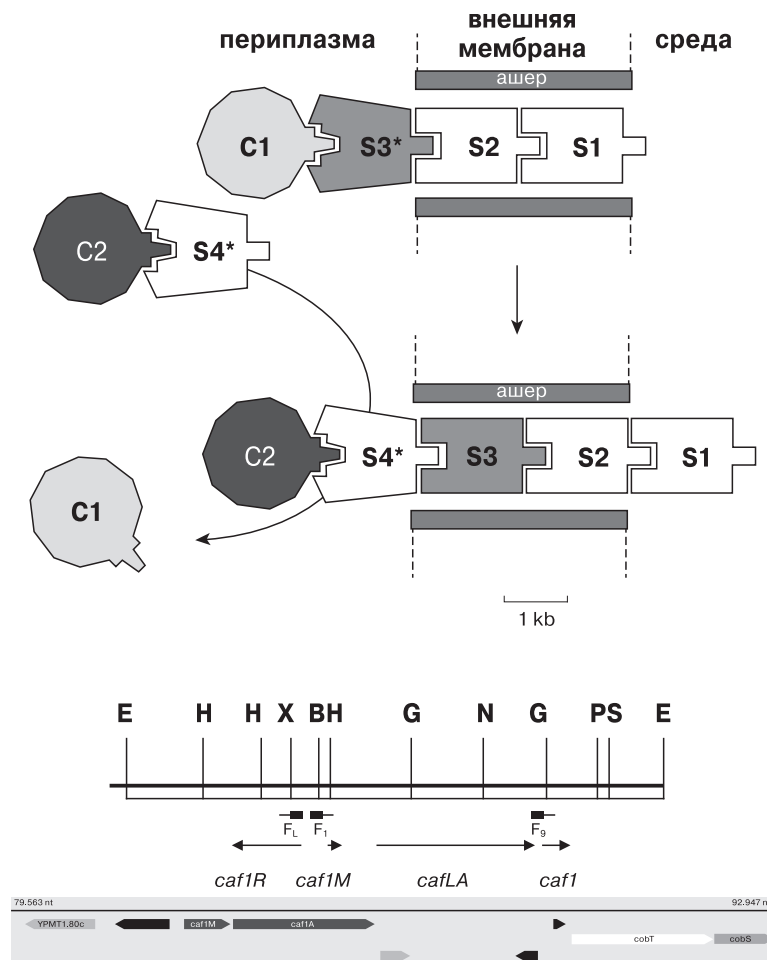
Удалось добиться высокого уровня экспрессии структурного гена *cafI* и в растении, табаке Бентхама (*Nicotiana benthamiana*), инфицированном рекомбинантным вирусом табачной мозаики. Выделенный из растения и очищенный F1 антиген защищал морских свинок после подкожной иммунизации от аэрогенного заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* [84].

По данным Karlyshev А. и др. [60, 68] структурная субъединица капсульного антигена кодируется геном *cafI* размером в 510 нуклеотидных пар (рис. 2). Белок-предшественник антигена F1 состоит из 170 аминокислотных остатков. Участок отщепления сигнальной последовательности расположен между 21-м и 22-м остатками аланина. Второй ген отвечает за синтез белка CafIM. Данный белок является периплазматическим шапероном. CafIM состоит из двух иммуноглобулиноподобных доменов и имеет гомологию с периплазматическим шапероном PapD *E. coli*. Третий ген кодирует ашер-белок CafIA, обеспечивающий, закрепление капсульного антигена

на поверхности бактериальной клетки. Белки CafIM и CafIA также обладают сигнальными последовательностями. Четвертый ген *cafI* оперона кодирует белок CafIR, который отвечает за температурозависимую регуляцию экспрессии трех остальных генов оперона.

Проведенный нами анализ структурного гена *cafI* с помощью программы BLAST на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) свидетельствует, что большинство доступных последовательностей полностью идентичны. В штаммах кавказского подвида Pestoides F. [61] и G8786 [64] в результате единичной замены нуклеотида произошла замена аланина на серин (A48 → S48), а в штаммах *Y. pestis* E1979001 (bv. *antiqua*) и F1991016 (bv. *orientalis*) мутации привели к возможности синтеза только укороченных до 147 и 130 аминокислотных остатков и, вероятно, функционально неполноценных вариантов белка CafI. Секвенирование гена *cafI* из 41 штамма, выделенного на территории Грузии и Армении от полевых и их эктопаразитов, показало, что для них всех характерна замена A48 → S48, а штаммы, выделенные в этом же регионе от песчанок или сусликов, обладали канонической последовательностью гена *cafI* [79].

На основе анализа первичной нуклеотидной последовательности *cafI* оперона было установлено его филогенетическое родство с кластерами генов, кодирующих пилевые и непилевые адгезины энтеробактерий. Образование пилей на поверхности клетки происходит из субъединиц синтезированных внутриклеточно. Структурные компоненты бактериальных фимбрий синтезируются в виде предшественников с N-концевой сигнальной последовательностью, которая отщепляется в процессе переноса через внутреннюю мембрану. Этот перенос обеспечивается «нормальной» экспортной системой, описанной впервые у *E. coli* [54]. В настоящее время принято считать, что за дальнейший перенос из периплазмы на клеточную поверхность через внешнюю мембрану отвечают специфичные для экспорта и сборки фимбрий системы, включающие в себя находящиеся в периплазме молекулярные шапероны и расположенные на клеточной поверхности молекулярные ашеры. Эти протеины не являются компонентами органелл [69]. Аналогичный кластер генов (*cafI* оперон) возбудителя чумы отвечает за синтез белковой капсулы, представляющей собой гомоагрегат субъединиц капсульного антигена. Структурные субъединицы, кодируемые геном *cafI*, синтезируются в виде предшественника с лидерной (сигнальной) последовательностью протяженностью в 21 аминокислотный остаток. Сравнение аминокислотных последовательностей протеина CafI с некоторыми субъединицами фимбрий показало, что C-концевые участки этих белков высококонсервативны и могут отвечать за «узнавание» периплазматическими



**Рисунок 2. Модель сборки фимбрий из субъединиц Caf1 [46, 68]**

**Примечание.** Шаперон Caf1M препятствует фолдингу субъединицы Caf1 в периплазме, сохраняя состояние молекулы с высоким запасом энергии. В трансмембранном канале, образованном ашером Caf1A, Caf1M:Caf1 комплекс (Caf1M<sub>2</sub>:Caf1<sub>4</sub><sup>\*</sup>) замещает шаперон (Caf1M<sub>1</sub>) на проксимальной субъединице фимбрий (Caf1<sub>3</sub><sup>\*</sup>), позволяя последней сложиться в окончательную конформацию (Caf1<sub>3</sub>). Полагают, что освобождаясь при этом энергия обеспечивает процесс сборки фимбрий. «\*» указывает на высокий запас энергии у субъединиц, связанных с шаперонами.

шаперонами. Ген *caf1M* кодирует шаперон, обладающий значительной гомологией с шаперонами семейства *PapD*. Ген *caf1A* отвечает за синтез белка, гомологичного фимбриальным ашером: FaeD, F1mD, MrkD, PapC. Ген *caf1R*, обеспечивающий позитивную терморегуляцию капсулообразования, кодирует протеин гомологичный представителям семейства XylS/AraC регуляторов трансляции [68].

Принято считать, что иммуноглобулиноподобные периплазматические шапероны взаимодействуют со структурными субъединицами адгезинов в периплазматическом пространстве по принципу антитело–антиген, предохраняя последние от протеолитической деградаци и преждевременной агрегации в периплазме, и затем «эскортируют» структурные элементы органелл к следующему компоненту секреторной системы — ашеру, расположенному на внешней мембране (рис. 2). Молекулярный ашер, в свою очередь, служит в качестве высокоспецифичного канала, обеспечивающего секрецию комплек-

са периплазматический шаперон–структурная субъединица, и платформы, обеспечивающей правильную сборку структурных субъединиц в органеллы после ашер-опосредованного отсоединения их от шаперонов [46, 65]. Показано, что отсутствие в бактериальных клетках периплазматических шаперонов FocC и F1mC или молекулярных ашеров FocD и F1mD, участвующих в биогенезе органелл, приводило к полному прекращению образования пилей [69]. «Выключение» гена, кодирующего периплазматический шаперон ClpE, вызывало резкое снижение секреции структурных элементов [48]. Для секреции структурной субъединицы капсульного антигена *Y. pestis* в клетках *E. coli* не был необходим ашер Caf1A, и было достаточно периплазматического шаперона Caf1M, но в этом случае не происходило образование органелл на клеточной поверхности, а структурные субъединицы Caf1 переходили в среду культивирования [68, 82]. В отсутствие же шаперона Caf1M секрецию не выявляли. В клетках *Y. pestis* в отсутствие



ашера Caf1A секрция не происходила — отмечали агрегацию субъединиц Caf1 в периплазме [82]. Вероятно в клетках *E. coli* присутствовал частично гомологичный ашер, образующий трансмембранный канал, пригодный для секрции Caf1 из периплазмы, но лишенный структуры, необходимой для «заякоривания» структурных субъединиц F1 на клеточной поверхности.

Отсутствие в клетках *E. coli*, несущих дефектный по гену *caf1M* оперон *caf1*, детектируемых количеств F1 позволило предположить, что для экспрессии и секрции капсульного антигена необходим продукт гена *caf1M*, обладающий гомологией с периплазматическим шапероном PapD из *E. coli*. В данной серии экспериментов тестирование продукции F1 проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и РНГА [68]. Однако в ряде других экспериментов было показано, что фрагмент ДНК, ограниченный сайтами BamHI, EcoRI и дефектный по гену *caf1M*, обеспечивал в клетках *E. coli* синтез капсульного антигена, выявляемого с помощью ИФА [87] или РДИД [10]. Инсерционный мутагенез гена *caf1M* также приводил к образованию антигена F1, выявляемого в РДИД и РНАт, но не в РНГА [4].

## Роль капсульного антигена в патогенезе

Реализация патогенных свойств *Y. pestis* в организме восприимчивого хозяина требует присутствия у возбудителя чумы целого набора факторов патогенности различной функциональной направленности и системы регуляции, обеспечивающей их координированную экспрессию. Абсолютизирование роли любого отдельно взятого из указанных факторов некорректно [2]. Однако детальный анализ каждого из этих факторов лежит в основе системного подхода при изучении патогенности и вирулентности *Y. pestis*.

Роль капсульного антигена в патогенезе чумы неоднозначна. Капсула, образованная из F1, защищает клетки *Y. pestis* от захвата интактными нейтрофилами хозяина [50]. Это согласуется с общепризнанной ролью бактериальных капсул, препятствующих поглощению бактерий фагоцитарными клетками макроорганизма [89]. С одной стороны, они экранируют пептидогликан или ЛПС бактериальной клетки, препятствуя инициации альтернативного пути активации комплемента [72], но F1, напротив, истощает систему комплемента за счет избирательной активации C2 и C4 компонентов системы комплемента сыворотки человека и таким образом препятствует комплемент-опосредованной опсонизации бактерий [92]. С другой стороны, повышение устойчивости к фагоцитозу обычно коррелирует с увеличением отрицательного заряда микробной клетки, способствующего электростатическому отталкиванию от одноименно заряженных фаго-

цитов [89]. Но в клетках *Y. pestis* синтез капсулы, напротив, сопровождается снижением отрицательного заряда клеточной поверхности [5]. Более того, отсутствие F1 у некоторых штаммов *Y. pestis* обуславливало снижение эффективности захвата бактерий макрофагами морских свинок, но не белых мышей [11]. В то же время известно, что размножение клеток *Y. pestis* внутри макрофагов является обязательным этапом патогенеза чумы [50], а вирулентность чумного микроба коррелирует не с устойчивостью к захвату фагоцитами [66], но со способностью выживать и размножаться в фаголизосомах фагоцитарных клеток за счет подавления антибактериальных функций фагоцитов [51]. В последнее время некоторые исследователи под впечатлением от успехов в изучении кодируемой плазмидой pCad системы секрции 3-го типа, обеспечивающей агрессию внеклеточно расположенных бактерий *Y. pestis* в отношении макрофагов, склонны если не полностью отрицать значимость внутриклеточной стадии развития возбудителя чумы, то ограничивать ее лишь начальным этапом инфекционного процесса при бубонной форме чумы [53]. При этом они игнорируют цитированные выше исследования на модели *Y. pestis*, опираясь на электронно-микроскопическое исследование патоморфологии экспериментального псевдотуберкулеза [86].

Установлено, что при парентеральном введении мышам производных аттенуированного штамма *S. typhimurium* SL3261, несущих рекомбинантные плазмиды с полным *caf1* опероном, которые неспособны стабильно наследоваться *in vitro*, в организме животных происходит селекция клеток, сохраняющих и экспрессирующих гены, ответственные за продукцию капсульного антигена. из печени и селезенки умерщвленных на 1–7-е сутки с момента заражения животных удавалось высевать только F1<sup>+</sup> рекомбинантные клетки [88]. Рекомбинантные клетки *E. coli*, способные образовывать капсулу *Y. pestis*, были устойчивы к фагоцитозу мышинными перитонеальными макрофагами [59].

Капсульный антиген F1 способен образовывать в двухслойных фосфолипидных мембранах поры, проницаемые для воды [80]. В основе цитотоксического действия лимфоцитов на раковые клетки лежит аналогичная способность продуцировать белок перфорин, который «встраивается» в оболочку злокачественной клетки и делает в ней перфорацию. Это приводит к нарушению осмотической регуляции и последующей гибели «целевой» клетки. Подобным же образом действуют дефензины — пептиды нейтрофилов и макрофагов, обладающие широким спектром антимикробной активности. Высказано предположение, что F1 действует аналогичным образом на клетки-мишени теплокровного животного.

Andrews G.P. и др. [42] для объяснения гибели отдельных иммунизированных животных, обладающих высокими титрами антител к F1,



предположили, что секретируемый бактериями в окружающую среду капсульный антиген связывает значительные количества иммуноглобулинов, препятствуя, таким образом, опсонизации бактерий. По их мнению, возможно также и слушивание с фрагментами капсулы уже прикрепившихся к ней антител.

Исходя из экспериментальных данных, свидетельствующих о высоком аффинитете молекулярного ашера Caf1A не только к структурной субъединице капсульного антигена Caf1, но и к человеческому интерлейкину 1b, В.П. Завьялов с соавт. [97] сделали предположение, что F1 может вступать в конкуренцию с интерлейкинами 1a, 1b и 1га за связывание с рецепторами на лимфоидных клетках, препятствуя развитию адекватного иммунного ответа. В свою очередь молекулярный ашер Caf1A может сорбировать интерлейкины, препятствуя их контакту с макрофагами.

Высказано предположение о том, что димеры Caf1, способные взаимодействовать с рецепторами интерлейкина-1 ряда иммунокомпетентных клеток, могут обеспечивать тесный контакт между *Y. pestis* и эукариотической клеткой мишенью за счет их крепления на Caf1A ашере, расположенном во внешней мембране бактериальной клетки [41]. Подобный тесный контакт необходим для инициации системы секреции 3-го типа, обеспечивающей доставку цитотоксических эффекторных Yop белков в клетку мишень хозяина.

Самоходкиной Е.Д. с соавт. (цитируется по Anisimov A.P. и др. [43]) было показано, что лечение экспериментальной чумы, вызванной бескапсульными штаммами *Y. pestis*, оказалось неэффективным при использовании тетрациклина, бета-лактамовых антибиотиков и хинолонов в средних терапевтических дозах, оказывающих выраженный лечебный эффект в отношении инфекции, вызванной полноценными штаммами. Аналогичная антибиотикорезистентность выявлялась и *in vitro* в культуре макрофагов, но не на питательных средах. Клетки *Y. pestis* способны переживать и даже размножаться в фаголизосомах макрофагов [50]. В то же время известно, что указанные антибиотики не способны проникать в фагоциты в активной форме [83]. Похоже, что капсула *Y. pestis* может влиять на уровень проницаемости этих антибиотиков через плазматическую мембрану макрофагов. Антиген F1, образующий капсулу *Y. pestis*, способен встраиваться в двухслойные фосфолипидные мембраны, образуя в них поры, проницаемые для воды. Это, по мнению Rodrigues C.G. и др. [80], лежит в основе цитопатического действия *Y. pestis* на фагоцитарные клетки. Также известно, что после обработки клетка-формирующими токсинами мембраны клеток становятся проницаемыми для целого ряда молекул [67]. Учитывая все вышесказанное, мы можем предположить *a priori*, что

*in vivo* индуцированные F1 «водяные» поры могут быть основной причиной проникновения антибиотиков в макрофаг и его фаголизосомы и, таким образом, обеспечивать чувствительность к антибиотикам клеток *Y. pestis* «дикого» типа [43].

## Иммуногенная активность капсульного антигена

На основании данных об одинаковой иммунохимической активности в РДИД как исходного, так и полностью диссоциированного капсульного антигена было сделано предположение о том, что антигенные детерминанты F1 определяются структурой субъединицы и не зависят от конформации надмолекулярного образования [47].

Блокирование аминокислотных групп капсульного белка тринитробензосульфокислотой не снижало иммунохимической активности F1A, что является аргументом против определяющего участия N-концевого аланина, а также аминокислот, содержащих боковые аминокислотные группы, в формировании антигенных детерминант. Было высказано предположение, что наиболее вероятным способом организации основного антигенного эпитопа является структура, образованная связанными между собой в определенном порядке субъединицами F1A [34].

В результате компьютерного анализа аминокислотной структуры субъединицы Caf1 было установлено, что она состоит из двух β-структурных доменов, соединенных между собой гидрофильной неструктурированной петлей, которая соответствует основному B-клеточному эпитопу данного белка (аминокислотные остатки 72–95). Высказано предположение, что эта гидрофильная петля расположена на поверхности субъединицы напротив C-концевой последовательности, которая, возможно, отвечает за агрегацию субъединиц белка, не препятствуя экспозиции B-клеточных эпитопов на поверхности образующихся агрегатов. Два T-клеточных эпитопа расположены в C-концевых областях доменов (аминокислотные остатки 51–71 и 129–149) [96].

Тестирование пяти перекрывающихся олигопептидов, включающих полную аминокислотную последовательность зрелого белка Caf1, методом ИФА с помощью трех различных чумных гипериммунных сывороток и четырех моноклональных антител, специфичных в отношении F1, проводили с целью выявления линейных B-клеточных эпитопов [74]. Установлено, что как минимум два линейных B-клеточных эпитопа расположены на C-концевом участке F1. Тот факт, что один из клонов IgG не реагировал ни с одним из олигопептидов, но вступал в реакцию с полной последовательностью F1, свидетельствует о наличии у капсульного анти-

гена как минимум одного конформационного В-клеточного эпитопа.

Позднее при изучении механизмов презентации CD4 Т-клеточных эпитопов F1 на модели макрофагов из костного мозга мышей и Т-клеточных гибридом было выявлено четыре эпитопа, взаимодействующих с эукариотическими белками главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II и использующих различные пути презентации [73]. Два из них расположены на С-конце глобулярного домена (134–147 и 123–136) и презентуются вновь синтезированными антигенами МНС класса II после лизосомального процессинга при низких значениях pH. Эпитоп, расположенный на неструктурированном N-концевом участке (7–20), презентуется зрелыми белками МНС класса II, независимо от низких значений pH и без протеолитического процессинга. Расположенный между ними четвертый эпитоп (48–61) обладает промежуточными свойствами. Гидролиз белка в процессе его презентации начинается с N-конца.

Анализ аминокислотной последовательности F1 с помощью программы DNA STAR позволил выявить четыре В-клеточных [B1 (105–123), B2 (142–165), B3 (96–106), B4 (141–154)] и два Т-клеточных эпитопа [T1 (123–137), T2 (137–148)]. Пептид B2 оказался наиболее иммуногенным, за ним следовали пептиды B1 и B3. Использование химерных В–Т позволило получить антительный ответ, сравнимый с ответом на полноразмерный антиген F1, а стимуляция клеточного звена иммунитета была даже эффективнее при использовании В–Т пептидов.

В настоящее время капсульный антиген *Y. pestis* принято считать видоспецифичным, и иммунодиагностика чумы построена на выявлении F1 или анти-F1-антител [14, 75]. В иммунохимических реакциях с коммерческими антительными моно- и поликлональными диагностикумами производства Среднеазиатского ПЧИ препараты F1, выделенные по Baker E.E. и др. [45], после обработки ДСН обладали общими эпитопами с белково-полисахаридными комплексами, выделенными по аналогичной методике из клеток *K. pneumoniae* и *C. freundii*. Указанные иммунодиагностические препараты были разрешены к коммерческому производству после проведения Государственных испытаний, показавших их высокую специфичность — отсутствие реакции с бактериями, не продуцирующими капсульный антиген *Y. pestis*, при использовании «рабочих» разведений диагностикумов и бактерий.

Конформационно-зависимая детерминанта являлась специфичной лишь для препаратов F1, не обработанных ДСН. Препараты из штаммов *Y. pestis*, лишенных капсулы, способствовали выработке у животных антител к неконформационно-зависимым эпитопам F1 и детерминан-

там антигенов, выделенных по Baker E.E. и др. [45] из ацетонвысушенных клеток *K. pneumoniae* и *C. freundii* [21]. На основании данных собственных экспериментов и ссылок на работы, опубликованные до 1987 г., Л.В. Коссе с соавт. [21] пишут, что «пока нет единого мнения о генетическом контроле синтеза и продукции F1», но в этой же работе приведена ссылка на данные о клонировании *cafI* оперона [60], которые, напротив, однозначно свидетельствуют, что гены, расположенные на 8,6-т.п.о. EcoRI фрагменте плазмиды pFra, обеспечивают образование капсулы *Y. pestis* в *E. coli*. Более того, аминокислотная последовательность субъединицы CafI, рассчитанная на основании секвенирования структурного гена *cafI* [60], совпала с результатами определения аминокислотного состава F1 [47].

Несмотря на наличие общих антигенных детерминант и близкую молекулярную массу субъединиц, антигены из *cafI* оперон-несодержащих энтеробактерий обладали гидрофильными свойствами и не образовывали агрегированных структур [21], в то время как формирование макромолекул капсульного антигена *Y. pestis* происходит, в основном, за счет гидрофобных взаимодействий [90]. Компьютерный анализ нуклеотидной последовательности структурного гена капсульного антигена также свидетельствует о гидрофобных свойствах субъединицы F1 [60].

Каждый микроорганизм содержит множество различных антигенов. Во время инфекционного процесса иммунный ответ развивается на большинство из них. Однако резистентность к инфекции зависит, главным образом, от иммунного ответа на небольшое число антигенов, располагающихся на поверхности микроорганизмов. Покрывающий поверхность микробных клеток капсульный антиген *Y. pestis* — важнейший составной элемент всех современных чумных вакцин. Показана его ведущая роль в создании напряженного иммунитета у белых мышей, крыс, приматов и человека [14, 75].

Однако при изучении иммунизирующей активности F1 на морских свинках была выявлена способность препарата F1 вызывать в «миллиграммовых» дозах у этого вида животных состояние иммунопаралича, но в микрограммовых количествах с адьювантом препараты F1 стимулировали протективный ответ [70, 91].

F1 индуцировала выработку макрофагами интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли; наибольшим защитным действием обладал препарат F1, содержащий углеводный компонент, причем лучший эффект оказывала агрегированная форма капсульного антигена [16, 26]. Кроме того, формирование более выраженного по силе и протективности тимусзависимого иммунного ответа происходит, вероятно, в организме теплокровного животного или человека в случае попадания в него F1, агрегированной с тимусзависи-

мыми детерминантами других белков чумного микроба или при введении очищенного препарата F1 в организм, ранее контактировавший с возбудителем чумы. В то же время Т-клеточные эпитопы, индуцирующие клеточное звено иммунного ответа, присутствуют и в собственной структуре субъединицы капсульного антигена [73, 96]. Следует отметить, что основное значение в формировании иммунитета к чуме принадлежит именно клеточным иммунным процессам и главным образом Т-системе лимфоцитов [24].

Представленные выше данные подтверждают, что большинство факторов патогенности являются хорошими иммуногенами, а защитные механизмы против целого ряда инфекционных заболеваний основываются на гуморальном и (или) клеточном иммунитете, индуцированном этими факторами. В свою очередь, варьирование антигенной специфичности указанных факторов препятствует элиминации патогенных бактерий из макроорганизма [15, 57]. Взаимодействие иммунной системы хозяина и противоиммунных факторов микроорганизма обеспечивает саморегуляцию и непрерывность эпизоотического и эпидемического процессов [6]. В настоящее время ряд исследователей склоняется к тому, что поддержание эпизоотического процесса может обеспечиваться атипичными формами чумного микроба, «уклоняющимися» от индикации и идентификации. Одним из наиболее лабильных свойств возбудителя чумы является синтез F1. Данный признак находится в прямой зависимости от характера эпизоотийного процесса: по мере угасания эпизоотий происходит увеличение числа культур со сниженной способностью синтезировать капсульный антиген, вплоть до полной его утраты. Это коррелирует с нарастанием числа животных, серопозитивных в отношении F1 [31, 36]. Широкая «проиммунизация» чувствительных животных в ходе эпизоотии чумы приводит к формированию у них длительного бактерионосительства, способного вызывать в отдаленные сроки острый инфекционный процесс [25, 36]. У подавляющего большинства выделявшихся в этот период штаммов с резко подавленной способностью синтезировать F1 оказалась снижена и вирулентность для белых мышей и морских свинок [36].

## Вирулентность бескапсульных вариантов *Y. pestis*

Значительный объем исследований показал, что в отличие от многих других бактерий чумной микроб весьма однороден как вид, и свойства штаммов, циркулирующих на территории определенных природных очагов, высококонсервативны. Тем не менее, неоднократно описывались случаи выделения атипичных штаммов, то есть отличающихся по некоторым призна-

кам от преобладающего в определенном очаге экотипа *Y. pestis*. При исследовании способности продуцировать F1 штаммами возбудителя чумы из различных очагов СНГ, бесфракционные штаммы обнаруживали не только в Южном Прибалхашье, а практически на всей территории Среднеазиатского пустынного природного очага [44]. В Муюнкумском автономном очаге в различных популяциях большой песчанки циркулировало различное количество штаммов с атипичными свойствами. Наибольшее количество измененных штаммов выделяли в Батышкудукской (18,6%) и Северной Карачардинской (18,4%), а наименьшее — в Коскудукской (1,4%) и Южной Карачардинской (1,8%) популяциях больших песчанок. F1-варианты составляли в среднем 15,8% от числа всех атипичных штаммов. Особенно часто культуры, дефектные по продукции F1, изолировали от песчанок Жуантобинской, Камкалинской и Саумаккольской популяций, что, вероятно, связано «с определенными физиологическими особенностями больших песчанок из разных популяций» [30]. Подобные штаммы *Y. pestis* были выделены от погибших от чумы людей [49, 92]. Образование F1-вариантов может происходить при элиминации плазмиды rFra из клеток чумного микроба, ее обратимой интеграции в различные участки хромосомы *Y. pestis*, в результате повреждения *cafI* оперона резидентными для возбудителя чумы IS-элементами: IS100 и IS285 или бактериофагами [75].

В большинстве ранних исследований, кроме работ с экспериментальным штаммом 358/12 [55] и F1-штаммом И-2422 [44], бескапсульные варианты, в отличие от полноценных штаммов, обладали избирательной вирулентностью. В большинстве публикаций отмечалось резкое снижение их вирулентности в отношении морских свинок, но не белых мышей, в отношении крыс, но не мышей, в отношении морских свинок, но не белых мышей и серых сурков, или в отношении морских свинок, но не белых мышей, тушканчиков, больших и полуденных песчанок. В Или-Каратальском междуречье выделены F1-штаммы, авирулентные для белых мышей и морских свинок, слабовирулентные для полуденных, краснохвостых и гребенщиковых, но высоковирулентные для больших песчанок. В последнее время таким атипичным вариантам приписывают способность вызывать хронические формы инфекционного процесса, что может играть определенную роль в поддержании эпизоотий, а, возможно, и в сохранении возбудителя чумы в межэпизоотический период [44].

Использование для конструирования F1-штаммов сайт-направленного мутагенеза, избирательно затрагивающего только гены оперона *cafI*, позволило получить бескапсульные мутанты штаммов 358, 231 (табл. 1), 296, И-2638, X [44] и CO92 [59, 94], сохранившие вирулентность для мышей [94], морских свинок [44] и обезьян [59,



94] на уровне исходных родительских штаммов. Однако у животных, зараженных рядом штаммов с фенотипом F1<sup>-</sup>, отмечали достоверную задержку сроков гибели. Выраженность перехода чумной инфекции в подострую форму зависела от вида животных и исходного штамма *Y. pestis*.

Вероятнее всего значительное снижение вирулентности F1<sup>-</sup> штаммов в экспериментах большинства исследователей может быть связано с наличием в изученных ими штаммах дополнительных неидентифицированных мутаций. По мнению Friedlander A.M. и др. [59], снижение вирулентности F1<sup>-</sup> штаммов, несущих плазмиду pFga в интегрированном состоянии, может быть связано с тем, что эта интеграция оказывает влияние на экспрессию других факторов патогенности.

Всестороннее изучение экспериментальных штаммов микроорганизмов, дефектных по продукции отдельных факторов патогенности, интересно не только с точки зрения выяснения особенностей вызванного ими инфекционного процесса на модели интактных животных. Неменьший интерес представляет эпидемиологическая значимость естественной вариабельности циркулирующих в природе возбудителей инфекционных заболеваний и, в первую очередь, взаимосвязь изменения антигенной структуры патогенов и их способности преодолевать коллективный популяционный иммунитет хозяев, лежащая в основе саморегуляции паразитарных систем. Даже беглый анализ литературных данных показывает, что изменчивость по одному определенному антигену неравнозначна для развития эпидемического процесса у различных носителей и, соответственно, в различных природных очагах.

При заражении интактных больших песчанок F1<sup>+</sup> штаммами на 5–9-е сутки животные гибнут от генерализованной инфекции с выделением F1<sup>+</sup> культур. Гибель в сроки позже одного месяца или умерщвление животных в эти же сроки, как правило, вели к выявлению F1<sup>-</sup> форм возбудителя чумы в абсцессах, сформировавшихся в местах введения исходной F1<sup>+</sup> культуры [29]. Выделение F1<sup>+</sup> или F1<sup>-</sup> бактерий чередовалось в зависимости от фазы эпизоотии и коррелиро-

вало, в первую очередь, с колебаниями процента серопозитивных в отношении F1 больших песчанок в популяции.

В опытах по заражению вирулентными неизогенными F1<sup>+</sup> и F1<sup>-</sup> штаммами *Y. pestis* серых сурков, выживших после предварительного заражения этими же штаммами чумного микроба, было показано, что «от гибели в результате заражения капсульным штаммом» их «практически не защищали бескапсульные микробы, а капсульные защищали слабо. По отношению к бескапсульному штамму ... как капсульные, так и бескапсульные микробы обладали выраженными иммуногенными свойствами» [7]. Следует отметить, что в доступной нам литературе нет сведений о выделении F1<sup>-</sup> штаммов от сурков и их эктопаразитов.

В наших экспериментах (табл. 2) были подтверждены известные данные о неэффективности иммунитета в отношении F1<sup>-</sup> штаммов на модели белых мышей, предварительно иммунизированных F1<sup>+</sup> штаммами, убитой вакциной USP или антигеном F1 [59, 94] и отсутствии селективных преимуществ у F1<sup>-</sup> штаммов на модели иммунизированных содержащими F1 препаратами морских свинок [1]. Результаты экспериментов с иммунными морскими свинками, казалось бы, противоречат результатам исследования фагоцитарной активности «иммунных» перитонеальных макрофагов морских свинок в отношении штаммов *Y. pestis*, отличающихся по продукции F1, в котором показано, что F1<sup>-</sup> штаммы возбудителя чумы имеют преимущество размножения внутри макрофагов животных, иммунизированных штаммом EV линии НИИЭГ [22]. По этому поводу хочется высказать два соображения. С одной стороны, моделирование такого сложного явления как инфекционное заболевание на изолированных клетках животных, переживающих в питательных средах вне организма, позволяет изучать тонкие механизмы взаимодействия патогенных микроорганизмов с отдельными эукариотическими клетками, с другой стороны, — является крайней степенью упрощения изучаемого процесса. Поэтому сравнение результатов, полученных в опытах *in vivo* и в экспериментах с изо-

**ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ЗАРАЖЕНИЯ ИММУННЫХ БЕЛЫХ МЫШЕЙ И МОРСКИХ СВИНОК ИЗОГЕННЫМИ F1<sup>+</sup> И F1<sup>-</sup> ШТАММАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ**

Штаммы <i>Y. pestis</i>	F1	Показатели LD <sub>50</sub> (КОЕ)		Средние сроки жизни (сут.)	
		белые мыши	морские свинки	белые мыши	морские свинки
231	+	1,0 × 10 <sup>5</sup> (2,0 × 10 <sup>4</sup> –6,0 × 10 <sup>5</sup> )	5,6 × 10 <sup>5</sup> (1,2 × 10 <sup>5</sup> –1,9 × 10 <sup>6</sup> )	5,8 (3–16)	11,0 (6–16)
231pFra/pFS23	–	1,0 × 10 <sup>3</sup> (2,0 × 10 <sup>2</sup> –6,0 × 10 <sup>3</sup> )	6,9 × 10 <sup>5</sup> (8,7 × 10 <sup>4</sup> –2,1 × 10 <sup>6</sup> )	8,3 (6–30)	16,5 (8–30)
231pFra <sup>-</sup>	–	2,1 × 10 <sup>3</sup> (4,0 × 10 <sup>2</sup> –9,0 × 10 <sup>3</sup> )	7,0 × 10 <sup>5</sup> (3,0 × 10 <sup>5</sup> –1,1 × 10 <sup>6</sup> )	9,1 (7–30)	17,2 (7–30)
358	+	3,2 × 10 <sup>5</sup> (7,0 × 10 <sup>4</sup> –1,6 × 10 <sup>6</sup> )	1,0 × 10 <sup>6</sup> (2,6 × 10 <sup>5</sup> –4,0 × 10 <sup>6</sup> )	6,3 (3–15)	11,8 (5–21)
358pFra/pFS23	–	3,0 × 10 <sup>2</sup> (7,3 × 10 <sup>1</sup> –1,7 × 10 <sup>3</sup> )	1,5 × 10 <sup>6</sup> (3,8 × 10 <sup>5</sup> –6,0 × 10 <sup>6</sup> )	8,9 (6–28)	17,8 (6–30)
358pFra <sup>-</sup>	–	2,7 × 10 <sup>3</sup> (5,2 × 10 <sup>2</sup> –1,2 × 10 <sup>4</sup> )	6,8 × 10 <sup>5</sup> (1,7 × 10 <sup>5</sup> –3,1 × 10 <sup>6</sup> )	8,7 (7–27)	17,6 (6–30)



**ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ЗАРАЖЕНИЯ ИММУННЫХ И ПЕРЕБОЛЕВШИХ ЧУМОЙ МОРСКИХ СВИНОК ИЗОГЕННЫМИ F1<sup>+</sup> И F1<sup>-</sup> ШТАММАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ**

Штаммы <i>Y. pestis</i>	F1	Показатели LD <sub>50</sub> (КОЕ)		Средние сроки жизни (сут.)	
		иммунные	переболевшие	иммунные	переболевшие
231	+	3,6 × 10 <sup>5</sup> (9,1 × 10 <sup>4</sup> –1,4 × 10 <sup>6</sup> )	1,6 × 10 <sup>8</sup> (4,1 × 10 <sup>7</sup> –6,5 × 10 <sup>8</sup> )	11,1 (5–18)	13,1 (11–30)
231pFra/pFS23	–	4,1 × 10 <sup>5</sup> (1,0 × 10 <sup>5</sup> –1,6 × 10 <sup>6</sup> )	6,1 × 10 <sup>6</sup> (1,5 × 10 <sup>6</sup> –2,4 × 10 <sup>7</sup> )	15,9 (8–30)	17,6 (10–30)

лированными фагоцитами, требует серьезной критичной оценки. В этом плане интересно, что свойства F1<sup>+</sup> и F1<sup>-</sup> штаммов, выявленные на модели «иммунных» перитонеальных макрофагов, не проявляются в опытах на морских свинках, однократно иммунизированных аттенуированным вакцинным штаммом EV, но четко видны при заражении переболевших чумой животных (табл. 2). Это, на наш взгляд, еще раз подчеркивает разницу между поствакцинальным и постинфекционным иммунитетом при чуме и свидетельствует о необходимости оценки эпидемиологической значимости изменения антигенной структуры *Y. pestis* именно на модели переболевших животных.

## Заключение

Капсула — это один из основных факторов патогенности *Y. pestis*, благодаря которым данный микроорганизм способен противостоять защитным механизмам хозяина. Ее основной компонент — капсульный антиген — обладает целым рядом активностей, направленных на угнетение врожденного иммунитета. Он препятствует захвату бактерии интактными фагоцитами хозяина и истощает систему комплемента за счет избирательной активации C<sub>2</sub> и C<sub>4</sub> компонентов системы комплемента, угнетает активность рецепторного аппарата Т-хелперов

морских свинок. Структурные составляющие F1 могут вступать в конкуренцию с интерлейкинами 1α, 1β и 1γ за связывание с рецепторами на лимфоидных клетках, препятствуя развитию адекватного иммунного ответа, а также конкурируют с интерлейкином гHuIL-1β за общие рецепторы на иммунокомпетентных клетках.

Капсульный антиген *Y. pestis* — важнейший составной элемент всех современных чумных вакцин. Однако селективное давление иммунной системы хозяина способствует накоплению в макроорганизме бескапсульных (F1<sup>-</sup>) вариантов микроба, сохранивших вирулентность на уровне штаммов «дикого типа», что свидетельствует о нецелесообразности использования моноантигенных вакцин на основе F1. Кроме того возможность циркуляции бескапсульных штаммов в природе необходимо учитывать при лабораторной диагностике чумы, так как большинство диагностических препаратов нацелено именно на капсульный антиген или кодирующий его ген *cafI*.

Представленная выше информация является ярким примером того, что только детальное и всестороннее изучение отдельных факторов патогенности болезнетворных микробов может способствовать их рациональному использованию в качестве молекулярных мишеней для диагностики, профилактики и лечения вызываемых ими болезней.

## Список литературы/References

1. Акимович В.В., Шанина Л.Н. Варианты чумного микроба, не образующие капсульного антигена // Вопросы микробиологии и лабораторной диагностики особо опасных инфекций. Саратов, 1965. С. 54–58. [Akimovich V.V., Shanina L.N. Variants of chumnyy mikroba, ne obrazuyushchie kapsul'nogo antigena [Varieties of the plague microbe non-forming capsular antigen]. *Voprosy mikrobiologii i laboratornoi diagnostiki osobo opasnykh infektsii* [Diagnostics of Particularly Dangerous Infections]. *Saratov, 1965, pp. 54–58.*]
2. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1 // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2002. № 3. С. 3–23. [Anisimov A.P. *Yersinia pestis* factors ensuring circulation and persistence of the plague pathogen in ecosystems of natural foci. Communication 1. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 2002, no. 3, pp. 3–23. (In Russ.)*]
3. Анисимов А.П., Никифоров А.К., Еремин С.А., Дроздов И.Г. Конструирование штамма *Yersinia pestis* с повышенной протективностью // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1995. № 11. С. 532–534. [Anisimov A.P., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Drozdov I.G. Design of a *Yersinia pestis* strain with increased protection. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 1995, no. 11, pp. 532–534. (In Russ.)*]
4. Анисимов А.П., Захарова Н.М. Серовариация капсульного антигена возбудителя чумы // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1992. № 9–10. С. 26–29. [Anisimov A.P., Zakharova N.M. Serovariation of the capsule antigen of the plague pathogen. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 1992, no. 9–10, pp. 26–29. (In Russ.)*]
5. Анисимов А.П., Фомченков В.М., Фурсова Н.К. Электрокинетический потенциал клеток *Yersinia pestis* и *Escherichia coli* с интактным или дефектным геном *usaA (cafI)* fra-оперона возбудителя чумы // Генетика. 1994. Т. 30, № 9.

- C. 1160–1165. [Anisimov A.P., Fomchenkov V.M., Fursova N.K. Electrokinetic potential of *Yersinia pestis* and *Escherichia coli* cells with an intact or defective *ycsaA* gene (*caf1M*) of the *fra*-operon of plague pathogen. *Genetika = Genetics*, 1994, vol. 30, no. 9, pp. 1160–1165. (In Russ.)]
6. Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д., Тец В.В. Саморегуляция паразитарных систем. Молекулярно-генетические механизмы. Л.: Медицина, 1987. 240 с. [Belyakov V.D., Golubev D.B., Kaminskii G.D., Tets V.V. *Samoregulyatsiya parazitarnykh sistem. Molekulyarno-geneticheskie mekhanizmy* [Self-regulation of parasitological systems. Molecular-genetic mechanisms]. Leningrad: Medicine, 1987, 240 p.]
  7. Вариводина Т.А., Кудинова Т.П., Кузнецова К.А. Чувствительность серых сурков к дефектным штаммам чумного микроба и особенности иммунологических реакций у этих животных // Проблемы особо опасных инфекций. 1969. № 6 (10). С. 51–54. [Varivodina T.A., Kudinova T.P., Kuznetsova K.A. Gray marmots' response to defective strains of the plague microbe and features of these animals' immunological response. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 1969, no. 6 (10), pp. 51–54. (In Russ.)]
  8. Вейнблат В.И., Никифоров В.В., Кормилицин А.В. Гидродинамическая характеристика капсульного антигена возбудителя чумы // Вопросы генетики, молекулярной биологии и микробиологии чумы и холеры. Саратов: Коммунист, 1985. С. 37–42. [Veinblat V.I., Nikiforov V.V., Kormilitsin A.V. *Gidrodinamicheskaya kharakteristika kapsul'nogo antigena vobzuditelya chummy* [Hydrodynamic characteristic of the plague originator's capsular antigen]. *Voprosy genetiki, molekulyarnoi biologii i mikrobiologii chумы i kholery* [The issues of genetics, molecular biology and microbiology of plague and cholera]. Saratov: Communist, 1985, pp. 37–42.]
  9. Вейнблат В.И., Дальвадянец С.М., Веренков М.С. Методы получения и очистки капсульного антигена и эндотоксина возбудителя чумы // Лабораторное дело. 1983. № 12. С. 37–39. [Veinblat V.I., Dal'vadyants S.M., Verenkov M.S. Methods of preparing and purifying the capsular antigen and endotoxin of the causative agent of plague. *Laboratornoe delo = Laboratory Medicine*, 1983, no. 12, pp. 37–39. (In Russ.)]
  10. Гончаров А.Ю., Гончаров Е.К., Алутин И.М., Марченков В.И. Локализация ответственного за синтез фракции I участка ДНК на плазмиде рУТ чумного микроба // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1992. № 11–12. С. 10–14. [Goncharov A.Yu., Goncharov E.K., Alutin I.M., Marchenkov V.I. Localization of the DNA segment coding for the synthesis of fraction I on the рУТ plague pathogen plasmid. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 1992, no. 11–12, pp. 10–14. (In Russ.)]
  11. Гребцова Н.Н., Чернявская А.С., Лебедева С.А., Иванова В.С. Изучение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов в отношении *Yersinia pestis* с дефектными и полноценными *fra*-генами // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1990. № 5. С. 7–11. [Grebtsova N.N., Chernyavskaya A.S., Lebedeva S.A., Ivanova V.S. The phagocytic activity of peritoneal macrophages in relation to *Yersinia pestis* with defective and complete *fra* genes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1990, no. 5, pp. 7–11. (In Russ.)]
  12. Дармов И.В., Маракулин И.В., Янов С.Н., Бывалов А.А., Абдуллин Т.Г., Смирнов Е.В. Конструирование штаммов-продуцентов антигенов F1 и Т чумного микроба // Биотехнология. 1992. № 6. С. 59–62. [Darmov I.V., Marakulin I.V., Yanov S.N., Byvalov A.A., Abdullin T.G., Smirnov E.V. Construction of plague microbe strains producers of F1 and T antigens. *Biotechnologiya = Biotechnology*, 1992, no. 6, pp. 59–62. (In Russ.)]
  13. Денесюк А.И., Завьялова Г.А., Абрамов В.М., Завьялов В.П. Компьютерный анализ структуры и иммунологической активности F1-антигена чумного микроба // Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний. Киров, 1991. С. 175–176. [Denesyuk A.I., Zav'yalova G.A., Abramov V.M., Zav'yalov V.P. *Komp'yuternyi analiz struktury i immunobiologicheskoi aktivnosti F1-antigena chumnogo mikroba* [Computer analysis of structure and immunobiological efficacy of F1 antigen of the plague microbe]. *Aktual'nye voprosy profilaktiki opasnykh infektsionnykh zabolevanii* [The issues of prevention particular dangerous infections]. Kirov, 1991, pp. 175–176.]
  14. Домарадский И.В. Чума. М.: Медицина, 1998. 176 с. [Domaradskii I.V. *Chuma* [Plague]. Moscow: Meditsina Press., 1998. 176 p.]
  15. Езепчук Ю.В. Биомолекулярные основы патогенности бактерий. М.: Наука, 1977. 216 с. [Ezepchuk Yu.V. *Biomolekulyarnye osnovy patogennosti bakterii* [Biomolecular basis of bacterial pathogenicity]. Moscow: Science, 1977, 216 p.]
  16. Ермакова Г.В., Тараненко Т.М., Наумов А.В. Изучение протективной активности различных по химическому составу препаратов капсульного антигена чумного микроба // Микробиология, биохимия и специфическая профилактика карантинных инфекций. Саратов, 1990. С. 84–89. [Ermakova G.V., Taranenko T.M., Naumov A.V. *Izuchenie protektivnoi aktivnosti razlichnykh po khimicheskomu sostavu preparatov kapsul'nogo antigena chumnogo mikroba* [Studies on protective efficacy of various chemical composition specimens of the plague microbe's capsule antigen]. *Mikrobiologiya, biokhimiya i spetsificheskaya profilaktika karantinnykh infektsii* [Microbiology, biochemistry and specific prevention of quarantine infections]. Saratov, 1990, pp. 84–89.]
  17. Желтенков А.И. О чумном токсине, анатоксине, противочумной антитоксической сыворотке и методах стандартизации их на белых мышах // Вестник микробиологии, эпидемиологии и паразитологии. 1939. № 17. С. 272–301. [Zheltenkov A.I. About plague toxin, toxoid, anti-plague antitoxic serum and methods of its standardization on white mice. *Vestnik mikrobiologii, epidemiologii i parazitologii = Herald of Epidemiology, Microbiology and Parasitology*, 1939, no. 17, pp. 272–301. (In Russ.)]
  18. Золотарев А.Г., Кедров В.А., Паутов В.Н. Изучение локализации антигена F1 *Yersinia pestis* EV иммуноферритиновым методом // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1983. № 7. С. 62–64. [Zolotarev A.G., Kedrov V.A., Pautov V.N. Localization of antigen F-1 of *Yersinia pestis* EV by an immunoferritin method. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1983, no. 7, pp. 62–64. (In Russ.)]
  19. Исин Ж.М., Тугамбаев Т.И. Структурно-функциональные свойства и биологическая активность капсульного антигена, «мышинного» токсина и эндотоксина *Yersinia pestis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1987. № 4. С. 91–98. [Isin Zh.M., Tugambaev T.I. Structural and functional properties and the biological activity of *Yersinia pestis* capsular antigen, murine toxin and endotoxin. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1987, no. 4, pp. 91–98. (In Russ.)]

20. Кац Л.Н. О субмикроскопической структуре *Pasteurella pestis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1966. № 7. С. 84–86. [Kats L.N. On the submicroscopic structure of *Pasteurella pestis* Holland. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1966, no. 7, pp. 84–86. (In Russ.)]
21. Коссе Л.В., Лебедева С.А., Кузнецова Л.С., Черныявская А.С., Заренков М.И. Новые данные, относящиеся к специфичности и генетическому контролю капсульного антигена (F1) *Yersinia pestis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1997. № 2. С. 29–33. [Kosse L.V., Lebedeva S.A., Kuznetsova L.S., Chernyavskaya A.S., Zarenkov M.I. New data on the specificity and genetic control of the capsular antigen (F1) in *Yersinia pestis*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1997, no. 2, pp. 29–33. (In Russ.)]
22. Куклева Л.М., Карасева З.Н., Кондрашин Ю.И. Фагоцитоз штаммов чумного микроба перитонеальными макрофагами интактных и иммунизированных животных // Вопросы генетики, молекулярной биологии и микробиологии чумы и холеры. Саратов, 1985. С. 42–48. [Kukleva L.M., Karaseva Z.N., Kondrashin Yu.I. Fagotsitoz shtammov chumnogo mikroba peritoneal'nymi makrofagami intaktnykh i immunizirovannykh zhivotnykh [Phagocytosis of the plague microbe strains by peritoneal macrophages of intact and immunized animals]. *Voprosy genetiki, molekulyarnoi biologii i mikrobiologii chumy i kholyery* [Questions on genetics, molecular biology and microbiology of plague and cholera]. *Saratov*, 1985, pp. 42–48.]
23. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М.: Медицина, 2007. 222 с. [Kutyrev V.V., Konnov N.P., Volkov Yu.P. *Vozбудitel' chumy: ul'trastruktura i lokalizatsiya v perenoschike* [The plague pathogen: ultrastructure and localization in a carrier]. *Moscow: Medicine*, 2007, 222 p.]
24. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология чумы. Саратов, 1992. 172 с. [Naumov A.V., Ledvanov M.Yu., Drozdov I.G. *Immunologiya chumy* [Immunology of plague]. *Saratov*, 1992, 172 p.]
25. Пилипенко В.Г., Тарасова В.В., Попов В.А. О циркуляции антител F1 чумного микроба у горных сусликов, перенесших однократное заражение возбудителем, и значение этого фактора в формировании бактерионосительства после повторного заражения чумой // Профилактика природноочаговых инфекций. Ставрополь, 1983. С. 129–131. [Pilipenko V.G., Tarasova V.V., Popov V.A. O tsirkulyatsii antitel F1 chumnogo mikroba u gornykh suslikov, perenesshikh odnokratnoe zarazhenie возбудителем, i znachenie etogo faktora v formirovanii bakterionositel'stva posle povtornogo zarazheniya chumoi [About circulation of antibodies F1 of the plague microbe in little ground squirrels single infected by the pathogen, and the significance of this factor in forming bacteria carriage after second plague infecting]. *Profilaktika prirodnoochagovykh infektsii* [Prevention of natural focal infections]. *Stavropol*, 1983, pp. 129–131.]
26. Прокопьева Е.Д., Прокопьев А.А., Дальвадянц С.Н. Изучение индукции интерлейкина-I и фактора некроза опухоли мышинными макрофагами под воздействием капсульного антигена возбудителя чумы // Микробиология, биохимия и специфическая профилактика карантинных инфекций. Саратов, 1990. С. 77–84. [Prokop'eva E.D., Prokop'ev A.A., Dal'vadyants S.N. Izuchenie induktsii interleikina-I i faktora nekroza opukholi myshinyimi makrofagami pod vozdeystviem kapsul'nogo antigena возбудителя чумы [Studies on induction of the interleukine-I and necrotizing factor of tumor by mouse macrophages under the influence of the plague pathogen's capsule antigen]. *Mikrobiologiya, biokhimiya i spetsificheskaya profilaktika karantinnykh infektsii* [Microbiological, biochemical and specific prevention of quarantine infections]. *Saratov*, 1990, pp. 77–84.]
27. Проценко О.А., Анисимов П.И., Можаров О.Т., Коннов Н.П., Попов Ю.А., Кокушкин А.М. Выявление и характеристика плазмид чумного микроба, детерминирующих синтез пестицина I, антигена фракция I и экзотоксина «мышинного» токсина // Генетика. 1983. № 19. С. 1081–1090. [Protsenko O.A., Anisimov P.I., Mozharov O.T., Konnov N.P., Popov Yu.A., Kokushkin A.M. Detection and characterization of the plasmids of the plague microbe which determine the synthesis of pest-ticin I, fraction I antigen and “mouse” toxin exotoxin. *Genetika = Genetics*, 1983, no. 19, pp. 1081–1090. (In Russ.)]
28. Проценко О.А., Филиппов А.А., Кутырев В.В. Гетерогенность популяций штаммов возбудителя чумы по плазмидному составу // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1992. № 3–4. С. 20–24. [Protsenko O.A., Filippov A.A., Kutyrev V.V. Plasmid heterogeneity in populations of *Yersinia pestis* strains. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 1992, no. 3–4, pp. 20–24. (In Russ.)]
29. Пунский Е.Е., Левина А.А., Вологина И.И. Потеря способности возбудителя чумы синтезировать фракцию I при длительном нахождении его в организме большой песчанки // Проблемы особо опасных инфекций. 1972. Вып. 2 (24). С. 20–24. [Punskii E.E., Levina A.A., Vologina I.I. Loss of capacity of the plague pathogen's for synthesis of fraction I at its long-term presence in an organism of ill great gerbil. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 1972, no. 2 (24), pp. 20–24. (In Russ.)]
30. Сагимбеков У.А., Рапопорт Л.П. Об особенностях штаммов возбудителя чумы, выделенных в различных популяциях больших песчанок в Муюнкумах // Микробиология, генетика и иммунология чумы и холеры. Саратов, 1983. С. 11–13. [Sagimbekov U.A., Rapoport L.P. Ob osobennostyakh shtammov возбудителя чумы, vydelennykh v razlichnykh populyatsiyakh bol'shikh peschanok v Muyunkumakh [About features of the plague pathogen strains, isolated in various populations of great gerbils in the Muyunkum desert]. *Mikrobiologiya, genetika i immunologiya chumy i kholyery* [Microbiology, genetics and immunology of plague and cholera]. *Saratov*, 1983, pp. 11–13.]
31. Сагимбеков У.А., Пошевина Г.О., Красноусова Н.В. Свойства атипичных штаммов чумного микроба, выделенных весной 1977 г. в Муюнкумах и Саксауловой Даче // Патологическая физиология особо опасных инфекций. Саратов, 1981. С. 82–86. [Sagimbekov U.A., Poshevina G.O., Krasnousova N.V. Svoystva atipichnykh shtammov chumnogo mikroba, vydelennykh vesnoi 1977 g. v Muyunkumakh i Saksaulovoi Dache [Properties of the plague microbe atypical strains, isolated in the Muyunkum desert and Saxaul-plot in spring 1977]. *Patologicheskaya fiziologiya osobo opasnykh infektsii* [Pathophysiology of particularly dangerous infections]. *Saratov*, 1981, pp. 82–86.]
32. Сердобинцев Л.Н., Тараненко Т.М., Веренков М.С., Наумов А.В. Получение капсульного антигена методом одноэтапной гелевой фильтрации // Вопросы профилактики природно-очаговых инфекций. Саратов, 1983. С. 37–41. [Serdobintsev L.N., Taranenko T.M., Verenkov M.S., Naumov A.V. Poluchenie kapsul'nogo antigena metodom odnoetapnoi gelevoi fil'tratsii [Preparing the capsule antigen by one-stage gel filtration procedure]. *Voprosy profilaktiki prirodno-ochagovykh infektsii* [The issues of prevention of natural focal infections]. *Saratov*, 1983, pp. 37–41.]



33. Способ получения мутантов чумного микроба дефектных по синтезу капсульного антигена фракции I: А. С. № 1754779, кл. С 12 N 15/00: Заявка 4863570 Рос. Федерация / Карлышев А.В., Кравченко В.И., Красильникова В.М., Анисимов А.П.; заявл. 22.06.90, опубл. 15.08.92; зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР 15.04.92. [*Sposob polucheniya mutantov chumnogo mikroba defektnykh po sintezu kapsul'nogo antigena fraktsii I*] [Method of generation of plague microbe mutants deficient in capsule antigen synthesis in fraction I]; А. С. no. 1754779, С 12 N 15/00: request 4863570 Russian Federation / Karlyshev A.V., Kravchenko V.I., Krasil'nikova V.M., Anisimov A.P.; statement 22.06.90, published 15.08.92; registered in the State register of inventions of the USSR 15.04.92. (*In Russ.*)
34. Титенко М.М., Новохатский А.С., Коссе Л.В. Новые данные по характеристике препарата F1A капсульного антигена возбудителя чумы // Вестник Всесоюзного микробиологического общества (Ростовское отделение). 1989. № 1. С. 118–123. [Titenko M.M., Novokhatskii A.S., Kosse L.V. A new data set of the specimen F1A characteristic of the plague pathogen. *Vestnik Vsesoyuznogo mikrobiologicheskogo obshchestva (Rostovskoe otdelenie) = Bulletin of All-Union Microbiological Association (Rostov Branch)*, 1989, no. 1, pp. 118–123. (*In Russ.*)]
35. Титенко М.М., Вейнблат В.И., Веренков М.С., Васенин А.С. Препаративный метод выделения и очистки капсульного антигена возбудителя чумы при помощи изоэлектрической преципитации // Диагностика и профилактика особо опасных инфекций. Саратов, 1983. С. 34–39. [Titenko M.M., Veinblat V.I., Verenkov M.S., Vasenin A.S. Preparativnyi metod vydeleniya i ochistki kapsul'nogo antigena vzbudatelya chумы pri pomoshchi izoelektricheskoi pretsipitatsii [Preparative method of preparing and purifying the capsular antigen of the plague pathogen by isoelectric precipitation]. *Diagnostika i profilaktika osobo opasnykh infektsii* [Diagnostics and prevention of particular dangerous infections]. *Saratov*, 1983, pp. 34–39.]
36. Топорков В.П., Леви М.И., Белобородов Р.А., Пунский Е.Е., Зарипов Ш.Н., Солодкова Л.Н., Афанасьева М.А., Балухин В.Н. Результаты комплексного исследования больших песчанок в фазу завершения эпизоотии чумы // Совершенствование методов диагностики и профилактики чумы и холеры. Саратов, 1987. С. 23–29. [Toporkov V.P., Levi M.I., Beloborodov R.A., Punskey E.E., Zaripov Sh.N., Solodkova L.N., Afanas'eva M.A., Balukhin V.N. Rezul'taty kompleksnogo issledovaniya bol'shikh peschanok v fazu zaversheniya epizootii chумы [Results of the comprehensive research of great gerbils at the plague epizootic termination phase, of plague and cholera]. *Sovershenstvovanie metodov diagnostiki i profilaktiki chумы i kholery* [Improvement of methods for diagnosis and prophylaxis of plague and cholera]. *Saratov*, 1987, pp. 23–29.]
37. Тюлембаев М.А., Атчабаров Б.Б., Соорбеков О.С. Влияние аминокислот, витаминов, урацила и некоторых солей на синтез фракции I чумного микроба // Патологическая физиология, иммунология и аллергология особо опасных инфекций. Саратов, 1984. С. 27–30. [Tyulembaev M.A., Atchabarov B.B., Soorbekov O.S. Vliyaniye aminokislot, vitaminov, uratsila i nekotorykh solei na sintez fraktsii I chumnogo mikroba [Effect of amino acids, vitamins, uracil and certain salts on synthesis of plague pathogen's fraction I]. *Patologicheskaya fiziologiya, immunologiya i allergologiya osobo opasnykh infektsii* [Pathophysiology of particularly dangerous infections]. *Saratov*, 1984, pp. 27–30.]
38. Филиппов А.А., Солодовников Н.С., Куклева Л.М., Проценко О.А. Изучение плазмидного состава штаммов возбудителя чумы из разных природных очагов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1992. № 3. С. 10–13. [Filippov A.A., Solodovnikov N.S., Kukleva L.M., Protsenko O.A. Plasmid composition of *Yersinia pestis* strains from different natural foci. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1992, no. 3, pp. 10–13. (*In Russ.*)]
39. Хлебцов Н.Г., Никифоров В.В., Мельников А.Г., Меркулова Т.К., Сердобинцев Л.Н. Спектроскопия упругого рассеяния растворов капсульного белка чумного микроба // Биополимеры и клетки. 1990. Т. 6, № 2. С. 81–87. [Khlebtsov N.G., Nikiforov V.V., Mel'nikov A.G., Merkulova T.K., Serdobintsev L.N. The elastic-scattering spectroscopy of plague microbe's capsular protein solutions. *Biopolimery i kletki = Biopolymers and Cells*, 1990, vol. 6, no. 2, pp. 81–87. (*In Russ.*)]
40. Шишкина О.Г., Кириллина О.А., Попов Ю.А. Получение рекомбинантных молекул ДНК, содержащих фрагменты плазмиды pFra чумного микроба // Микробиология и биохимия особо опасных инфекций. Саратов, 1988. С. 11–16. [Shishkina O.G., Kirillina O.A., Popov Yu.A. Poluchenie rekombinantnykh molekul DNK, soderzhashchikh fragmenty plazmidy pFra chumnogo mikroba [The preparation of recombinant DNA molecules containing fragments of plasmid *Yersinia pestis* pFra]. *Mikrobiologiya i biokhimiya osobo opasnykh infektsii* [Microbiology and biochemistry of particularly dangerous infections]. *Saratov*, 1988, pp. 11–16.]
41. Abramov V.M., Vasiliev A.M., Khlebnikov V.S., Vasilenko R.N., Kulikova N.L., Kosarev I.V., Ishchenko A.T., Gillespie J.R., Millett I.S., Fink A.L., Uversky V.N. Structural and functional properties of *Yersinia pestis* CafI capsular antigen and their possible role in fulminant development of primary pneumonic plague. *J. Proteome Res.*, 2002, no. 1, pp. 307–315. doi: 10.1021/pr025511u
42. Andrews G.P., Heath D.G., Anderson G.W., Welkos S.L., Friedlander A.M. Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, no. 6, pp. 2180–2187.
43. Anisimov A.P., Dyatlov I.A. A novel mechanism of antibiotic resistance in plague? *J. Med. Microbiol.*, 1997, vol. 46, pp. 887–889.
44. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, vol. 17, no. 2, pp. 434–464. doi: 10.1128/CMR.17.2.434-464.2004
45. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E., Meyer E., Meyer K.F. Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of the *Pasteurella pestis*. *J. Immunol.*, 1952, vol. 68, no. 2, pp. 131–145.
46. Behrens S., Hershko A., Ciechanover A., Varshavsky A. Periplasmic chaperones — preservers of subunit folding energy for organelle assembly. *Cell*, 2003, vol. 113, no. 5, pp. 556–557. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00396-9
47. Bennett L.G., Tornabene T.G. Characterization of the antigenic subunits of the envelope protein of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.*, 1974, vol. 117, no. 1, pp. 48–55.
48. Bertin Y., Girardeau J.-P., Der Vartanian M., Martin C. The ClpE protein involved in biogenesis of the CS31A capsule-like antigen is a member of a periplasmic chaperone family in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, vol. 108, pp. 59–68. doi: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb06074.x

49. Burrows T.W., Bacon G.A. The effects of loss of different virulence determinants on the virulence and immunogenicity of strains of *Pasteurella pestis*. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 1958, vol. 39, no. 3, pp. 278–291.
50. Cavanaugh D.C., Randall R. The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea-borne plague. *J. Immunol.*, 1959, vol. 83, pp. 348–371.
51. Charnetzky W.T., Shuford W.W. Survival and growth of *Yersinia pestis* within macrophages and on effect of the loss of the 47-megadalton plasmid on growth in macrophages. *J. Infect. Immun.*, 1985, vol. 47, pp. 234–241.
52. Chen T.H., Elberg S.S. Scanning electron microscopic study of virulent *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* type I. *Infect. Immun.*, 1977, vol. 15, no. 3, pp. 972–977.
53. Cornelis G.R. The *Yersinia* deadly kiss. *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, no. 21, pp. 5495–5504.
54. Dodd D.C., Eisenstein B.I. Dependence of secretion and assembly of type 1 fimbrial subunits on normal protein export. *J. Bacteriol.*, 1984, vol. 159, no. 3, pp. 1077–1079.
55. Drozdov I.G., Anisimov A.P., SamoiloVA S.V., Yezhov I.N., Yeremin S.A., Karlyshev A.V., Krasilnikova V.M., Kravchenko V.I. Virulent non-capsulate *Yersinia pestis* variants constructed by insertion mutagenesis. *J. Med. Microbiol.*, 1995, vol. 42, no. 4, pp. 264–268. doi: 10.1099/00222615-42-4-264
56. Feodorova V.A., Devdariani Z.L. New genes involved in *Yersinia pestis* fraction I biosynthesis. *J. Med. Microbiol.*, 2001, vol. 50, pp. 969–978.
57. Finlay B.B., Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol.*, 1997, vol. 61, no. 2, pp. 136–169.
58. Fox E.N., Higuchi K. Synthesis of the fraction I antigenic protein by *Pasteurella pestis*. *J. Bacteriol.*, 1958, vol. 75, no. 2, pp. 209–216.
59. Friedlander A.M., Welkos S.L., Worsham P.L., Andrews G.P., Heath D.G., Anderson G.W.Jr., Pitt M.L., Estep J., Davis K. Relationship between virulence and immunity as revealed in recent studies of the F1 capsule of *Yersinia pestis*. *Clin. Inf. Dis.*, 1995, vol. 21, suppl. 2, pp. S178–S181. doi: 10.1093/clinids/21.Supplement\_2.S178
60. Galyov E.E., Smirnov O.Yu., Karlyshev A.V., Volkovoy K.I., Denesyuk A.I., Nazimov I.V., Rubtsov K.S., Abramov V.M., Dalvadyanz S.M., Zav'yalov V.P. Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding F1 antigen and the primary structure of the protein. Putative T and B cell epitopes. *FEBS Lett.*, 1990, vol. 227, no. 1–2, pp. 230–232.
61. Garcia E., Chain P., Worsham P., Bearden S.W., Malfatti S., Lang D., Larimer F., Lindler L., Pestoides F., an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007, vol. 603, pp. 17–22.
62. Girardeau J.-P., Vartanian M., Der Ollier J.L., Contrepolis M. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.*, 1988, vol. 56, no. 8, pp. 2180–2188.
63. Glosnicka R., Gruszkiewicz E. Chemical composition and biological activity of the *Yersinia pestis* envelope substance. *Infect. Immun.*, 1980, vol. 30, pp. 506–512.
64. Golubov A., Neubauer H., Noelting C., Heesemann J., Rakin A. Structural organization of the pFra virulence-associated plasmid of rhamnase-positive *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, pp. 5613–5621. doi: 10.1128/IAI.72.10.5613-5621.2004
65. Hultgren S.J., Jones C.H. Utility of the immunoglobulin-like fold of chaperones in shaping organelles of attachment in pathogenic bacteria. The chaperone/usher pathway is a paradigm of certain facets of organelle development. *ASM News*, 1995, vol. 61, pp. 457–464.
66. Janssen W.A., Lawton W.D., Fukui G.M., Surgalla M.J. The pathogenesis of plague: I. A study of the correlation between virulence and relative phagocytosis resistance of some strains of *Pasteurella pestis*. *J. Infect. Dis.*, 1963, vol. 113, no. 2, pp. 139–143. doi: 10.1093/infdis/113.2.139 <http://jid.oxfordjournals.org/content/113/2/139.long>
67. Kagan B.L., Selsted M.E., Ganz T., Lehrer R.I. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, no. 1, pp. 210–214.
68. Karlyshev A., Galyov E., Smirnov O., Abramov V., Zav'yalov V.P. Structure and regulation of a gene cluster involved in capsule formation of *Yersinia pestis*. In: *Biological membranes: structure, biogenesis and dynamics*; eds.: Jos A.F. Op den Kamp. Berlin, Germany: NATO ASI Series. Series H: Cell Biology, Springer-Verlag, 1994, vol. 82, pp. 321–330.
69. Klemm P., Jørgensen B.J., Kreft B., Christiansen G. The export systems of type 1 and F1C fimbriae are interchangeable but work in parental pairs. *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, no. 3, pp. 621–627.
70. Lawton W.D., Fukui G.W., Surgalla M.G. Studies on the antigens of *Pasteurella pestis* and *Pasteurella pseudotuberculosis*. *J. Immunol.*, 1960, vol. 84, no. 5, pp. 475–479.
71. Mencher J.S., Smith S.R., Powell T.D., Stinchcomb D.T., Osorio J.E., Locke T.E. Protection of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) against plague after voluntary consumption of baits containing recombinant raccoon poxvirus vaccine. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 9, pp. 5502–5505.
72. Muller-Eberhard H.J. Complement. *Ann. Rev. Biochem.*, 1975, vol. 44, pp. 695–724.
73. Musson J.A., Morton M., Walker N., Harper H.M., McNeill H.V., Williamson E.D., Robinson J.H. Sequential proteolytic processing of the capsular Caf1 antigen of *Yersinia pestis* for MHC class II-restricted presentation to T lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, no. 36, pp. 26129–26135. doi: 10.1128/IAI.72.9.5502-5505.2004
74. Neubauer H., Aleksis S., Meyer H., Spletstoesser W.D. Mapping of B-cell epitopes of the F1 capsular antigen of *Y. pestis*. *Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor)*, 1998, vol. 6, suppl. II, pp. S10–S11.
75. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* — etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol.*, 1997, vol. 10, no. 1, pp. 35–66.
76. Pirt S.T., Theckerey E.T., Harris-Smith R. The influence of environment on antigen production by *Pasteurella pestis* studies by means of the continuous flow culture technique. *J. Gen. Microbiol.*, 1961, vol. 25, pp. 119–130. doi: 10.1099/00221287-25-1-119
77. Protsenko O.A., Filippov A.A., Kutyrev V.V. Integration of the plasmid encoding the synthesis of capsular antigen and murine toxin into *Yersinia pestis* chromosome. *Microb. Pathogen.*, 1991, vol. 11, pp. 123–128.
78. Reddin K.M., Easterbrook T.J., Robinson A., Williamson D., Rhind-Tutt R. Large-scale purification of the F1 antigen of *Yersinia pestis*. *Contrib. Microbiol. Immunol.*, 1995, vol. 13, pp. 329–330. doi:10.1016/0882-4010(91)90005-U
79. Revazishvili T., Rajanna C., Bakanidze L., Tsertsvadze N., Imnadze P., O'Connell K., Kreger A., Stine O. C., Morris Jr.J.G., Sulakvelidze A. Characterisation of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia, and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, vol. 14, no. 5, pp. 429–436. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.01953.x.



80. Rodrigues C.G., Carneiro C.M., Barbosa C.T., Nogueira R.A. Antigen F1 from *Yersinia pestis* forms aqueous channels in lipid bilayer membranes. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1992, vol. 25, no. 1, pp. 75–79.
81. Rowland S. The morphology of the plague bacillus. *J. Hyg.*, 1914, vol. 13, suppl. 3, pp. 418–422.
82. Runco L.M., Myrczek S., Bliska J.B., Thanassi D.G. Biogenesis of the F1 capsule and analysis of the ultrastructure of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 9, pp. 3381–3385. doi: 10.1128/JB.01840-07. doi: 10.1128/JB.01840-07
83. Russell A.D., Furr J.R., Maillard J.-Y. Microbial susceptibility and resistance to biocides. *ASM News.*, 1997, vol. 63, pp. 481–487.
84. Santi L., Giritch A., Roy C.J., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y., Webb R., Arntzen C.J., Mason H.S. Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 4, pp. 861–866. doi: 10.1073/pnas.0510014103
85. Schütze H. Studies on *Bacterium pestis* antigens: III. The prophylactic value of the envelope and somatic antigens of *B. pestis*. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1932, vol. 13, no. 3, pp. 293–298.
86. Simonet M., Richard S., Berche P. Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect. Immun.*, 1990, vol. 58, pp. 841–845.
87. Simpson W.J., Thomas R.E., Schwan T.G. Recombinant capsular antigen (fraction I) from *Yersinia pestis* induces a protective antibody response in BALB/c mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1990, vol. 43, no. 4, pp. 389–396.
88. Titball R.W., Howells A.M., Oyston P.C.F., Williamson E.D. Expression of the *Yersinia pestis* capsular antigen (F1 antigen) on the surface of an *aroA* mutant of *Salmonella typhimurium* induces high levels of protection against plague. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65, pp. 1926–1930.
89. Van Oss C.J. Phagocytosis as a surface phenomenon. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1978, vol. 32, pp. 19–39. doi: 10.1146/annurev.mi.32.100178.000315.
90. Vorontsov E.D., Dubichev A.G., Serdobintsev L.N., Naumov A.V. Association-dissociation processes and supermolecular organization of the capsule antigen (protein F1) of *Yersinia pestis*. *Biomed Sci.*, 1990, vol. 1, no. 4, pp. 391–396.
91. Walker R.V. Studies on the immune response of guinea pigs to the envelope substance of *P. pestis*: II. Fluorescent antibody studies of cellular and tissue response in mice and guinea pigs to large doses of fraction I. *J. Immunol.*, 1962, vol. 88, pp. 164–173.
92. Williams R.C., Gewurz H., Quie P.G. Effects of fraction 1 from *Yersinia pestis* on phagocytosis in vitro. *J. Infect. Dis.*, 1972, vol. 126, no. 3, pp. 235–241. doi: 10.1093/infdis/126.3.235
93. Winter C.C., Cherry W.B., Moody M.D. An unusual strain of *Pasteurella pestis* isolated from a fatal human case of plague. *Bull. World Health Organ.*, 1960, vol. 23, no. 2–3, pp. 408–409.
94. Worsham P.L., Stein M.-P., Welkos S.L. Construction of defined F1 negative mutants of virulent *Yersinia pestis*. *Contr. Microbiol. Immunol.*, 1995, vol. 13, pp. 325–328.
95. Yersin A. La peste bubonique à Hong-Kong. *Ann. Inst. Pasteur*, 1894, vol. 8, pp. 662–667.
96. Zav'yalov V.P., Denesyuk A.I., Zav'yalova G.A., Korpela T. Molecular modeling of the steric structure of the envelope F1 antigen of *Yersinia pestis*. *Immunol. Lett.*, 1995, vol. 45, no. 1–2, pp. 19–22. doi: 10.1016/0165-2478(94)00194-V
97. Zav'yalov V.P., Chernovskaya T.V., Navolotskaya E.V., Karlyshev A.V., MacIntyre Sh., Vasiliev A.M., Abramov V.M. Specific high affinity binding of human interleukin 1 $\beta$  by Caf1A usher protein of *Yersinia pestis*. *FEBS Lett.*, 1995, vol. 371, iss. 1, pp. 65–68. doi: 10.1016/0014-5793(95)00878-D

**Авторы:**

**Кадникова Л.А.**, стажер-исследователь отдела коллекционных культур ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Копылов П.Х.**, к.б.н., зав. сектором биохимии отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Дентовская С.В.**, д.м.н., зав. лабораторией микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Анисимов А.П.**, д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия.

**Authors:**

**Kadnikova L.A.**, Intern of the Microorganisms Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Kopylov P.K.**, PhD (Biology), Head of Biochemical Sector, Department for Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Dentovskaya S.V.**, PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Anisimov A.P.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.05.2015  
 Отправлена на доработку 05.06.2015  
 Принята к печати 07.07.2015

Received 24.05.2015  
 Revision received 05.06.2015  
 Accepted 07.07.2015

# КЛЕТОЧНЫЕ ТЕСТЫ РЕАКТИВНОСТИ И ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫХ СОЦИАЛЬНО СОХРАННЫХ БОЛЬНЫХ С ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

А.В. Мордык, Л.В. Пузырева, Т.Л. Батищева

ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Омск, Россия

**Резюме.** С целью выявления нарушений реактивности организма и оценки степени эндогенной интоксикации проведен расчет лейкоцитарных индексов крови и выявлено их влияния на исход инфильтративного туберкулеза легких у впервые выявленных социально сохранных больных. Ретроспективно были проанализированы 260 историй болезней. Критерии включения: впервые в жизни установленный и подтвержденный диагноз инфильтративного туберкулеза легких; возраст от 18 лет; социально сохранные пациенты (пациенты, имеющие место работы (официальное или неофициальное), постоянный доход в семье, место жительства, прописку). Критерии исключения: внелегочные или другие формы туберкулеза легких у пациента; наличие тяжелых соматических заболеваний; ВИЧ-инфекция; наличие злокачественных новообразований; психические заболевания; социально дезадаптированные пациенты (лица БОМЖ, неработающие, освободившиеся из мест заключения или находящиеся под следствием, злоупотребляющие алкоголем в форме запоев и принимающие наркотические средства). Все включенные в исследование больные были разделены на две группы: первая (основная) — пациенты с неблагоприятным исходом в количестве 66, вторая (группа сравнения) — пациенты с благоприятным исходом инфильтративного туберкулеза легких, в количестве 194. Критерием неблагоприятного исхода явилось наличие (сохранение) полости распада в легочной ткани на последнем рентгенологическом снимке. По результатам общего анализа крови была проведена оценка лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ) по формуле Кальф-Калифа, индекса сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК), индекса резистентности организма (ИРО), ядерного индекса (ЯИ) Даштаянца. В последующем оценивался корреляционный анализ Спирмена в модуле пакета программ Statistica 6.0. В результате исследования были получены следующие данные. Наиболее сильное влияние на развитие неблагоприятного исхода инфильтративного туберкулеза легких у социально сохранных пациентов оказывает высокий уровень ЯИ Даштаянца при первичном исследовании крови; умеренное отрицательное влияние оказывают высокие уровни ЛИИ и ИСЛК на момент начала терапии. Слабое положительное влияние на развитие неблагоприятного исхода туберкулеза оказывал низкий уровень ИРО на момент начала лечения, а слабое отрицательное — высокий уровень ЛИИ после первого месяца лечения и высокий ИСЛК через 2 месяца интенсивного лечения в стационаре. Комплексная оценка интегральных индексов крови позволяет объективно судить о тяжести состояния пациента, о необходимости и продолжительности дезинтоксикационной терапии, что влияет на исход основного заболевания.

**Ключевые слова:** реактивность организма, туберкулез, эндогенная интоксикация, диагностические тесты, инфильтративный туберкулез, социальные больные.

---

**Адрес для переписки:**

Мордык Анна Владимировна  
644050, Россия, г. Омск, ул. Химиков, 8А, ГБОУ ВПО Омский  
государственный медицинский университет МЗ РФ.  
Тел.: 8 (3812) 40-45-15.  
E-mail: amordik@mail.ru

**Contacts:**

Anna V. Mordyk  
644050, Russian Federation, Omsk, Himikov str., 8A,  
Omsk State Medical University.  
Phone: +7 (3812) 40-45-15.  
E-mail: amordik@mail.ru

**Библиографическое описание:**

Мордык А.В., Пузырева Л.В., Батищева Т.Л. Клеточные тесты реактивности и эндогенной интоксикации у впервые выявленных социально сохранных больных с инфильтративным туберкулезом легких // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 219–224. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-219-224

**Citation:**

Mordyk A.V., Puzyreva L.V., Batishcheva T.L. Reactivity and endogenous intoxication cellular tests of the first time diagnosed socially adopted patients with infiltrative lung tuberculosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 219–224. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-219-224

## REACTIVITY AND ENDOGENOUS INTOXICATION CELLULAR TESTS OF THE FIRST TIME DIAGNOSED SOCIALLY ADOPTED PATIENTS WITH INFILTRATIVE LUNG TUBERCULOSIS

Mordyk A.V., Puzyreva L.V., Batishcheva T.L.

Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

**Abstract.** The purpose of the research was to assess the endogenous intoxication degree and reactivity condition of an organism by calculation the blood leukocyte indexes and their influence assessment for the outcome of first time diagnosed infiltrative lung tuberculosis for the revealed socially safe patients. Case-records of 260 patients were analysed retrospectively. Inclusion criteria were: first time diagnosed and confirmed diagnosis of infiltrative lungs tuberculosis; age at least 18 years; socially adopted patients (the patients taking official or informal work place), the constant income in a family, a residence, a registration. Exception criteria were: extra pulmonary or other forms of lung tuberculosis at the patient; existence of a serious somatic illness; HIV infection; existence of malignant new growths; mental diseases; the social disadaptation (homeless persons who aren't working, released from jails or being under examination, abusing alcohol in the form of hard drinkings and accepting drugs). All patients included in research were divided into two groups: first (main) — patients with a failure in quantity the 66, second (group of comparison) — patients with a favourable outcome of infiltrative tuberculosis of lungs, in number of 194. Failure criterion was the existence (preservation) of a disintegration lung cavity confirmed by the last X-ray picture. According patients blood test results the intoxication leukocyte index (ILI, with Kalf-Kalif formula), an blood leukocytes shift index (BLSI), an organism resistance index (ORI), a Dashtayants nuclear index was carried out. Followly the Spirmen correlation analysis with Statistica 6.0 software package was estimated. As a result of research the following data were obtained. The Dashtayants nuclear index high level at primary blood test has the strongest impact on development of infiltrative lungs tuberculosis failure in patients; the ILI and BLSI high levels at the time of the beginning of therapy have moderate negative impact. The ORI low level at the time of an treatment initiation had weak positive impact on development of a failure of tuberculosis, and weak negative — rendered the LII high level after the first month of treatment and high BLSI in 2 months of intensive treatment in a hospital. The complex assessment of integrated indexes of blood allows judging objectively weight of a condition of the patient, need and duration of desintoxication therapy that influences an outcome of the main disease.

**Key words:** reactivity of an organism, tuberculosis, endogenous intoxication, diagnostic tests, infiltrative tuberculosis, social patients.

## Введение

Роль инфекционных агентов в развитии эндогенной интоксикации крайне высока и не вызывает сомнений, чему посвящено много научных работ в медицинской литературе [2, 12, 15, 20]. Известно, что эндогенная интоксикация, являясь одним из главных составляющих воспалительно-деструктивного процесса в организме и имея несколько механизмов возникновения [18], встречается при различных заболеваниях [14, 17, 19], в том числе и при инфильтративном туберкулезе легких, который диагностируется более чем у 75% больных среди впервые выявленного контингента [4, 22]. Социальный статус больных туберкулезом изменяется в сторону увеличения социально сохранных лиц [10], молодого, трудоспособного пациента, увеличивается доля женщин фертильного возраста [7, 8, 13], что должно быть ведущей мотивацией к повышению эффективности лечения туберкулеза.

Анализ результатов исследования эндогенной интоксикации у больных туберкулезом легких позволил некоторым авторам судить о давности туберкулезного процесса [3], о течении туберкулеза по остропрогрессирующему варианту [1], об исходе специфического процесса [9].

Многими авторами предлагается оценивать в динамике состояние различных звеньев го-

меостаза и косвенно судить о клеточном и гуморальном иммунитете [11], антитоксической и антителообразующей функциях организма, осуществляя мониторинг изменений в системе крови, приведя множество отдельных параметров к единому расчетному показателю с помощью расчета диагностических индексов крови [16, 21, 23].

Цель: по интегральным клеточным тестам оценить реактивность организма, степень эндогенной интоксикации, их влияние на исход инфильтративного туберкулеза легких у впервые выявленных социально сохранных больных.

## Материалы и методы

Использовали клинические данные, общий анализ крови, клеточные тесты: лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ), рассчитываемый по формуле Кальф-Калифа (1), индекс сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК) (2), индекс резистентности организма (ИРО) (3), ядерный индекс Даштаянца (ЯИ) (4). Нормативная величина ЛИИ в зависимости от возраста колеблется от  $0,62 \pm 0,09$  до  $1,6 \pm 0,5$  и даже до 1–3 усл. ед. [5, 6]. Возрастание данного показателя говорит о повышении уровня эндогенной интоксикации и активации процессов распада. ЛИИ  $2,7 - 3,7 \pm 0,67$  усл. ед. соответствует легкой степени

интоксикации,  $3,7-4,8 \pm 0,53$  усл. ед. — средней степени,  $5,8-8,5 \pm 1,4$  — тяжелой степени, ЛИИ  $> 8,6$  усл. ед. указывает на крайне тяжелую степень ЭИ. При стойком повышении ЛИИ выше  $6,9 \pm 1,5$  усл. ед. (на протяжении 3–5 дней и более) независимо от проводимой терапии высока вероятность неблагоприятного исхода воспалительных заболеваний [5, 21].

В норме ИСЛК составляет  $1,96 \pm 0,56$  и не зависит от общего числа лейкоцитов крови. Повышение ИСЛК свидетельствует об активном воспалительном процессе и нарушении иммунологической реактивности.

Рассчитывался ИРО, в который ЛИИ по Я.Я. Кальф-Калифу входит как один из компонентов. В среднем ИРО колеблется от 50 до 100. При ИРО ниже 50 необходимо проводить длительную детоксикационную терапию, включающую гемосорбцию, энтеросорбцию, у каждого второго больного при такой величине ИРО развиваются различные осложнения, синдром полиорганной недостаточности и может наблюдаться высокая летальность [5]. Величина ЯИ  $0,05-0,1$  свидетельствует об удовлетворительном состоянии больного,  $0,3-1,0$  — о состоянии средней степени тяжести, более  $1,0$  — о тяжелом состоянии.

Для достижения поставленной цели было проведено ретроспективное исследование, в которое включены 260 впервые выявленных социально сохраненных пациентов с инфильтративным туберкулезом легких, закончивших основной курс лечения в противотуберкулезном диспансере в 2012–2014 гг. Больные туберкулезом набирались для исследования в соответствии с критериями включения: впервые в жизни установленный и подтвержденный диагноз инфильтративного туберкулеза легких в соответствии с приказом МЗ РФ № 109 от 21.03.03 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации»; возраст от 18 лет; социально сохраненные пациенты (пациенты, имеющие место работы (официальное или неофициальное), постоянный доход в семье, место жительства, прописку. Критерии исключения: внелегочные или другие формы туберкулеза легких у пациента; наличие тяжелых соматических заболеваний; ВИЧ-инфекция; наличие злокачественных новообразований; психические заболевания; социально дезадаптированные пациенты (лица БОМЖ, неработающие, освободившиеся из мест заключения или находящиеся под следствием, злоупотребляющие алкоголем в форме запоев и принимающие наркотические средства). Все включенные в исследование больные были разделены на две группы: первая (основная) — пациенты с неблагоприятным исходом в количестве 66, вторая (группа сравнения) — пациенты с благоприятным исходом инфильтративного туберкулеза легких, в количестве 194. Критерием неблагоприятного

$$\text{ЛИИК.-К.} = \frac{(4\text{мл.} + 3\text{ю.} + 2\text{п.} + \text{с.}) \times (\text{пп.кл.} + 1)}{(\text{лимф.} + \text{мон.}) \times (\text{э.} + 1)} \quad (1)$$

$$\text{ИСЛК} = \frac{(\text{э.} + \text{б.} + \text{н. (с., п., юн., мл.)})}{(\text{мон.} + \text{лимф.})} \quad (2)$$

$$\text{ИРО} = \frac{\text{л., тыс./л}}{\text{возраст больного} \times \text{ЛИИ}} \quad (3)$$

$$\text{ЯИ} = \frac{\text{мон.} + \text{ю.} + \text{п.}}{\text{с.}} \quad (4)$$

исхода явилось наличие (сохранение) полости распада в легочной ткани на последнем рентгенологическом снимке.

Полученные данные обработаны с помощью программного средства Microsoft Excel (функция «Автофильтр»). Расчеты проведены в программном средстве Statistica 6.0. Для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню какого-либо признака, измеряемого количественно, использовался статистический U-критерий Манна–Уитни. Статистическая значимость результатов выражалась в виде  $p = 0,000$ , результаты считались значимыми при  $p < 0,05$ . Для выявления силы и направления корреляционной связи между двумя варьирующими признаками нами был произведен корреляционный анализ Спирмена в модуле пакета программ Statistica 6.0. Сила корреляционной связи оценивалась следующим образом: при  $r$  от 0 до  $-0,25$  и до  $0,25$  — как слабая; при  $r$  от  $0,26$  до  $0,5$  ( $-0,26$  до  $-0,5$ ) — как умеренная; при  $r$  от  $0,51$  до  $0,75$  ( $-0,51$  до  $-0,75$ ) — как средняя; при  $r$  от  $0,76$  до  $1,0$  ( $-0,76$  до  $-1,0$ ) — как сильная.

## Результаты

При оценке индексов крови у пациентов в изучаемых группах получены следующие данные. ЛИИ на момент начала заболевания более чем у половины пациентов ( $56,1\%$ ) в группе с неблагоприятным исходом был выше  $1,6$  усл. ед., что свидетельствовало о высоком уровне эндогенной интоксикации и активации процессов распада. В группе с благоприятным исходом инфильтративного туберкулеза легких высокие показатели ЛИИ были выявлены только у  $26,8\%$  ( $U = 3763,5$ ;  $p = 0,000$ ), у большинства пациентов ( $41,8\%$ ) этой группы ЛИИ был ниже  $0,62$  усл. ед., в отличие от основной группы ( $21,2\%$ ). При детальной оценке, в основной группе больных с неблагоприятным исходом заболевания выявлено, что легкая степень интоксикации, при ЛИИ  $2,7-3,7$  усл. ед., зарегистрирована у  $15$  ( $22,7\%$ ) пациентов, средняя степень (ЛИИ от  $3,7$  усл. ед.) интоксикации — у  $11$  ( $16,7\%$ ), а тяжелая степень интоксикации (ЛИИ от  $5,8$  усл. ед.) — у  $6$  ( $9,1\%$ ).



При оценке ЛИИ после первого месяца интенсивной терапии в группе больных с неблагоприятным исходом у 43,9% индекс продолжал сохраняться на высоких цифрах (выше 1,6 усл. ед.), что указывало на влияние бактериальных токсинов и продолжающуюся интоксикацию продуктами аутолиза, а в группе сравнения высоким индекс сохранялся у 18,0% ( $U = 5020,0$ ;  $p = 0,008$ ). Эти данные свидетельствуют об отсутствии эффекта от проведенного в течение месяца лечения, о недостаточности дезинтоксикационной терапии или ее отсутствии. Через 2 месяца интенсивной терапии среди социально сохраненных пациентов в обеих группах наблюдались больные с высоким индексом лейкоцитарной интоксикации: в основной группе — 36,4%, в группе сравнения — 25,8% ( $p > 0,05$ ) (табл. 1).

ИСЛК в группе пациентов с последующим неэффективно леченым туберкулезом легких на момент выявления заболевания у 86,4% был выше рекомендуемого (1,96), а в группе сравнения — у 77,8% пациентов ( $U = 3718,5$ ;  $p = 0,000$ ), что свидетельствовало об активном воспалительном процессе и нарушении иммунологической реактивности. Через месяц интенсивной фазы химиотерапии ИСЛК оставался высоким у 57,6% больных в основной группе и у 44,3% в группе сравнения ( $p > 0,05$ ). Однако через 2 месяца вместо предполагаемого снижения на фоне лечения в основной группе ИСЛК выше нормы был выявлен у большего количества больных,

чем в предыдущем месяце. Так, ИСЛК выше 1,96 в основной группе был зарегистрирован в 62,1% случаев, а в группе сравнения — в 37,1% ( $U = 3499,0$ ;  $p = 0,000$ ), что свидетельствует о сохраняющихся нарушениях реактивности.

При оценке на момент начала лечения у пациентов с неблагоприятным исходом в основной группе ИРО был ниже 50 у 68,2%, а в группе сравнения — только у 16,0% больных ( $U = 5092,0$ ;  $p = 0,01$ ), что указывает на возможность развития различных инфекционных осложнений и необходимость проведения длительной дезинтоксикационной терапии. При оценке ИРО через 1 и 2 месяца лечения в сравниваемых группах данные были статистически не достоверны.

Ядерный индекс Даштаянца помогает правильно оценить состояние больного, так как иногда удовлетворительное самочувствие пациента может оказаться мнимым и ошибочным. Так на момент начала лечения в основной группе у пациентов с последующим неблагоприятным исходом инфильтративного туберкулеза легких ЯИ выше 1,0 был зарегистрирован у 17 (25,8%) больных, что свидетельствовало об их тяжелом состоянии, а в группе сравнения таких пациентов было только 10 (5,2%) ( $U = 1953,0$ ;  $p = 0,000$ ). Показатель ЯИ в пределах от 0,3 до 1,0 в основной группе наблюдался у 74,2% больных, а в группе сравнения — у 64,9%, что характерно для пациентов в состоянии средней степени тяжести. Данные ЯИ Даштаянца, характерные для удов-

**ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НЕКОТОРЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ИНДЕКСОВ КРОВИ У ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫХ СОЦИАЛЬНО СОХРАННЫХ ПАЦИЕНТОВ С ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, абс. (%)**

Признак	Параметры	Основная группа (n = 66), абс. (%)	Группа сравнения (n = 194), абс. (%)	U	p
ЛИИ на момент выявления заболевания	Выше 1,6	37 (56,1)	52 (26,8)	3763,5	0,000
	0,62–1,6	15 (22,7)	61 (31,4)		
	Ниже 0,62	14 (21,2)	81 (41,8)		
ЛИИ через 1 месяц химиотерапии	Выше 1,6	29 (43,9)	35 (18,0)	5020,0	0,008
	0,62–1,6	13 (19,7)	81 (41,8)		
	Ниже 0,62	24 (36,4)	78 (40,2)		
ЛИИ через 2 месяца химиотерапии	Выше 1,6	24 (36,4)	50 (25,8)	5862,0	0,3
	0,62–1,6	14 (21,2)	62 (32,0)		
	Ниже 0,62	28 (42,4)	82 (42,3)		
ИСЛК на момент выявления заболевания	Выше 1,96	57 (86,4)	151 (77,8)	3718,5	0,000
	Ниже 1,96	9 (13,6)	43 (22,2)		
ИСЛК через 1 месяц химиотерапии	Выше 1,96	38 (57,6)	86 (44,3)	5633,5	0,14
	Ниже 1,96	28 (42,4)	108 (55,7)		
ИСЛК через 2 месяца химиотерапии	Выше 1,96	41 (62,1)	72 (37,1)	3499,0	0,000
	Ниже 1,96	25 (37,9)	122 (62,9)		
ИРО на момент выявления заболевания	Выше 100	6 (9,1)	125 (64,4)	5092,0	0,01
	50–100	15 (22,7)	38 (19,6)		
	Ниже 50	45 (68,2)	31 (16,0)		
ЯИ Даштаянца на момент выявления заболевания	Выше 1,0	17 (25,8)	10 (5,2)	1953,0	0,000
	0,3–1,0	49 (74,2)	126 (64,9)		
	Ниже 0,05	0	58 (29,9)		

**ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТ ОЦЕНКИ СИЛЫ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА РАЗВИТИЕ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ИСХОДА ИНФИЛЬТРАТИВНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ У СОЦИАЛЬНО СОХРАННЫХ БОЛЬНЫХ С ПОМОЩЬЮ КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА СПИРМЕНА**

Изучаемый фактор	r	p	Характеристика влияния
Высокий уровень ЛИИ на момент выявления заболевания	-0,310	0,000	Умеренная отрицательная
Высокий уровень ЛИИ через 1 месяц лечения	-0,162	0,008	Слабая отрицательная
Высокий уровень ИСЛК на момент выявления заболевания	-0,316	0,000	Умеренная отрицательная
Высокий уровень ИСЛК через 2 месяца лечения	-0,152	0,01	Слабая отрицательная
Низкий уровень ИРО на момент выявления заболевания	0,169	0,006	Слабая положительная
Высокий уровень ЯИ на момент выявления заболевания	-0,524	0,000	Средняя отрицательная

летворительного состояния больных, в группе сравнения отмечены только 29,9%, а в основной группе таких значений индекса вообще не наблюдалось (табл. 1).

Перед назначением комплексной терапии лечащим врачом производилась оценка состояния пациентов. Так, в основной группе тяжелое состояние отмечено у 2 больных, а с учетом ЯИ таких пациентов должно было быть 17. Состояние средней степени тяжести диагностировано у 40, а удовлетворительное — у 24 пациентов, однако при подсчете ЯИ можно утверждать, что в состоянии средней степени тяжести было 49 больных, а в удовлетворительном — вообще не было. При сравнении с представленными выше данными можно утверждать, что оценка тяжести состояния пациентов на момент начала лечения врачом-фтизиатром не соответствовала действительности, что могло послужить причиной неэффективности курса у впервые выявленных больных.

При проведении корреляционного анализа между индексами крови пациентов и развитием неблагоприятного исхода были получены значимые результаты. Наиболее сильное влияние на развитие неблагоприятного исхода инфильтративного туберкулеза легких у социально сохранных пациентов оказывает высокий уровень ЯИ Даштаянца при первичном исследовании крови; умеренное отрицательное влияние ока-

зывают высокие уровни ЛИИ и ИСЛК на момент начала терапии. Слабое положительное влияние на развитие неблагоприятного исхода туберкулеза оказывал низкий уровень ИРО на момент начала лечения, а слабое отрицательное — оказывали высокий уровень ЛИИ после первого месяца лечения и высокий ИСЛК через 2 месяца интенсивного лечения в стационаре (табл. 2).

## Заключение

Перед началом курса лечения всем впервые выявленным больным с инфильтративным туберкулезом легких необходимо проводить комплексную оценку диагностических индексов крови, таких как ЛИИ, ИСЛК, ИРО и ЯИ Даштаянца, являющихся хорошо воспроизводимыми и требующими для их расчета только общего анализа крови. Они позволяют оценить тяжесть течения воспалительного процесса, степень эндогенной интоксикации, уровень реактивности. Выявленные закономерности течения и исхода инфильтративного туберкулеза у впервые выявленных социально сохранных больных позволяют рекомендовать оценку диагностических индексов крови в динамике с целью коррекции проводимой терапии. Доказано, что неправильная оценка тяжести состояния больного ведет к неблагоприятному исходу инфильтративного туберкулеза легких.

## Список литературы/References

1. Баласанянц Г.С. Показатели общего анализа крови как отражение системного иммунитета у больных остро прогрессирующим туберкулезом легких // Медицинская иммунология. 2000. Т. 2, № 2. С. 149. [Balasanyants G.S. Indicators of the general blood test as reflection of system immunity at patients with rapidly advancing tuberculosis of lungs. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, vol. 2, no. 2, p. 149. (In Russ.)]
2. Бородулин Б.Е., Курбатова Е.В., Бородулина Е.А., Поваляева Л.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика впервые выявленного туберкулеза в зависимости от способа выявления // Туберкулез и болезни легких. 2007. Т. 84, № 8. С. 17–19. [Borodulin B.E., Kurbatova E.V., Borodulina E.A., Povalyaeva L.V. Clinical and epidemiological characteristic for the first time the revealed tuberculosis depending on a way of identification. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Diseases of Lungs*, 2007, vol. 84, no. 8, pp. 7–19. (In Russ.)]
3. Кальф-Калиф Я.Я. О лейкоцитарном индексе интоксикации и его практическом значении // Врачебное дело. 1941. № 1. С. 31–35. [Kalf-Kalif Ya.Ya. About a leukocyte index of intoxication and its practical value. *Vrachebnoe delo = Medical Business*, 1941, no. 1, pp. 31–35. (In Russ.)]
4. Кобец Т.В., Некрасов В.Н., Мотрич А.К. Роль лейкоцитарных индексов в оценке адаптационно-компенсаторных возможностей чукотских детей, больных рецидивирующим бронхитом, на этапе санаторно-курортного лечения // Вестник физиотерапии и курортологии. 2003. № 1. С. 47–48. [Kobets T.V., Nekrasov V.N., Motrich A.K. The role of leukocyte indexes in an assessment of adaptation and compensatory opportunities of the Chukchi children sick with recurrent bronchitis, at a stage of sanatorium treatment. *Vestnik fizioterapii i kurortologii = Herald of Physical Therapy and Balneology*, 2003, no. 1, pp. 47–48. (In Russ.)]

5. Корецкая Н.М., Наркевич А.А., Наркевич А.Н. Гендерные особенности впервые выявленного инфильтративного туберкулеза легких // Пульмонология. 2014. № 1. С. 77–80. [Koretskaya N.M., Narkevich A.A., Narkevich A.N. Gender features for the first time the revealed infiltrative tuberculosis of lungs. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2014, no. 1, pp. 77–80. (In Russ.)]
6. Мордык А.В., Батищева Т.Л., Брюханова Т.Л., Пузырева Л.В. Влияние иммунологических нарушений на исход впервые выявленного инфильтративного туберкулеза у социально сохраненных пациентов // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4, № 4. С. 353–358. [Mordyk A.V., Batishcheva T.L., Bryukhanova T.L., Puzyreva L.V. Influence of immunological violations on an outcome for the first time the revealed infiltrative tuberculosis at socially safe patients. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, vol. 4, no. 4, pp. 353–358. doi: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2014-4-353-358> (In Russ.)]
7. Мордык А.В., Цыганкова Е.А., Пузырева Л.В., Турица А.А. Противотуберкулезный иммунитет и механизмы его формирования // Дальневосточный медицинский журнал. 2014. № 1. С. 126–130. [Mordyk A.V., Tsygankova E.A., Puzyreva L.V., Turitsa A.A. Antitubercular immunity and mechanisms of its formation. *Dal'nevostochnyi meditsinskii zhurnal = Far East Medical Journal*, 2014, no. 1, pp. 126–130. (In Russ.)]
8. Мордык А.В., Аксютин Л.П., Пузырева Л.В. Современные международные и национальные концепции борьбы с туберкулезом // Дальневосточный медицинский журнал. 2013. № 22. С. 92–98. [Mordyk A.V., Aksyutina L.P., Puzyreva L.V. Modern international and national concepts of fight against tuberculosis. *Dal'nevostochnyi meditsinskii zhurnal = Far East Medical Journal*, 2013, no. 22, pp. 92–98. (In Russ.)]
9. Мордык А.В., Пузырева Л.В., Подкопаева Т.Г. Социальный статус пациентов противотуберкулезного диспансера и его влияние на отношение к лечению // Социология медицины. 2011. № 2. С. 44–47. [Mordyk A.V., Puzyreva L.V., Podkopaeva T.G. Social status of patients of an antitubercular clinic and its influence on the relation to treatment. *Sotsiologiya meditsiny = Medicine Sociology*, 2011, no. 2, pp. 44–47. (In Russ.)]
10. Навроцкий А.Н., Сафонов А.Д., Горчаков В.В., Привалова М.А., Пранкевич Е.В., Деговцов Е.Н. Случай гастроинтестинального сальмонеллеза, осложненного перитонитом // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2011. Т. 9, № 2. С. 106–109. [Navrotsky A.N., Safonov A.D., Bitterlings V.V., Privalov M.A., Prankevich E.V., Degovtsov E.N. The case of gastrointestinal salmonellosis complicated by peritonitis. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2011, vol. 9, no. 2, pp. 106–109. (In Russ.)]
11. Нечаева О.Б., Кожекина Н.В. Туберкулез у женщин детородного возраста в Свердловской области // Российский медицинский журнал. 2009. № 1. С. 6–9. [Nechayeva O.B., Kozhekin N.V. Tuberculosis in women of childbearing age in Sverdlovsk region. *Rossiiskii meditsinskii zhurnal = The Russian Medical Journal*, 2009, no. 1, pp. 6–9. (In Russ.)]
12. Островский В.К., Машенко А.В., Янголенко Д.В., Макаров С.В. Лейкоцитарный индекс интоксикации и некоторые показатели крови при оценке тяжести течения и определении прогноза воспалительных, гнойных и гнойнодеструктивных заболеваний разных локализаций // Анестезиология и реаниматология. 2005. № 6. С. 25–29. [Ostrovsky V.K., Mashchenko A.V., Yangolenko D.V., Makarov S.V. The leukocyte index of intoxication and some indicators of blood at an assessment of weight of a current and definition of the forecast inflammatory, purulent and the groundstrokes of diseases of different localizations. *Anesteziologiya i reanimatologiya = Anesthesiology and Resuscitation*, 2005, no. 6, pp. 25–29. (In Russ.)]
13. Сперанский И.И., Самойленко Г.Е., Лобачева М.В. Общий анализ крови — все ли его возможности исчерпаны? Интегральные индексы интоксикации как критерии оценки тяжести течения эндогенной интоксикации, ее осложнений и эффективности проводимого лечения // Здоровье Украины. 2009. Т. 19, № 6. С. 51–57. [Speransky I.I., Samoilenko G.E., Lobacheva M.V. The general blood test — whether everything its opportunities are exhausted? Integrated indexes of intoxication as criteria of an assessment of weight of a course of endogenous intoxication, its complications and efficiency of the carried-out treatment. *Zdorov'e Ukrainy = Health of Ukraine*, 2009, vol. 19, no. 6, pp. 51–57. (In Russ.)]
14. Чушкина А.А., Корецкая Н.М. Патоморфоз инфильтративного туберкулеза легких за 20-летний период // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2012. Т. 87, № 5, часть 1. С. 141–144. [Chushkina A.A., Koretskaya N.M. Pathomorphosis of infiltrative tuberculosis of lungs for the 20-year period. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN = Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Russian Academy of Medical Science*, 2012, vol. 87, no. 5, part 1, pp. 141–144. (In Russ.)]
15. Яблчанский Н.И., Пимененко В.Л. Лейкоцитарные индексы клеточной резистентности // Лабораторное дело. 1983. № 1. С. 60–61. [Yabluchansky N.I., Pimenenko V.L. Leukocyte indexes of cellular resistance. *Laboratornoe delo = Laboratory Medicine*, 1983, no. 1, pp. 60–61. (In Russ.)]

**Авторы:**

**Мордык А.В.**, д.м.н., доцент, зав. кафедрой фтизиатрии и физиохирургии ГБОУ ВПО Омская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Омск, Россия;

**Пузырева Л.В.**, к.м.н., ассистент кафедры фтизиатрии и физиохирургии ГБОУ ВПО Омская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Омск, Россия;

**Батищева Т.Л.**, аспирант кафедры фтизиатрии и физиохирургии ГБОУ ВПО Омская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Омск, Россия.

**Authors:**

**Mordyk A.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of Phthisiology and Phthisiosurgery Department, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;

**Puzyreva L.V.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Phthisiology and Phthisiosurgery Department, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;

**Batishcheva T.L.**, PhD Candidate, Phthisiology and Phthisiosurgery Department, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.04.2015  
Отправлена на доработку 07.05.2015  
Принята к печати 06.07.2015

Received 21.04.2015  
Revision received 07.05.2015  
Accepted 06.07.2015

# МИКРОБНЫЙ СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ РОТОГЛОТКИ У БОЛЬНЫХ С ТОНЗИЛЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

О.Ю. Борисова<sup>1,3</sup>, В.А. Алешкин<sup>1</sup>, А.С. Пименова<sup>1</sup>, А.И. Крюков<sup>2</sup>, Н.Л. Кунельская<sup>2</sup>,  
А.В. Гуров<sup>2,3</sup>, Г.Б. Шадрин<sup>2</sup>, А.С. Товмасын<sup>2</sup>, Б.А. Ефимов<sup>3</sup>, Л.И. Кафарская<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

<sup>2</sup>ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского, Москва, Россия

<sup>3</sup>ГОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

**Резюме.** Цель исследования: изучение микробного пейзажа микрофлоры ротоглотки у больных с тонзиллярной патологией. **Материалы и методы.** Обследовано 79 больных из ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского. Из них 78,5% пациентов с различными формами хронического тонзиллита (основная группа) и 21,5% пациентов с патологией полости носа без хронического тонзиллита (контрольная группа). Среди пациентов основной группы с хроническим тонзиллитом, у 60 (96,8%) больных был диагноз хронический тонзиллит, токсико-аллергическая форма I степени (ТАФ I), у 1 (1,6%) больного — хронический тонзиллит, токсико-аллергическая форма II степени (ТАФ II) и у 1 (1,6%) больного — хронический тонзиллит. Видовую идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Видовую идентификацию труднокультивируемых микроорганизмов и коринебактерий проводили масс-спектрометрическим методом с использованием время-пролетного масс-спектрометра BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», Франция). Идентификацию выделенных коринебактерий проводили путем амплификации гена *rpoB* и последующего прямого секвенирования амплифицированных фрагментов. **Результаты.** Большинство (98,7%) выделенных микроорганизмов относилось к 27 видам и были грамположительными. Всего идентифицировано 159 штаммов, принадлежащих к 29 видам микроорганизмов, из них 41,4% штаммов относились к роду *Streptococcus*, 19,7% — к роду *Staphylococcus*, 36,9% — к роду *Corynebacterium*. Среди микроорганизмов рода *Streptococcus* — 55,4% штаммов относились к стрептококкам группы *viridians*, 38,4% штаммов к *S. pyogenes* и по 3,1% штаммов — к *S. pneumoniae* и *S. oralis*. При идентификации штаммов рода *Staphylococcus*, 64,5% штаммов относились к *S. aureus*, 32,2% штаммов к *S. epidermidis* и у одного больного (3,3%) выделен *S. hominis*. Выявлено 18 видов коринебактерий с преобладанием *C. tuberculostearicum* (17,2% штаммов), *C. pseudodiphtheriticum* (15,5% штаммов) и *C. aurimucosum* (18,9% штаммов). У 44,3% обследованных пациентов микробный пейзаж представлен монокультурой и у 55,7% выявлены ассоциации микроорганизмов. **Заключение.** Впервые охарактеризован микробный пейзаж у больных с тонзиллярной патологией с идентификацией 18 видов коринебактерий. При выраженном патологическом процессе в микробиоте ротоглотки наблюдалось превалирование монокультуры, в то время как наличие ассоциаций свидетельствовало о менее выраженном патологическом процессе. Установлена тенденция уменьшения с возрастом разнообразия выделенных микроорганизмов.

**Ключевые слова:** хронический тонзиллит, микрофлора, микробный пейзаж, ротоглотка, MALDI-TOF MS, коринебактерии, стафилококки, стрептококки, кандиды.

## Адрес для переписки:

Борисова Ольга Юрьевна  
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,  
ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии  
им. Г.Н. Габричевского.  
Тел./факс: 8 (499) 747-64-84, 8 (495) 452-18-30;  
8 (916) 147-19-60 (моб.).  
E-mail: olgborisova@mail.ru

## Contacts:

Olga Yu. Borisova  
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,  
G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology.  
Phone/fax: +7 (499) 747-64-84, +7 (495) 452-18-30;  
+7 (916) 147-19-60 (mobile).  
E-mail: olgborisova@mail.ru

## Библиографическое описание:

Борисова О.Ю., Алешкин В.А., Пименова А.С., Крюков А.И.,  
Кунельская Н.Л., Гуров А.В., Шадрин Г.Б., Товмасын А.С., Ефимов Б.А.,  
Кафарская Л.И. Микробный состав микрофлоры ротоглотки у больных  
с тонзиллярной патологией // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3.  
С. 225–232. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-225-232

## Citation:

Borisova O.Yu., Aleshkin V.A., Pimenova A.S., Krukov A.I., Kunelskaya N.L.,  
Gurov A.V., Shadrin G.B., Tovmasyan A.S., Efimov B.A., Kafarskaya L.I.  
Microbial landscape of microflora of a pharynx at patients with tonsillitis  
pathology // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya  
i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 225–232.  
doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-225-232



## MICROBIAL LANDSCAPE OF MICROFLORA OF A PHARYNX AT PATIENTS WITH TONSILLITIS PATHOLOGY

Borisova O.Yu.<sup>a,c</sup>, Aleshkin V.A.<sup>a</sup>, Pimenova A.S.<sup>a</sup>, Krukov A.I.<sup>b</sup>, Kunelskaya N.L.<sup>b</sup>, Gurov A.V.<sup>b,c</sup>, Shadrin G.B.<sup>b</sup>, Tovmasyan A.S.<sup>b</sup>, Efimov B.A.<sup>c</sup>, Kafarskaya L.I.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The microbial landscape of microflora of a pharynx at patients with tonsillitis pathology were studied. *Materials and methods.* 79 patients from GBUZ “Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology” (78.5% patients with various forms of chronic tonsillitis and 21.5% of patients without chronic tonsillitis (control group). Among patients of the main group with chronic tonsillitis, at 60 (96.8%) patients there was a diagnosis chronic tonsillitis a toxic-allergic form of 1 degree (TAF I), at 1 (1.6%) the patient — chronic tonsillitis a toxic-allergic form II of degree (TAF II) and at 1 (1.6%) the patient — chronic tonsillitis. Identification of microorganisms carried out on cultural-morphological and biochemical properties. Specific identification of the hardly cultivated microorganisms and *Corynebacterium* was carried out by MALDI-TOF MS of BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF (“bioMerieux”, France). Identification of the allocated *Corynebacterium* was carried out by amplification of a gene *rpoB* and the subsequent direct sequencing. *Results.* The majority (98.7%) of the allocated microorganisms, treated 27 types and were Gram-positive. It is revealed 159 strains of 29 species of microorganisms, from them 41.4% of strains belonged to the *Streptococcus*, 19.7% — *Staphylococcus*, 36.9% — *Corynebacterium*. Among *Streptococcus* — 55.4% of *S. viridans*, 38.4% — *S. pyogenes* and 3.1% — of *S. pneumoniae* и *S. oralis*; *Staphylococcus* — 64.5% of *S. aureus*, 32.2% of *S. epidermidis* and 3.3% of *S. hominis*. 18 types of *Corynebacterium* — *C. tuberculostearicum* (17.2% strains), *C. pseudodiphtheriticum* (15.5% strains) and *C. aurimucosum* (18.9% strains) are revealed. At 44.3% of the surveyed patients the microflora is presented by a monoculture and at 55.7% associations are revealed. *Conclusion.* The microflora at patients with tonsillitis pathology is characterized. At the expressed pathological process in a microbiota of a pharynx the monoculture while existence of associations testifies to less expressed pathological process prevails.

**Key words:** tonsillitis, microflora, microbiocenosis, pharynx, MALDI-TOF MS, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Candida albicans*.

## Введение

Многочисленные исследования последних десятилетий показали, что состояние разнообразных микробных консорциумов, колонизирующих различные биотопы организма человека, прямо влияет на его здоровье. Последние достижения, связанные с разработкой и внедрением новых методов исследования в микробиологии, включая высокопроизводительное секвенирование и масс-спектрометрию, в частности метод MALDI-TOF MS, значительно увеличили наши диагностические возможности, используемые для анализа параметров, характеризующих микробные ассоциации, включая и их функциональные изменения, влияющие на патологическое состояние и, даже, коррелирующие с тяжестью течения заболеваний. Также показано, что состав резидентной микрофлоры в том или ином биотопе может определять «поведение» других видов микроорганизмов и особенно патогенных [1, 3, 4, 5, 11, 14].

Проблема тонзиллофарингита сохраняет свою актуальность для современной оториноларингологической практики. Количество видов микроорганизмов при хроническом тонзиллите, включая анаэробные, по разным данным колеблется от 100 до 160 [1, 2, 3, 4, 8]. Наибольшее прогностическое значение имеют микроорганизмы рода *Streptococcus* группы А, обладающие β-гемолитической активностью и рассматрива-

ющиеся в качестве важнейшего этиопатогенетического фактора в развитии хронического тонзиллита и его осложнений. Однако ассоциация патологических проявлений при хроническом тонзиллите с выделением данных микроорганизмов не носит видоспецифического характера. Вместе с тем, на сегодняшний день в литературе все чаще появляются данные о различных нарушениях в микроценозах разных биотопов человеческого организма, в частности, слизистых респираторного тракта, и роли состава микрофлоры в этих биотопах, влияющего на развитие патологических процессов [5, 9, 10, 11, 14].

Поэтому целью работы является изучение микробного состава культивируемых микроорганизмов ротоглотки у больных с тонзиллярной патологией.

## Материалы и методы

Всего обследовано 79 больных, госпитализированных в Московский научно-практический Центр оториноларингологии им. Л.И. Свержевского (Москва) в период с сентября 2013 г. по апрель 2014 г. — 38 (48,1%) женщин и 41 (51,9%) мужчины. Возрастной состав обследованных пациентов представлен следующим образом: 15–19 лет — 11 (13,9%) больных, 20–29 лет — 29 (36,7%) больных, 30–39 лет — 26 (32,9%) больных, 40–49 лет — 8 (10,1%) больных, 50–59 лет — 4 (5,1%) больных и 1 (1,3%) больной, принадлежав-

ший возрастной группе 60–69 лет, то есть основная группа обследованных лиц была в возрасте 20–29 и 30–39 лет.

Среди обследованных больных 62 (78,5%) пациента были с различными формами хронического тонзиллита и составили основную группу, и 17 (21,5%) пациентов с патологией полости носа без хронического тонзиллита (контрольная группа). Среди пациентов основной группы с хроническим тонзиллитом у 60 (96,8%) больных был диагноз «хронический тонзиллит, токсико-аллергическая форма I степени (ТАФ I)», у 1 (1,6%) больного — «хронический тонзиллит, токсико-аллергическая форма II степени (ТАФ II)» и у 1 (1,6%) больного — «хронический тонзиллит». Среди пациентов контрольной группы 10 (12,6%) больных имели диагноз «гипертрофический ринит», у 3 (3,7%) больных — «хронический правосторонний (левосторонний) верхнечелюстной синусит», у 1 (1,3%) больного — «фронтит, полисинусит», у 1 (1,3%) больного — «левосторонний хронический гнойный отит», у 1 (1,3%) больного — «кисты верхнечелюстных пазух» и у 1 (1,3%) больного — «полипозный синусит».

Взятие материала из ротоглотки осуществляли с помощью стерильных одноразовых сухих коммерческих тампонов («Sorap», Италия). Доставка материала производилась в термоконтейнерах в течение 2 ч с момента обследования пациентов. Посев патологического материала осуществляли на несколько питательных сред: кровяной агар с добавлением 20% крови крупного рогатого скота, кровяно-теллуритовый агар с добавлением 10% крови крупного рогатого скота (в качестве агаровой основы использовали сухой питательный агар («Микроген», Россия), уриселект («Bio-Rad», США), желточно-солевой агар (на основе солевого агара) и агар Сабуро («HiMedia», Индия). Все посева культивировали по стандартной методике при температуре 37°C в течении 24–48 ч.

Идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Тинкториальные свойства изучали путем окраски по Граму по общепринятой методике, в соответствии с инструкцией производителя. Биохимическую идентификацию выделенных микроорганизмов осуществляли с помощью коммерческих биохимических тест-систем Стафитест-24 («PLIVA-Lachema Diagnostica», Чехия), для дрожжевых грибов Candida-тест («PLIVA-Lachema Diagnostica», Чехия), Pastorex™ strep — сенсibilизированный латекс для дифференциации стрептококков групп А, В, С, D, F, G («Bio-Rad», США), оптохиновый тест, тест с желчью, определение каталазной активности. Гемолитическую активность культур изучали на агаре с добавлением 5% эритроцитов барана.

Видовую идентификацию труднокультивируемых микроорганизмов и коринебактерий

проводили масс-спектрометрическим методом с использованием времяпролетного масс-спектрометра BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», Франция).

Идентификацию выделенных коринебактерий проводили путем амплификации гена *groV* и последующего прямого секвенирования амплифицированных фрагментов согласно [11, 12]. Хромосомальную ДНК выделяли методом кипячения согласно Маниатис Т. (1984 г.) из 72-часовой культуры коринебактерий, выращенной на кровяном агаре. Далее, одну микробиологическую петлю культуры суспендировали в 150 мкл деионизированной воды и инкубировали 20 мин при 95°C, после чего центрифугировали при 12 000 об./мин. Выявление фрагментов гена *groV* осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции, проводимой в соответствии с [12, 13]. Реакционная смесь содержала растворы 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,0 мкМ каждого праймера, по 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата («Fermentas», Литва), и IUTaq-DNA полимеразы («Fermentas», Литва) в окончательном объеме 25 мкл. Амплификацию фрагментов нуклеотидных последовательностей проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Детекцию результатов амплификации осуществляли путем постановки горизонтального электрофореза в 1,8% агарозном геле при 160 В в течение 1 ч с последующим сравнением электрофоретической подвижности специфических светящихся фрагментов амплифицированных продуктов с подвижностью фрагментов маркера молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва). Секвенирование фрагментов ДНК штаммов коринебактерий осуществляли согласно общепринятому методу Сенджера (Sanger F.) с помощью ABI PRISM BigDye Terminator Cycle sequencing ready reaction kit на ABI DNA-секвенаторе («Perkin Elmer Applied Biosystems») в ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России (Москва). Результаты секвенирования обрабатывались с помощью программного обеспечения BLAST и ChromasLite (для формата хроматограммы), секвенированные последовательности сопоставляли с международной online базой данных EMBL/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

## Результаты

При изучении культур, выделенных от пациентов, обнаружено 159 штаммов, принадлежащих к 29 видам микроорганизмов (табл.).

Большинство (98,7%) выделенных микроорганизмов, относящихся к 27 видам, были грамположительной флорой и 2 (1,3%) культуры — грамотрицательной (*Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*). Среди грамположительных микроорганизмов 65 (41,4%) микроорганизмов относились к роду *Streptococcus*, 31 (19,7%) —

к роду *Staphylococcus*, 58 (36,9%) — к роду *Corynebacterium*, в единичном количестве выделены *Candida albicans* (2 штамма (1,3%) и *Actinomyces viscosus* (1 штамм).

При идентификации микроорганизмов рода *Streptococcus* оказалось, что большинство 38 (55,4%) штаммов принадлежали к стрептококкам группы *viridans*, 25 (38,4%) штаммов — к *Streptococcus pyogenes* и по 2 (3,1%) штамма — к *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus oralis*. При идентификации микроорганизмов рода *Staphylococcus* 20 (64,5%) штаммов были *Staphylococcus aureus*, 10 (32,2%) штаммов — *Staphylococcus epidermidis* и у одного больного (3,3%) был выделен *Staphylococcus hominis*.

Наиболее разнообразной в видовом аспекте была группа микроорганизмов рода *Corynebacterium*, представленная 18 видами (табл.). Из них наибольший удельный вес имели *C. tuberculostearicum* (17,2%), *C. pseudodiphtheriticum* (15,5%) и *C. aurimucosum* (18,9%), в меньшем проценте случаев выделены *C. amycolatum* (8,6%), *C. durum* (5,2%), *C. afermentas lipophilum* (5,2%), *C. minutissimum* (6,9%), *C. urealyticum* (3,6%),

**ТАБЛИЦА. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПЕЙЗАЖ ВЫДЕЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

№	Вид микроорганизма	Количество штаммов
1	<i>Streptococcus</i> группы <i>viridians</i>	36
2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	25
4	<i>Streptococcus oralis</i>	2
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
7	<i>Staphylococcus hominis</i>	1
8	<i>Actinomyces viscosus</i>	1
9	<i>Candida albicans</i>	2
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
11	<i>Haemophilus influenza</i>	1
12	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	11
13	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1
14	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	9
15	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	10
16	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	5
17	<i>Corynebacterium xerosis</i>	1
18	<i>Corynebacterium accolens</i>	1
19	<i>Corynebacterium coyleae</i>	1
20	<i>Corynebacterium macifaciens</i>	1
21	<i>Corynebacterium durum</i>	3
22	<i>Corynebacterium simulans</i>	1
23	<i>Corynebacterium afermentas lipophilum</i>	3
24	<i>Corynebacterium maris</i>	1
25	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	4
26	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	2
27	<i>Corynebacterium propinquum</i>	2
28	<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>	1
29	<i>Corynebacterium genitalium</i>	1

*C. propinquum* (3,6%) и в единичных случаях идентифицированы *C. jeikeium* (1,7%), *C. xerosis* (1,7%), *C. accolens* (1,7%), *C. coyleae* (1,7%), *C. macifaciens* (1,7%), *C. simulans* (1,7%), *C. maris* (1,7%), *C. genitalium* (1,7%) и *C. pseudogenitalium* (1,7%).

Анализ микробного пейзажа показал, что 89 (56%) культур были выделены у мужчин и 62 (39%) культуры — у женщин, причем у женщин обнаружена только грамположительная флора, в то время как две грамотрицательные культуры (*P. aeruginosa*, *H. influenzae*) выявлены только у мужчин. Кроме того, в патологическом материале, полученном от мужчин, идентифицировано в 1,8% раз больше видов микроорганизмов, чем от женщин (26 против 14 соответственно). Следует отметить, что у одного мужчины микрофлора была представлена монокультурой — *P. aeruginosa*. Среди выделенных микроорганизмов рода *Streptococcus* штаммы стрептококков группы *viridans* наиболее часто выделяли из материала от женщин, чем от мужчин (в 30,6 и 19,1% случаев соответственно). *S. pyogenes* также идентифицировали чаще из материала от женщин, чем от мужчин (22,6 и 12,3% соответственно). При идентификации микроорганизмов рода *Staphylococcus* обнаружено, что *S. aureus* и *S. epidermidis* выделяли практически в одинаковом проценте случаев как от мужчин, так и от женщин (14,6 и 7,8%; 11,3 и 4,8% соответственно). Обращает на себя внимание тот факт, что микробный пейзаж коринебактерий, выделенных у мужчин, был наиболее разнообразным, представлен 37 штаммами 17 видов коринебактерий с удельным весом в общем микробном пейзаже 41,6% — *C. tuberculostearicum*, *C. jeikeium*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. amycolatum*, *C. xerosis*, *C. accolens*, *C. coyleae*, *C. macifaciens*, *C. durum*, *C. simulans*, *C. afermentas lipophilum*, *C. maris*, *C. minutissimum*, *C. urealyticum*, *C. propinquum*, *C. pseudogenitalium*. В то же время у женщин идентифицировано 17 штаммов коринебактерий 9 видов с удельным весом 27,4% — *C. tuberculostearicum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. amycolatum*, *C. afermentas lipophilum*, *C. genitalium*, *C. minutissimum*, *C. urealyticum*, *C. propinquum*.

Исследование микробного пейзажа выделенных микроорганизмов в зависимости от возраста показало, что наиболее разнообразный спектр микроорганизмов идентифицирован от лиц молодого возраста — 20–29 и 30–39 лет. Так, у лиц 20–29 лет обнаружено 58 штаммов 17 видов и у лиц 30–39 лет — 50 штаммов 13 видов, в то время как у лиц 15–19-летнего возраста идентифицировано 23 штамма 12 видов микроорганизмов. У лиц 40–49, 50–59 и 60–64 лет отмечается постепенное уменьшение разнообразия выделенных микроорганизмов — 12 штаммов 8 видов (лица 40–49 лет), 8 штаммов 6 видов (50–59 лет) и 2 штамма 2 видов (60–69 лет). Следует отметить, что частота встречаемости штаммов стрептококков группы *viridans*, *S. pyogenes* и *S. aureus* была практически одинаковой во всех возрастных группах — 45,4–48,3–



46,1–50%; 36,4–37,9–23,1–12,5% и 36,4–17,24–34,6–25% соответственно у 15–19, 20–29, 30–39 и 40–49 лет. Штаммы *S. epidermidis* не встречались в микрофлоре у лиц старше 40 лет. Наиболее разнообразные изменения произошли в структуре выделенных коринебактерий. Так, у лиц 15–19, 20–29 и 30–39 лет идентифицировано 9 штаммов 8 видов представителей рода *Corynebacterium* (*C. tuberculostearicum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. minutissimum*, *C. urealyticum*, *C. genitalum*, *C. accolens*, *C. pseudogenitalum*), 21 штамм 11 видов (*C. tuberculostearicum*, *C. jeikeium*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. amycolatum*, *C. durum*, *C. simulans*, *C. afermentas lipophilum*, *C. maris*, *C. minutissimum*, *C. propinquum*) и 17 штаммов 7 видов (*C. tuberculostearicum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. urealyticum*, *C. propinquum*) соответственно. Среди штаммов, выделенных от лиц 40–49- и 50–59-летнего возраста, регистрируется низкое разнообразие микробного пейзажа, в котором идентифицированы единичные штаммы следующих видов коринебактерий: *C. aurimucosum*, *C. amycolatum*, *C. accolens* — 40–49 лет и *C. durum*, *C. afermentas lipophilum*, *C. xerosis* — 50–59 лет. Следовательно, можно сказать, что наиболее разнообразный микробный пейзаж идентифицирован у лиц от 20 до 40 лет, в то время как у лиц более старшего возраста отмечается постепенное уменьшение разнообразия в микробиоте ротоглотки, и, в основном, это касается представителей рода *Corynebacterium*.

У 35 (44,3%) обследованных пациентов микробный пейзаж представлен монокультурой, и у 65 (55,7%) пациентов выявлены ассоциации микроорганизмов. Наиболее часто как монокультуру идентифицировали штаммы стрептококков группы *viridians* и *S. pyogenes* — у 31,5 и 37,2% больных, штаммы *S. aureus* и *S. epidermidis* встречались в одинаковом проценте случаев (по 11,4%), штаммы *S. pneumoniae* и *P. aeruginosa* выделены в единичном проценте случаев (5,7 и 2,8% соответственно).

Анализ ассоциаций микроорганизмов показал, что в 20,5% случаев ассоциации представлены штаммами представителей родов *Streptococcus* и *Staphylococcus*: стрептококков группы *viridians*—*S. pyogenes* (4,5%), стрептококков группы *viridians*—*S. aureus* (6,8%), *S. pyogenes*—*S. aureus* (2,3%), стрептококков группы *viridians*—*S. epidermidis* (2,3%), *S. pyogenes*—стрептококков группы *viridians*—*S. aureus* (2,3%). Ассоциация стрептококков группы *viridians*—*H. influenzae* или *C. albicans* встречалась в 2,3 и 4,5% случаев соответственно.

Штаммы коринебактерий идентифицировали в 72,7% случаев и только в ассоциациях микроорганизмов. Из них преобладающими были ассоциации из трех микроорганизмов (29,5%), ассоциации из двух микроорганизмов составили 20,5%, из четырех — 11,4% и множественные ассоциации — 4,5% случаев. Наиболее часто в ассоциаци-

ях встречались штаммы *C. tuberculostearicum* (22,7%), *C. aurimucosum* (18,2%), *C. pseudodiphtheriticum* (11,4%) и *C. amycolatum* (11,4%).

Изучение микробного пейзажа в зависимости от тонзиллярной патологии показало, что в основной группе преобладали монокультуры (в 43,4% случаев), в то время как в контрольной группе наиболее часто встречались ассоциации микроорганизмов (до 56,6%). Следует отметить, что в 20,5% монокультура представлена микроорганизмами родов *Streptococcus* и *Staphylococcus*. Из них штаммы *S. pyogenes* идентифицированы в 41,2% случаев, стрептококков группы *viridians* — в 35,3%, *S. aureus* — в 8,8%, *S. epidermidis* — в 5,9%, *S. pneumoniae* — в 5,9% случаев и *P. aeruginosa* — в 2,9% случаев.

При идентификации ассоциаций преобладали комплексы из двух и трех видов микроорганизмов (по 42,3%). Ассоциации из четырех микроорганизмов составили 11,5% и множественные (пять) — 3,9% случаев. Обращает внимание, что в ассоциациях их двух микроорганизмов преобладали (в 57,1% случаев) комплексы стрептококков группы *viridians* в сочетании с *S. aureus*. В ассоциациях, состоящих из трех видов микроорганизмов, также преобладающими (55,6%) были комплексы стрептококков группы *viridians*—*C. tuberculostearicum* в сочетании с другими штаммами (*S. aureus*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. afermentas lipophilum* и *C. minutissimum*). В ассоциациях, состоящих из четырех видов микроорганизмов, идентифицированы комплексы стрептококков группы *viridians*—*S. aureus* в сочетании с *C. tuberculostearicum*—*C. amycolatum* или *S. pyogenes*—*C. aurimucosum*, а также *S. pyogenes*—*C. aurimucosum*—*C. amycolatum*—*C. simulans*. При множественных ассоциациях выделены сочетания представителей стрептококков, стафилококков и коринебактерий: стрептококков группы *viridians*—*S. aureus*—*C. pseudodiphtheriticum*—*C. amycolatum*—*C. propinquum*.

Интересным оказалось то, что микробный пейзаж микробиоты в контрольной группе (с патологией полости носа без хронического тонзиллита) был в большинстве случаев представлен ассоциациями микроорганизмов (63,2% случаев), состоящими из двух (41,6%), трех (33,3%), четырех (16,7%) или семи (5,2%) микроорганизмов, в то время как монокультура идентифицирована в 36,8% случаев и представлена штаммами *S. aureus*, стрептококков группы *viridians* или *S. epidermidis*.

## Обсуждение

Многочисленными работами было показано, что основным этиопатогенетическим фактором, имеющим наибольшее прогностическое значение в развитии хронического тонзиллита и его осложнений, являются микроорганизмы — представители рода *Streptococcus* группы А, об-



ладающие β-гемолитической активностью [1, 2, 3, 4, 8]. По данным исследований, проведенных в прошлые годы, было показано, что эти микроорганизмы идентифицировали у 15,3% больных с токсико-аллергической формой (ТАФ) хронического тонзиллита I степени и у 15,8% больных с ТАФ хронического тонзиллита II степени [1, 2, 3, 4]. Однако ассоциация хронического тонзиллита с наличием данных микроорганизмов не носит видоспецифического характера. Попытки установления связи между течением хронического тонзиллита и фенотипическими характеристиками соответствующего штамма β-гемолитического стрептококка остаются безуспешными: ни антигенная структура, ни способность к продукции суперантигенов и пирогенных токсинов не демонстрируют корреляции с клиническими проявлениями хронического тонзиллита. Также появился ряд исследований, посвященных роли анаэробных микроорганизмов при тонзиллярной патологии и ангинах [11]. Так, из биоптатов миндалин выделено до 12 представителей различных родов анаэробных бактерий, причем независимо от возраста и состояния здоровья обследуемых, и показано, что ангина — это полимикробная инфекция, в основе которой лежит взаимодействие в консорциумах различных видов микроорганизмов, играющих этиологическую роль. Кроме того, в литературе появились данные о возможной роли резидентной микрофлоры, колонизирующей биотоп слизистых миндалин, в развитии тонзиллярной патологии [5, 7, 9, 10, 14, 15]. Показано, что поверхность слизистых оболочек представлена целыми консорциумами из микроорганизмов, находящихся в постоянном динамическом взаимодействии, сдвиг равновесия в которых приводит к развитию патологического процесса. Поэтому целью настоящей работы явилась характеристика микробного пейзажа микроорганизмов при тонзиллярной патологии.

Нами обнаружено, что у 55,7% пациентов на поверхности слизистых миндалин выявлены ассоциации микроорганизмов. Выделено 159 штаммов, принадлежащих к 29 видам микроорганизмов, большинство (98,7%) из которых относились к 27 видам грамположительной флоры: 41,4% микроорганизмов — к роду *Streptococcus*, 19,7% — к роду *Staphylococcus* и 36,9% — к роду *Corynebacterium*, что свидетельствует в пользу гипотезы о наличии достаточно разнообразного консорциума микроорганизмов, колонизирующих поверхность слизистых миндалин [1, 4, 5, 11, 14]. Кроме того, установлено, что наиболее разнообразный спектр микроорганизмов идентифицирован от лиц молодого возраста — 20–29 и 30–39 лет, а с возрастом отмечается уменьшение разнообразия микробиома слизистых миндалин.

Изучение микробного пейзажа в зависимости от тонзиллярной патологии показало, что в основной группе в 43,4% случаев превалиро-

вали монокультуры, которые в 20,5% представлены микроорганизмами родов *Streptococcus* и *Staphylococcus*, в то время как в контрольной группе (без патологии) наиболее часто (до 56,6%) встречались ассоциации микроорганизмов. Такие результаты подтверждают предположение зарубежных коллег [5, 11, 14] о том, что при увеличении разнообразия в микробиоме у пациентов отмечается менее выраженная патология, в то время как при истощении разнообразия сообщества значительно увеличивается количество одного микроорганизма и усиливалась тяжесть патологического процесса. Кроме того, нами в монокультуре при тонзиллярной патологии идентифицированы штаммы *S. pyogenes* в 41,2% случаев и стрептококков группы *viridians* — в 35,3%, что, по сравнению с предыдущими исследованиями [2, 3, 4], свидетельствует об увеличении выделения данных микроорганизмов при этой патологии.

Интересным результатом работы явилось выделение значительного количества микроорганизмов рода *Corynebacterium*, которые составили 36,9% от общего числа микроорганизмов. Род *Corynebacterium* в настоящее время насчитывает 101 опубликованный вид, большинство из которых описаны недавно. Из них более 50% видов выделены от человека, остальные — от животных, птиц, окружающей среды и т.д. [6]. Идентификация микроорганизмов рода *Corynebacterium* с помощью классических микробиологических методов исследования имеет целый ряд трудностей, обусловленных тем, что большинство видов обладают сходной метаболической активностью и, следовательно, имеют одинаковую фенотипическую характеристику [7, 10, 12]. Некоторые коринебактерии метаболически инертные и являются медленно-растущими, что также затрудняет их идентификацию по морфологическим, тинкториальным, культурально-биохимическим свойствам или не позволяет правильно идентифицировать эти микроорганизмы. Использование коммерческой биохимической тест-системы API-Coryne («bioMérieux», Франция) дает возможность идентифицировать не более 30% микроорганизмов этого рода, что также связано с их сходной метаболической активностью и невозможностью расширить панельный ряд. Применение масс-спектрометрического метода позволяет идентифицировать коринебактерии с высокой долей достоверности [7, 10]. Однако не всегда можно получить высокий score или возможны ошибки, например, при идентификации *C. pseudodiphtheriticum* и *C. propinquum*, а также других видов. Кроме того, существующая база данных масс-спектрометрических профилей представлена иногда единичными профилями, а для увеличения достоверности идентификации необходима предварительная обработка образцов. В настоящее время золотым стандартом иденти-

фикации является секвенирование фрагментов 16S rRNA или гена *rpoB* [7, 12, 13, 14, 15]. Нами с помощью комплекса классических микробиологических, масс-спектрометрических методов исследования и секвенирования из клинического материала от пациентов с тонзиллярной патологией и без нее было идентифицировано 18 видов коринебактерий. Причем в большинстве случаев (72,7%) данные микроорганизмы были выделены только в ассоциациях с превалированием 3–4-компонентных сообществ. Наибольшее разнообразие выделенных коринебактерий также отмечалось в возрасте от 20 до 40 лет, в то время как у лиц более старшего возраста отмечается постепенное уменьшение разнообразия этих микроорганизмов в микробиоте ротоглотки.

Ранее считалось, что недифтерийные коринебактерии являются одними из представителей нормофлоры человеческого организма и выделяются из различных биотопов — кожа, слизистые респираторного и урогенитального тракта. Однако, в последнее десятилетие увеличивается число работ, посвященных выделению коринебактерий при различных инфекционных состояниях как верхних, так и нижних дыхательных путей [5, 7, 9, 10, 14]. Так, по некоторым данным [9, 14], количество выделенных из клинического материала коринебактерий при патологических состояниях верхних дыхательных путей достигает 72%, а при инфекциях нижних дыхательных путей, в частности, пневмониях, бронхитах и бронхоэктазах — до 55% случаев. Кроме того, коринебактерии выделяются из различных биотопов при таких патологических состояниях как эндокардит, бактериемии, кожные и урогенитальные инфекции. Также обращает внимание тот факт, что при иммунодефицитных состояниях и отягощенном преморбидном фоне количество выделенных коринебактерий увеличивается [9]. В связи с этим в последние годы

широко обсуждается вопрос о патогенетической значимости этих микроорганизмов.

В проведенном исследовании из выделенных коринебактерий наибольший удельный вес имели *C. tuberculostearicum* (17,2%), *C. pseudodiphtheriticum* (15,5%) и *C. aurimucosum* (18,9%). Данные микроорганизмы также наиболее часто встречались и в ассоциациях — *C. tuberculostearicum* (22,7%), *C. aurimucosum* (18,2%), *C. pseudodiphtheriticum* (11,4%). По данным литературы [7, 9, 14], *C. pseudodiphtheriticum* в настоящее время рассматривается не только как представитель нормофлоры, но и как возбудитель инфекций респираторного тракта, так как выделяется при фарингитах, пневмониях, бактериемиях, легочных абсцессах, трахеитах, трахеобронхитах и риносинуситах. Вид *C. tuberculostearicum* впервые был выделен и описан только в 2004 г., и к настоящему времени данный микроорганизм выделен при риносинуситах, маститах, остеомиелитах, из гнойных хирургических ран и образцов мочи [10, 14]. Поэтому полученные данные о выделении этих микроорганизмов и при тонзиллярной патологии расширяет наше представление об их патогенетической значимости.

## Выводы

Проведенные исследования впервые позволили охарактеризовать микробный пейзаж у больных с тонзиллярной патологией с молекулярно-генетической идентификацией 18 видов выделенных коринебактерий; показано, что состояние ротоглотки прямо зависит от состава микробиоты; при выраженном патологическом процессе в микробиоте ротоглотки превалирует монокультура, в то время как наличие ассоциаций, обусловленных разнообразным микробным пейзажем, свидетельствует о менее выраженном патологическом процессе; установлена тенденция уменьшения с возрастом разнообразия выделенных микроорганизмов.

## Список литературы/References

1. Боровский Е.В., Леонтьев В.К. Биология полости рта. М.: Медицина, 1991. 301 с. [Borovskii E.V., Leontiev V.K. *Biologiya polosti rta* [Biology of oral cavity]. Moscow: Medicine, 1991, 301 p.]
2. Крюков А.И., Шостак Н.А., Туровский А.Б., Жуховицкий В.Г., Елисеев О.В. Анализ эффективности консервативного лечения простой формы хронического тонзиллита // Вестник оториноларингологии. 2005. № 3. С. 50–51. [Krukov A.I., Shostak N.A., Turovskii A.B., Zuchovizkii V.G., Eliseev O.V. Analysis of efficiency of conservative treatment of a simple form of chronic tonsillitis. *Vestnik otorinolaringologii = Herald of Otorhinolaryngology*, 2005, no. 3, pp. 50–51. (In Russ.)]
3. Крюков А.И., Сухина М.А., Жуховицкий В.Г. Роль микрофлоры в этиологии хронического тонзиллита // Вестник оториноларингологии. 2010. № 3. С. 4–6. [Krukov A.I., Suchinina M.A., Zuchovizkii V.G. Role of microflora in an etiology of chronic tonsillitis. *Vestnik otorinolaringologii = Herald of Otorhinolaryngology*, 2010, no. 3, pp. 4–6. (In Russ.)]
4. Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Туровский А.Б. Стрептококковые заболевания глотки // Русский медицинский журнал. 2006. Т. 14, № 27. С. 1972–1973. [Krukov A.I., Kunelskai N.L., Turovskii A.B. Streptococcal diseases of a throat. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2006, vol. 14, no. 27, pp. 1972–1973. (In Russ.)]
5. Abreu N.A., Nagalingam N.A., Song Y., Roediger F.C., Pletcher S.D., Goldberg A.N., Lynch S.V. Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculostearicum* enrichment mediates rhinosinusitis. *Science Transl. Medicine*, 2012, vol. 4, no. 151, pp. 151ra124. doi: 10.1126/scitranslmed.3003783
6. Alatoon A., Cazanave C.J., Cunningham S.C., Ihde S.M., Patel R. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 1, pp. 160–163. doi: 10.1128/JCM.05889-11

7. Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 10, pp. 3152–3158. doi: 10.1128/JCM.00796-12
8. Brook I. Failure of penicillin to eradicate group A beta-hemolytic streptococci tonsillitis: causes and management. *J. Otolaryngology*, 2001, vol. 30, pp. 324–329.
9. Diez-Aguilar M., Ruiz-Garbajosa P., Fernandez-Olmos A., Guisado P., Del Campo R., Quereda C., Cantón R., Meseguer M.A. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Disease*, 2012, vol. 32, no. 6, pp. 769–772. doi: 10.1007/s10096-012-1805-5
10. Hinic V., Lang C., Weisser M., Strauba C., Freia R., Goldenbergera D. *Corynebacterium tuberculostearicum*: a potentially misidentified and multiresistant *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 8, pp. 2561–2567. doi: 10.1128/JCM.00386-12
11. Jensen A., Fagö-Olsen H., Sørensen C.H., Kilian M. Molecular mapping to species level of the tonsillar crypt microbiota associated with health and recurrent tonsillitis. *PLOS One*, 2013, vol. 8, no. 2, pp. e56418. doi: 10.1371/journal.pone.0056418
12. Khamis A., Raoult D., La Scola B. Comparison between rpoB and 16SrRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 4, pp. 1934–1936. doi: 10.1128/JCM.43.4.1934-1936.2005
13. Khamis A., Raoult D., La Scola B. rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 9, pp. 3925–3931. doi: 10.1128/JCM.42.9.3925-3931.2004
14. Nhan T.X., Parienti J.J., Badiou G., Leclercq R., Cattoir V. Microbiological investigation and clinical significance of *Corynebacterium* spp. In respiratory specimens. *Diagn. Microbiol. and Infect. Disease*, 2012, vol. 74, pp. 236–241. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.07.001
15. Pascual C., Lawson P.A., Farrow J.A., Gimenez M.N., Collins M.D. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16SrRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, vol. 45, no. 4, pp. 724–728. doi: 10.1099/00207113-45-4-724

**Авторы:**

**Борисова О.Ю.**, д.м.н., руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ГОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

**Алешкин В.А.**, д.б.н., профессор, директор ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Пименова А.С.**, младший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Крюков А.И.**, д.м.н., профессор, директор ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского, Москва, Россия;

**Кунельская Н.Л.**, д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского, Москва, Россия;

**Гуров А.В.**, д.м.н., профессор кафедры оториноларингологии лечебного факультета, профессор кафедры микробиологии и вирусологии педиатрического факультета ГОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

**Шадрин Г.Б.**, к.м.н., зав. консультативно-диагностическим отделением, старший научный сотрудник ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского, Москва, Россия;

**Товмасын А.С.**, к.м.н., старший научный сотрудник ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского, Москва, Россия;

**Ефимов Б.А.**, д.м.н., профессор, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ГОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

**Кафарская Л.И.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии ГОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия.

**Authors:**

**Borisova O.Yu.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Diagnostics of Diphtheria and Pertussis Infections of G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Professor of Department of Microbiology and Virology of Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

**Aleshkin V.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Pimenova A.S.**, Junior Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections of G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Krukov A.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology, Moscow, Russian Federation;

**Kunelskaya N.L.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Scientific Work of Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology, Moscow, Russian Federation;

**Gurov A.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor of Department of Otorhinolaryngology, Professor of Department of Microbiology and Virology of Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

**Shadrin G.B.**, PhD (Medicine), Head of Department of Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology, Moscow, Russian Federation;

**Tovmasyan A.S.**, PhD (Medicine), Leader Scientist of Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology, Moscow, Russian Federation;

**Efimov B.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of Department of Microbiology and Virology of Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

**Kafarskaya L.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of Microbiology and Virology of Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation.

# НЕФРИТОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ГЕНОТИПОВ *emm1* и *emm12*, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ИСТОЧНИКУ ВЫДЕЛЕНИЯ

Л.А. Бурова<sup>1</sup>, П.В. Пигаревский<sup>1</sup>, В.А. Снегова<sup>1</sup>, Е.В. Кулешевич<sup>1</sup>, Д.А. Жарков<sup>2</sup>,  
К. Шален<sup>3</sup>, Артем А. Тотолян<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Лундский Университет, Лунд, Швеция

**Резюме.** В статье рассматривается нефритогенная активность штаммов *Streptococcus pyogenes* генотипов *emm1* и *emm12*, различающихся по Fc-рецепции нативного IgG и иммунных комплексов (IC) и выделенных от детей, больных скарлатиной и здоровых носителей. Все штаммы типа *emm1* связывали нативный IgG, между тем как IC взаимодействовали только со штаммами от больных и не связывались штаммами от носителей. Наоборот, все штаммы типа *emm12* оказались негативными в отношении нативного IgG, а IC связывались исключительно штаммами от больных. Ни один из испытанных штаммов не связывал IgG3. Связывание обеих форм IgG сопровождалось накоплением анти-IgG антител, формированием IC, «серповидной» депозицией IgG в почечной ткани, отложением C3-комплемента, продукцией провоспалительного цитокина TNF $\alpha$ , а также аккумуляцией лимфоцитов в корковом и мозговом слоях ткани. Перечисленные признаки являются по существу проявлениями развивающегося иммунного воспаления, ведущего к моделированию мембранозно-пролиферативного гломерулонефрита (PSGN). По имеющимся данным, в его основе лежат: связывание иммунных комплексов тканевыми Fc $\gamma$ R, активация комплемента, провоспалительная активность цитокинов и лимфоцитарная инфильтрация ткани. По данным морфометрической оценки, нефритогенная активность штаммов генотипа *emm12* превышала таковую штаммов генотипа *emm1*. При испытании трех IC-связывающих штаммов *emm12* на шести кроликах, выраженный PSGN имел место у 5-ти, а abortивный процесс — лишь у одного животного. В случае же испытания пяти IgG-связывающих штаммов типа *emm1* на десяти кроликах выраженный PSGN наблюдался всего у 3-х, abortивный — у 5-ти и негативный результат — у 2-х животных. Изменения не происходили при испытании «носительских» штаммов обоих генотипов, неспособных связывать IC, что, согласно литературе, может быть связано с мутацией в гене Mga-регулятора и, соответственно, нарушениями в синтезе M-белков. Поэтому выделение IC-связывающих штаммов типа *emm12* при острой стрептококковой инфекции должно рассматриваться в качестве высокого фактора риска развития постинфекционного осложнения — PSGN. Используемая в работе модель PSGN позволяет вскрыть основные этапы и черты его патогенеза.

**Ключевые слова:** постинфекционный гломерулонефрит, *Streptococcus pyogenes*, Fc-рецепция, IgG, иммунные комплексы.

## Адрес для переписки:

Тотолян Артем Акович  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,  
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.  
Тел.: 8 (812) 234-68-74.  
E-mail: totolyan@hotmail.com

## Contacts:

Artem A. Totolian  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika  
Pavlova str., 12, FSBSI Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (812) 234-68-74.  
E-mail: totolyan@hotmail.com

## Библиографическое описание:

Бурова Л.А., Пигаревский П.В., Снегова В.А., Кулешевич Е.В.,  
Жарков Д.А., Шален К., Тотолян Артем А. Нефритогенная активность  
*Streptococcus pyogenes* генотипов *emm1* и *emm12*, различающихся  
по источнику выделения // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3.  
С. 233–242. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-233-242

## Citation:

Burova L.A., Pigarevsky P.V., Snegova V.A., Kuleshevich E.V., Zharkov D.A.,  
Schalen C., Totolian Artem A. Nephritogenic activity of *Streptococcus*  
*pyogenes emm1* and *emm12* genotypes isolated from patients and  
asymptomatic carriers // Russian Journal of Infection and Immunity =  
Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 233–242.  
doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-233-242

Исследования были поддержаны грантами РФФИ: 07-04-00472 и 14-04-00390.



## NEPHRITOGENIC ACTIVITY OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* *emm1* AND *emm12* GENOTYPES ISOLATED FROM PATIENTS AND ASYMPTOMATIC CARRIERS

Burova L.A.<sup>a</sup>, Pigarevsky P.V.<sup>a</sup>, Snegova V.A.<sup>a</sup>, Kuleshevich E.V.<sup>a</sup>, Zharkov D.A.<sup>b</sup>, Schalen C.<sup>c</sup>, Totolian Artem A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup> Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup> Lund University, Lund, Sweden

**Abstract.** In this paper the nephritogenic activity of *Streptococcus pyogenes* genotype *emm1* and *emm12* clinical isolates from scarlet fever patients and healthy children was considered. As earlier established, strains of these types differ in Fc-binding profile, interacting with native IgG and immune complexes (IC), respectively. As expected, all the type *emm1* strains bound native IgG; besides, ICs interacted only with strains from patients but not with those from carriers. In contrast, all type *emm12* strains appeared to be negative for native IgG, whereas ICs were bound by strains from patients exclusively. None of the tested strains bound IgG3. By immunization of rabbits, binding of native IgG as well as ICs was associated with increasing of anti-IgG antibodies titer, formation of ICs, «crescent» deposition of IgG and C3-complement, local production of the proinflammatory cytokine TNF $\alpha$ , and also with accumulation of lymphocytes in kidney tissue. These signs indicated immune inflammation, leading to experimental membrane-proliferative glomerulonephritis (PSGN). It is known that PSGN development depends on IC-binding by tissue Fc $\gamma$ R, on complement activation as well as on tissue infiltration by macrophages/monocytes. According to the data of morphometric evaluation the nephritogenic activity of the type *emm12* strains exceeded those of type *emm1*. On testing of three IC-binding *emm12* strains in six rabbits, typical PSGN developed in 5 of them and an abortive process in 1 animal. In case of five IgG-binding type *emm1* strains, out of ten rabbits full-blown PSGN was observed only in 3 of them, but abortive changes in 5 and negative result in 2 animals. No pathologic changes were elicited by the «carrier» strains of either genotype; the inability of these to bind ICs, according to literature data, could be explained by mutation in the Mga-regulator gene thereby impeding M-proteins synthesis. We conclude that isolation of type *emm12* IC-binding strains at acute streptococcal infection should be considered a high risk-factor for postinfectious sequelae development. The rabbit model of PSGN used in this research thus allowed to reveal some main stages and features of its pathogenesis.

**Key words:** postinfectious glomerulonephritis, *Streptococcus pyogenes*, Fc-reception, IgG, immune complexes.

## Введение

Способность патогенных *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А или СГА) осложнять острую форму инфекции развитием постинфекционного гломерулонефрита (PSGN) описана давно. Настоящая работа является звеном в масштабных исследованиях по взаимосвязи между нефритогенностью СГА и их способностью связывать иммуноглобулин класса G (IgG) через его Fc-фрагмент. Ранее в них было показано, что штаммы СГА некоторых М-серотипов или *emm*-генотипов, а также их Fc-связывающие белки (Fc-рецепторы), взаимодействуют с IgG крови, вызывая в эксперименте на животных каскад взаимообусловленных реакций, приводящих к иммунному воспалению в ткани почек. Они проявляются в синтезе анти-IgG антител, в формировании иммунных комплексов (IC), связывающих C3-компонент комплемента, их депозиции в почечных гломерулах, а также в продукции провоспалительных цитокинов и лимфоцитарной инфильтрации ткани. Иммунное воспаление сопровождается образованием очагов дегенерации и деструкции ткани, что в результате приводит к развитию мембранозно-пролиферативного PSGN [1, 2].

В современной научной литературе нередко приходится сталкиваться с разделением СГА на «нефритогенные» и «ревматогенные» М-серотипы в зависимости от источника и частоты их выделения при той или иной форме инфекционной патологии. Это разграничение весьма условно, так как оно не учитывает наличия у штаммов факторов патогенетической направленности.

Совокупность ранее полученных сведений позволила сформулировать задачу настоящей работы. Следовало оценить нефритогенность разных *emm*-генотипов СГА и выяснить, каким образом различия в их Fc-рецепторной активности проявляются в возможности моделировать PSGN у лабораторных животных. Для этого из коллекции штаммов, выделенных за 2006–2009 гг. от больных скарлатиной детей и от здоровых детей-носителей, отобрали эпидемиологически независимые штаммы типов *emm1* и *emm12*, обозначив их как «скарлатинозные» и «носительские». Указанные *emm*-генотипы чаще относят к «ревматогенным» (тип *emm1*) и к «нефритогенным» (тип *emm12*). Кроме того, они различаются по характеру Fc-связывания как нативного IgG, так и IgG в составе IC.

## Материалы и методы

**Бактериальные штаммы.** В работе использованы референс-штаммы СГА: М1/40/58 и М12/1800 (позитивный контроль на нефритогенность), а также Т27 (отрицательный контроль на нефритогенность); все они получены из референс-лаборатории ВОЗ, Прага, Чехия. Для испытания отобрали по три эпидемиологически независимых штамма генотипов *emm1* (346, 154, 67) и *emm12* (94, 113, 118) от больных скарлатиной, а также по два штамма от здоровых носителей тех же *emm*-типов (соответственно, 17 и 124; 139 и 171).

**Связывание нативного IgG, IgG3 и иммунных комплексов ПАП (пероксидаза хрена × IgG из антипероксидазной иммунной сыворотки) и иммунных комплексов ТАТ (столбнячный анатоксин × IgG из антитоксической иммунной сыворотки).** Для выявления рецепторной активности СГА в dot-blot тесте использовали супернатанты культур, трижды (по 30 с) дезинтегрированных при 22 кГц и 0,6–0,8 мА в УЗ-дезинтеграторе MSE (UK). Супернатанты стерилизовали через миллиметровые фильтры с размером пор 0,45 микрон. ПАП комплексы готовили, смешивая эквивалентные (по молекулярной массе) количества IgG с антипероксидазной активностью (4 мг/мл) и пероксидазы (1 мг/мл) в соотношении Ат-Аг 2:3. Смесь инкубировали при 4°C в течение 18–20 ч. ТАТ иммунные комплексы, содержащие столбнячный анатоксин (SBL Vaccine) и антистолбнячный IgG (Tetagam, Behringwerke), маркировали 125I, смешивали в соотношении Ат-Аг 1:1. Связывание ТАТ комплексов определяли радиоиммунологически (RIA) по ранее описанной методике [4].

Dot-blot-тест ставили на нитроцеллюлозной мембране, используя двукратные разведения супернатанта УЗ-дезинтеграта микробных клеток. Блокатором служило обезжиренное молоко (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad), в качестве проявляющего субстрата использовали ТМВ (3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine, Sigma). IgG человека (Sigma) и IgG3 (предоставлен д-ром А. Grubb, Отдел биохимии Лундского Университета, Швеция) конъюгировали с пероксидазой из корня хрена (Sigma) перйодатным методом.

**Экспериментальный гломерулонефрит.** Моделирование постинфекционного гломерулонефрита выполняли на основании разрешения на работу с животными (Animal Welfare Assurance#A5243-01). Нефритогенность СГА штаммов тестировали на кроличьей модели PSGN, описанной нами ранее [4]. Кратко, ее схема заключается в следующем: микробные клетки, выращенные в бульоне Todd-Hewitt, убивали нагреванием при 60°C в течение 1,5 ч, обрабатывали раствором KSCN для удаления

связанных иммуноглобулинов и 6 раз отмывали в PBS [2]. Кроликам взвесив бактерий (10<sup>9</sup>/мл КФЕ) вводили внутривенно 3 раза в неделю в течение 6-ти недель. Каждый тестируемый штамм испытывали минимум на двух кроликах. Через неделю после последней инъекции, почки животных подвергали иммуноморфологическому и гистологическому исследованию.

**Определение анти-IgG антител в сыворотках кроликов.** Титры анти-IgG определяли в реакции непрямой гемагглютинации, описанной ранее [2]. **Имуноморфологическое изучение почечной ткани.** Почечная ткань каждого кролика подвергалась иммуногистохимическому исследованию в сочетании с технологией морфометрии для количественной оценки полученных данных.

Для выявления депозиции IgG в ткани использовали козы антисыворотки против кроличьего IgG. В качестве вторых антител применяли кроличьи антикозляные антитела, меченные пероксидазой корня хрена (Southern Biotechnology Associates, США).

Депозицию С3-компонента комплемента определяли с помощью кроличьей сыворотки против С3 компонента комплемента человека (Dako, Дания), перекрестно-реагирующего с С3 комплемента кролика. В качестве вторых антител использовали козы антитела против кроличьего IgG, меченные пероксидазой корня хрена (Sigma, США).

Продукцию цитокина TNF $\alpha$  выявляли козьей антисывороткой против кроличьего TNF $\alpha$  (AMS Biotechnology, США) с последующей обработкой срезов кроличьими антикозляными антителами, меченными пероксидазой.

Первоначально микроскопию тканевых образцов после их окрашивания гематоксилин-эозином производили при малых и средних увеличениях (x100–x600) для оценки тканевых изменений в различных полях зрения. Затем иммуноокрашенные образцы исследовали при большем увеличении (x900–x1100) с целью выявления депозиции IgG и С3, а также экспрессии TNF $\alpha$ .

**Морфометрическая оценка изменений в почечной ткани** производилась следующим образом: в корковом веществе в 10-ти произвольно выбранных полях зрения при увеличении x700 отдельно подсчитывали среднее количество нормальных и поврежденных гломерул. Для определения области поврежденных проксимальных канальцев в корковом веществе и дистальных канальцев в мозговом слое использовали стандартную морфометрическую сетку (квадрат, содержащий 256 малых квадратов), накладываемую на образец ткани. Пропорция малых квадратов с деструктивно-дегенеративными изменениями в одном поле зрения

оценивалась как степень тканевой альтерации. Подобный подход применяли и для оценки клеточной инфильтрации как в корковом, так и в мозговом слоях почек. Полученные результаты подвергали статистической обработке [5].

## Результаты и обсуждение

Способность отобранных штаммов генотипов *emm1* и *emm12* связывать нативный IgG или IC, а также вызывать иммунное воспаление и PSGN, изучалась в двух сериях экспериментов. В первой тестировали активность штаммов *emm1*, а во второй — *emm12*.

### Изучение штаммов *emm1*

Взаимодействие СГА с различными формами IgG проверяли в dot-blot тесте, результаты которого приведены в таблице 1. Все штаммы типа *emm1* связывали нативный IgG. Наиболее активным был штамм M1/40/58, являющийся положительным контролем на нефритогенность. Активность как «скарлатинозных», так и «носительских» штаммов варьировала в весьма узких пределах разведений супернатанта УЗ-дезинтеграта — большая была у штамма *emm1/346*, а меньшая — у штамма *emm1/17*. Способность связывать IC была либо такой же, либо на «шаг» менее выраженной. Исключение составляли штаммы *emm1/17* и *emm1/124*, выделенные от носителей. Они оказались полностью негативным по рецепции IC, хотя и связывали нативный IgG.

Ни один из использованных в данной работе штаммов генотипа *emm1* не связывал IgG3 при испытании в dot-blot тесте. То, что штаммы *emm1* связывают нативный IgG и не связывают подкласс IgG3, по-видимому, свидетельствуют в пользу предположения о том, что в связывании нативного IgG преимущественно участвуют IgG подклассов 1, 2 и 4. При этом рецептором для них скорее всего должен слу-

жить Mрр-белок, а не *Emm*-белок, поскольку последний обычно связывает все подклассы IgG, включая IgG3. Ранее было показано, что Mрр-белок является более слабым индуктором экспериментального PSGN в сравнении с *Emm*-белком [3].

При изучении нефритогенности каждого штамма типа *emm1* на двух кроликах, обоих животных тестировали на появление анти-IgG антител в крови, а также на депозицию IgG и С3-комплемента в почках (табл. 1).

Патологические изменения в ткани коркового и мозгового слоев почек оценивали морфометрически (табл. 2).

Анти-IgG антитела в разных титрах обнаруживались в сыворотках кроликов при введения им как «скарлатинозных», так и «носительских» IgG связывающих штаммов типа *emm1*, независимо от их способности связывать IC. При инъекции «скарлатинозных» штаммов (*emm1/346* и *emm1/154*) титры анти-IgG антител несколько превышали их уровень в случае введения штаммов того же генотипа, но выделенных от носителей. Депозиция С3 чаще обнаруживалась при титрах анти-IgG антител 1:80 и при испытании контрольного штамма M1/40/58. Мы допускаем, что разные кролики по-разному реагировали на одни и те же штаммы. Так, штаммы *emm1/346* и *emm1/154* от больных, как и *emm1/17* от носителя, вызывали выраженный ответ у одного из каждого двух подопытных кроликов. На другие штаммы (*emm1/67* от больного и *emm1/124* от носителя) реакция была слабой либо отсутствовала. Данное допущение подтвердилось при морфометрическом анализе гистологического материала (табл. 2). Индукция PSGN имела место при испытании штаммов, в случае которых наблюдалась депозиция IgG и С3-комплемента.

По-видимому, каждый из изучаемых штаммов типа *emm1* в опытах на кроликах по-разному

**ТАБЛИЦА 1. Fc-РЕЦЕПТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ СГА ГЕНОТИПА *emm1* ПО СПОСОБНОСТИ СВЯЗЫВАТЬ НАТИВНЫЙ IgG И ИММУННЫЕ КОМПЛЕКСЫ, ИНДУЦИРОВАТЬ АНТИ-IgG АНТИТЕЛА И ВЫЗЫВАТЬ ДЕПОЗИЦИЮ IgG И С3**

Штаммы		Связывание нативного IgG	Связывание IC (ПАП)*	Титры анти-IgG антител	Депозиция IgG и С3 в гломерулах почки
		в dot-blot тесте в разведениях надосадков УЗ-дезинтегратов микробных культур			
От больных скарлатиной	<i>emm1/346</i>	1:16	1:8	1:40–1:80	+
	<i>emm1/154</i>	1:4	1:4	1:40–1:80	+
	<i>emm1/67</i>	1:4	1:4	1:10–1:20	–
От носителей	<i>emm1/17</i>	1:2	–	1:10–1:20	+
	<i>emm1/124</i>	1:8	–	1:20–1:40	–
Контрольные штаммы	M1/40/58	1:16	1:16	1:160	+
	T27	–	–	< 1:10	–

**Примечание.** \*ПАП — пероксидаза × антипероксидаза.

**ТАБЛИЦА 2. МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НЕФРИТОГЕННОСТИ «СКАРЛАТИНОЗНЫХ» И «НОСИТЕЛЬСКИХ» ШТАММОВ СГА ГЕНОТИПА *emm1***

Источник выделения штамма	Результат и число кроликов	Титры анти-IgG антител	Корковый слой				Мозговой слой	
			Количество гломерул		Иммунное воспаление		Иммунное воспаление	
			в норме	с деструкцией	в зоне ПК*	зона ЛИ*	в зоне ДК*	зона ЛИ*
Больные скарлатиной	PSGN — 2	1:80	7,5	2,5	42,5	45,5	62,0	80,0
	Абортивный процесс — 3	1:20–1:40	7,3	2,6	4,6	7,6	0,0	0,0
	Негативный результат — 1	1:10–1:20	9,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Носители	PSGN — 1	1:40	5,0	5,0	43,0	48,0	111,0	65,0
	Абортивный процесс — 2	1:20	7,5	2,5	4,0	0,0	19,0	0,0
	Негативный результат — 1	1:10	9,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
(+) контроль	PSGN	1:160	3,0	7,0	95,0	103,0	110,0	138,0
(-) контроль	Негативный результат	< 1:10	9,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Примечание.** \*ПК — проксимальные канальцы; ДК — дистальные канальцы; ЛИ — лимфоцитарная инфильтрация.

проявляет нефритогенную активность — от негативного до выраженного результата. Поэтому вполне реален и абортивный процесс, который определяется реактивностью организма. В частности, низкий титр анти-IgG антител в случае штаммов *emm1/67* и *emm1/124*, по-видимому, должен указывать на недостаточный уровень образования IC, что согласуется с отсутствием депозиции C3-комплемента и с формированием абортивного или отрицательного результата по причине слабой выраженности иммунного воспаления.

Еще раз следует обратить внимание на штаммы *emm1/17* и *emm1/124* от носителей, которые, вне связи со взаимодействием с иммунными комплексами, были способны в разной степени проявлять нефритогенность, по-видимому, в силу сохранения рецепторной активности в отношении нативного IgG.

Данные таблицы 2 вполне согласуются с изложенным и указывают на то, что при испытании трех «скарлатинозных» штаммов на 6 кроликах в двух случаях возникал выраженный процесс, в трех — абортивный процесс и в одном — негативный результат. Что касается двух «носительских» штаммов, то при их испытании на 4 кроликах наблюдались, соответственно, один выраженный, два абортивных и один негативный результат. Эти данные указывают на отсутствие принципиальных различий в нефритогенности «скарлатинозных» и «носительских» штаммов генотипа *emm1*. Данная активность, скорее всего, согласуется со способностью штаммов данного генотипа связывать нативный IgG, а не IC.

### Изучение штаммов *emm12*

Способность штаммов генотипа *emm12* по-разному взаимодействовать с разными формами IgG показана в таблице 3. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что «скарлатинозные» штаммы генотипа *emm12*, известные в качестве нефритогенных, связывают ПАП и ТАТ иммунные комплексы. При этом «носительские» штаммы СГА того же генотипа не взаимодействуют с IC. Важно отметить, что ни один из штаммов не связывал нативный IgG, как и IgG3.

Для изучения способности штаммов индуцировать образование анти-IgG антител, депозицию IgG и C3-комплемента комплемента, а также продукцию провоспалительного цитокина TNF $\alpha$ , каждый из штаммов типа *emm12* испытывали на двух кроликах (табл. 3). В этих же опытах была изучена нефритогенность штаммов генотипа *emm12*. Полученные данные однозначно свидетельствуют в пользу того, что нефритогенная активность «скарлатинозных» штаммов этого генотипа связана с их способностью вызывать реакцию иммунного воспаления в почечных гломерулах (табл. 4). Эта связь указывает на то, что Fc-рецепторная функция штаммов СГА, не только в отношении IgG (как это было показано в опытах со штаммами генотипа *emm1*), но и в отношении IC, является потенциальным фактором инициации развития PSGN. У большинства животных при испытании штаммов *emm12*, выделенных от больных, наблюдался выраженный PSGN; абортивный процесс имел место только у одного кролика в опыте со штаммом *emm12/118*.



## Заключение

Является очевидным, что штаммы обоих *emm*-генотипов обладают нефритогенной потенциальностью, проявляющейся в различной степени. Она определяется конкретными условиями системы «паразит–хозяин», а диапазон проявлений имеет разный, больший или меньший, акцент в модельных экспериментах: выраженный, abortивный или отрицательный. Все три возможности имели место в описанных опытах. Значительное сходство иммунологических и морфологических признаков иммунного воспаления и мембранозно-пролиферативного PSGN у человека и модели на кроликах позволяет рассчитывать на общность механизмов их развития в клинике и в условиях эксперимента.

Результаты обеих серий экспериментов по моделированию PSGN на кроликах суммированы в таблице 5.

Они свидетельствуют о том, что штаммы генотипа *emm1*, выделяемые от больных скарлатиной, связывают как нативный IgG, так и иммунные комплексы, индуцируют в ткани иммунное воспаление и ведут к развитию экспериментального гломерулонефрита. Патологический процесс могут вызывать также штаммы генотипа *emm1* от здоровых носителей и генотипа *emm12* от больных, притом, что первые взаимодействуют только с нативным IgG, а вторые — исключительно с IC.

Интерес представляет неспособность всех «носительских» штаммов обоих генотипов СГА связывать иммунные комплексы, между тем как «скарлатинозные» штаммы были активными в этом отношении. Известно, что Fc-рецепторные белки относятся к семейству M-белков, основных факторов патогенности СГА, и кодируются генами *tga*-регулона [15, 17]. Ранее было установлено, что Fc-рецепторные протеины для нативного и агрегированного

**ТАБЛИЦА 3. ТИТР АНТИ-IgG АНТИТЕЛ В КРОВИ КРОЛИКОВ, ДЕПОЗИЦИЯ IgG И C3-КОМПЛЕМЕНТА, ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНА TNF $\alpha$  В ПОЧКАХ ПРИ ИСПЫТАНИИ ШТАММОВ *emm12*, СВЯЗЫВАЮЩИХ И НЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ IC**

Источник выделения штамма	Штамм	Связывание IgG в RIA	Связывание ПАП IC в dot-blot тесте	Связывание ТАТ IC (%)	Титр анти-IgG антител	Депозиция IgG и C3	Продукция TNF $\alpha$
Больные скарлатиной	<i>emm12/94</i>	–	+	39,5	1:160	+	+
	<i>emm12/113</i>	–	+	35,0	1:160	+	+
	<i>emm12/118</i>	–	+	29,8	1:80	+	+
Носители	<i>emm12/139</i>	–	–	4,5	1:10	–	–
	<i>emm12/171</i>	–	–	3,0	1:20	–	–
(+) контроль	M12/1800	–	+	43,5	1:160	+	+

**ТАБЛИЦА 4. МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОВРЕЖДЕНИЯ ГЛОМЕРУЛ ПРИ ИНДУКЦИИ PSGN ШТАММАМИ СГА ГЕНОТИПА *emm12*, СВЯЗЫВАЮЩИХ И НЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ ИММУННЫЕ КОМПЛЕКСЫ\***

Штамм и источник их выделения	Корковый слой				Медуллярный слой		Результат
	Число гломерул	Иммунное воспаление			Иммунное воспаление		
		в норме	с деструкцией	в зоне ПК**	зона ЛИ**	в зоне ДК**	
<i>emm12/94</i> (от больного)	4,5±1,3	2,0±0,8	62,5±52	55±46	47,5±40	67,5±57	PSGN
<i>emm12/113</i> (от больного)	5,5±0,4	5,5±0,4	170±40	62±27	172±43	95±44	PSGN
<i>emm12/118</i> (от больного)	10,0±0,8	2,5±1,3	42±35	0	0	0	Abortивный процесс
<i>emm12/139</i> (от носителя)	13±3,5	0	0	0	16±13	10±4,2	Негативный результат
<i>emm12/171</i> (от носителя)	13±2,0	0	0	0	0	0	Негативный результат
M12/1800 (+) контроль	11,5±6,2	3,5±3,0	110±95	33±17	109±95	32±22	PSGN

**Примечание.** \*каждый штамм испытывали на двух кроликах; в таблице даны усредненные показатели;

\*\*ПК — проксимальные канальцы; ДК — дистальные канальцы; ЛИ — лимфоцитарная инфильтрация.

**ТАБЛИЦА 5. СУММАРНЫЕ ДАННЫЕ ПО Fc-РЕЦЕПЦИИ ШТАММОВ СГА ГЕНОТИПОВ *emm1* и *emm12*, ВЫДЕЛЯЕМЫХ ОТ БОЛЬНЫХ СКАРЛАТИНОЙ И ЗДОРОВЫХ НОСИТЕЛЕЙ**

Генотип штаммов	Источник выделения штаммов	Связывание IgG	Связывание ПАП IC	Результат
<i>emm1</i>	Больные	+	+	PSGN
	Носители	+	-	PSGN
<i>emm12</i>	Больные	-	+	PSGN
	Носители	-	-	-

IgG на поверхности бактерий представлены независимыми сайтами связывания [13]. Поэтому потеря «носительскими» штаммами СГА способности связывать иммунные комплексы может происходить независимо от их взаимодействия с нативным IgG. Это и подтвердилось данными настоящего исследования. Если Fc-рецепторные белки для нативного IgG были описаны ранее [14, 15], то на сегодня наука не располагает сведениями о белках, связывающих IC.

Недавно было показано [6], что штаммы СГА, выделяемые от асимптомных носителей инфекции, нередко несут делецию в промоторной области гена *Mga*-регулятора. Естественно, что такие штаммы-мутанты должны быть дефектными по M-белкам, и в силу этого лишены способности связывать IC. Вполне возможно, что сайт связывания для IC имеет более сложную организацию, чем Fc-рецептор для нативного IgG, и поэтому оказывается более чувствительным к стрессорным воздействиям среды обитания микроба. По-видимому, это обстоятельство может объяснить отмеченную неспособность «носительских» штаммов СГА генотипов *emm1* и *emm12* сохранять активность в отношении иммунных комплексов.

В настоящей работе еще раз подтверждается патогенетическая связь между нефритогенностью СГА и их способностью связывать различные формы IgG. Взаимосвязь между этими свойствами СГА стала очевидной при экспериментальном моделировании патологического процесса, поскольку внутривенное введение кроликам тщательно отмытой и убитой микробной взвеси сопровождается индукцией анти-IgG аутоантител и последующим образованием *in vivo* иммунных комплексов: IgG–анти-IgG. Логично допустить, что функцию триггера при этом должны выполнять связавшиеся с Fc-рецепторами молекулы IgG, которые меняют свою конфигурацию так, что «шарнирная» область оказывается недоступной расщеплению на Fc и Fab-фрагменты посредством цистеиновой протеиназы (эритрогенный токсина *SpeB*) [10] или иных бактериальных энзимов [18]. Потеря молекулами IgG чувствительности к перевариванию энзимами

указывает на приобретение ими новой структуры, приводящей к индукции анти-IgG антител. Это допущение согласуется с недавними представлениями об участии патогенных IgG антител в генезе аутоиммунного гломеруло-нефрита [3].

Образовавшиеся иммунные комплексы активируют комплемент, и его C3-компонент связывается с Fc-частью IgG в составе IC. Участие Fc-рецептора и C3-комплемента является одним из ведущих условий развития иммунного воспаления и PSGN [11]. IgG и C3 образуют в гломерулах почки депозиты (первые имеют вид «серповидных» отложений в мембранах), регистрируемые при гистоиммунохимическом изучении тканевых срезов (рис. 1 и 2).

Депозиция должна происходить за счет тканевых FcγR-рецепторов, широко представленных в гломерулах и в проксимальных канальцах [9]. Депозиция сопровождается выбросом провоспалительных цитокинов (в данном случае TNFα) и мобилизацией макрофагов/моноцитов в очаги воспаления. Именно эти клетки, как показано, экспрессируют FcγR в процессе развития иммунного воспаления, а взаимодействие иммунных комплексов с FcγR регулирует аккумуляцию лимфоцитов в очаги воспаления [9].

В итоге изложенная последовательность событий приводит к развитию мембранозно-пролиферативного PSGN, ранее описанного нами [1, 4]. Естественно, что штаммы СГА, не обладающие Fc-активностью, оказались неспособными вызывать каскад описанных воспалительных реакций и патологию почек.

На сегодня мы не можем исключить участия в патологическом процессе и других иммунных комплексов, формирующихся в результате взаимодействия поверхностных белков СГА с некоторыми белками крови кролика. Это взаимодействие вряд ли может оказаться безразличным для организма хозяина.

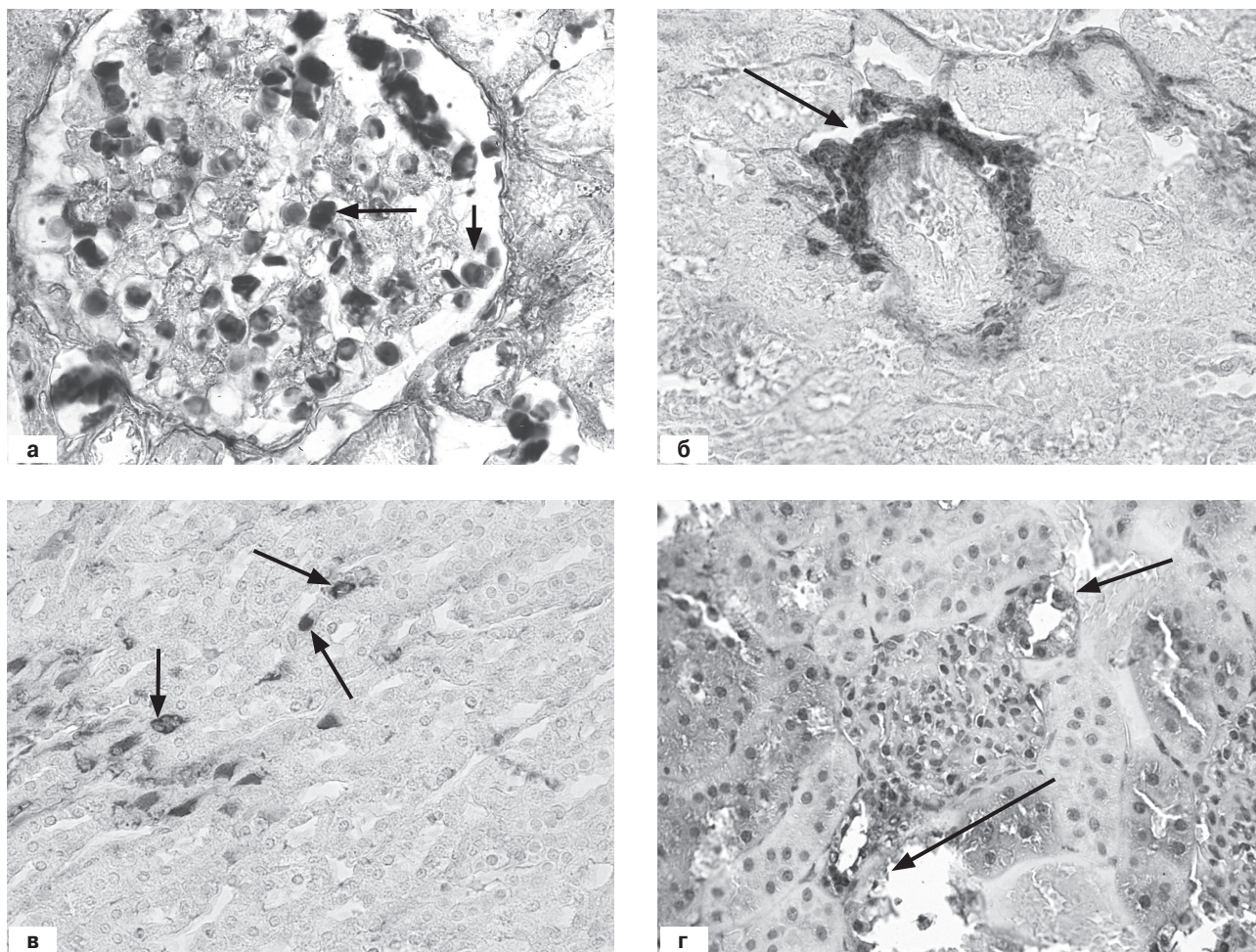
Для моделирования поражения почечных гломерул обычно используют различные подходы. К ним относятся: взивление животным подкожных камер, инфицированных живой бактериальной культурой, иммунизация лабораторных животных базальной мембраной гломерул гетерологического вида, введение гетерологических антисывороток против базальной



мембраны либо введение животным гетерологичного иммуноглобулина в сочетании с антителами к данному IgG. При этом у животных формируются IC типа IgG–анти-IgG либо возникает непосредственная атака антител против белков базальной мембраны гломерул и канальцев [8, 12, 16]. Очевидно, что в условиях такого «облегченного» моделирования поражения модель, безусловно, «будет работать», но не позволит понять роль возможных факторов *Streptococcus pyogenes* и реакций организма-хозяина в генезе изложенных событий, приводящих к развитию PSGN. Использованная нами модель в большей степени близка к естественной ситуации, возникающей при острой СГА-инфекции у человека. Кроме всего прочего, модель исключает участие внеклеточных факторов в процессе, поскольку для моделирования нами использовалась убитая прогреванием и отмытая от примесей взвесь микробных клеток.

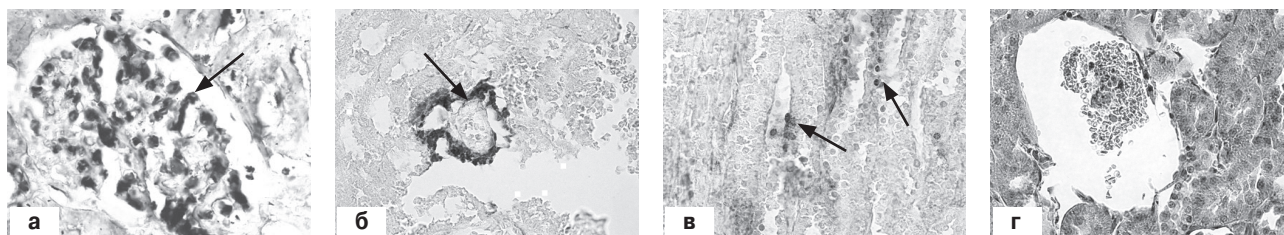
Дополнительным аргументом в пользу изложенных представлений о генезе экспериментального PSGN стала работа [7], в которой посредством препаратов Fc-части IgG авторам удалось подавлять развитие патологии. Позже эти результаты были подтверждены и нами.

Результаты работы свидетельствуют о том, что штаммы типа *emm1*, которые чаще относят к «ревматогенным», являются относительно слабыми индукторами гломерулонефрита. Это, в принципе, согласуется с данными приведенных экспериментов, в которых пять штаммов генотипа *emm1*, связывающих нативный IgG, вызывали выраженный патологический процесс только у трех из 10 подопытных животных. Обратная картина имела место с тремя штаммами типа *emm12*, связывающими только иммунные комплексы; при их испытании выраженный PSGN наблюдался у пяти из шести использованных кроликов. Приведенные данные подчеркивают выраженную нефрито-



**Рисунок 1. Иммуноморфологические изменения в корковом и мозговом слоях почки кролика, индуцированные штаммами *emm1*, связывающими нативный IgG и иммунные комплексы**

**Примечание.** а — экспрессия TNF $\alpha$  мезангиальными клетками гломерул (стрелки); б — серповидное отложение IgG в мембране проксимального канальца (стрелка); в — C3-компонент комплемента в клетках дистальных канальцев (стрелки); г — отек и утолщение мембраны проксимальных канальцев, десквамация эпителия по периферии сдавленных клубочков (стрелки); а–в: иммуногистохимическая окраска,  $\times 750$ ; г — окраска гематоксилин-эозином,  $\times 500$ .



**Рисунок 2. Иммуноморфологические изменения в корковом и мозговом слоях почки кролика, индуцированные штаммами *emm12*, связывающими только иммунные комплексы**

**Примечание.** а — экспрессия TNF $\alpha$  мезангиальными клетками (стрелки) клубочка; б — серповидное отложение IgG в стенке проксимального канальца (стрелка); в — депозиция С3-компонента комплемента в клетках дистальных канальцев (стрелки); г — атрофия ткани почечного клубочка, обилие эритроцитов в его полости; а–в: иммуногистохимическая окраска,  $\times 750$ ; г — окраска гематоксилин-эозином,  $\times 550$ .

генную активность штаммов *emm12*, что согласуется с их более высокими показателями Fc-рецепции, титров анти-IgG антител и иммунного воспаления.

Очевидно, что включение штаммов генотипа *emm12* в группу «нефритогенных» СГА выпол-

не оправдано. Из изложенного следует, что обнаружение у больных острой СГА-инфекцией штаммов генотипа *emm12* (по сравнению со штаммами типа *emm1*) следует рассматривать как высокий фактор риска развития постстрептококкового гломерулонефрита.

## Список литературы/References

1. Тотолян А.А., Бурова Л.А., Нагорнев В.А., Пигаревский П.В. Анализ механизмов иммунопатологического постстрептококкового гломерулонефрита // *Терапевтический архив*. 2008. Т. 80, № 6. С. 90–95. [Totolian A.A., Burova L.A., Nagornev V.A., Pigarevskiy P.V. Analysis mechanisms of immunopathological post-streptococcal glomerulonephritis. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2008, vol. 80, no. 6, pp. 90–95. (In Russ.)]
2. Тотолян А.А., Бурова Л.А. Критический анализ предполагаемых механизмов патогенеза постстрептококкового гломерулонефрита // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2001. Т. 3, № 4. С. 316–323. [Totolian A.A., Burova L.A. Critical analysis of suggested mechanisms of pathogenesis of the post-streptococcal glomerulonephritis. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, vol. 3, no. 4, pp. 316–323. (In Russ.)]
3. Barabas A.Z., Cole C.D., Lafreniere R., Weir D.M. Immunopathological events initiated and maintained by pathogenic IgG autoantibodies in an experimental autoimmune kidney disease. *Autoimmunity*, 2012, vol. 45, no. 7, pp. 495–509. doi: 10.3109/08916934.2012.702812
4. Burova L., Pigarevsky P., Sliverstova V., Gupalova T., Schalen C., Totolian A. Experimental poststreptococcal glomerulonephritis elicited by IgG Fc-binding M family proteins and blocked by IgG Fc fragment. *APMIS*, 2012, vol. 120, no. 3, pp. 221–230. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02826.x
5. Collan Y. Morphometry in pathology: another look at diagnostic histopathology. *Pathol. Res. Pract.*, 1984, vol. 179, pp. 189–192. doi:10.1016/S0344-0338(84)80126-0
6. Flores A.R., Olsen R.J., Wunsche A., Kumaraswami M., Shelburne S.A., Carroll R.K., Musser J.M. Natural variation in the promoter of the gene encoding the Mga regulator alters host-pathogen interaction in group A Streptococcus carrier strains. *Infect. Immun.*, 2013, vol. 81, no. 11, pp. 4128–4138. doi: 10.1128/IAI.00405-13
7. Gomez-Guerrero C., Duque N., Casado M.T., Pastor C., Blanco J., Mampaso F., Vivanco F., Egado J. Administration of IgG Fc-fragments prevents glomerular injury in experimental immune complex nephritis. *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, no. 4, pp. 2092–2101. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.2092
8. Kefalides N.A., Pegg M.T., Ohno N., Poon-King T., Zabriskie J., Fillit H. Antibodies to basement membrane collagen and to laminin are present in sera from patients with poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Exp. Med.*, 1986, vol. 163, no. 3, pp. 588–602.
9. Kovalenko P., Fujinaka H., Yoshida Y., Kawamura H., Qu Z., El-Shemi A., Li H., Matsuki A., Bilim V., Yaoita E., Abo T., Uchiyama M., Yamamoto T. Fc receptor-mediated accumulation of macrophages in crescentic glomerulonephritis induced by antiglomerular basement membrane antibody administration in WKY rats. *International Immunology*, 2004, vol. 16, no. 5, pp. 625–634. doi: 10.1093/intimm/dxh058
10. Nelson D.C., Garbe J., Collin M. Cysteine proteinase SpeB from Streptococcus pyogenes — a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biol. Chem.*, 2011, vol. 392, pp. 1077–1088. doi: 10.1515/BC.2011.208
11. Otten M.A., Groeneveld T.W.L., Flierman R., Rastaldi M.P., Trouw L.A., Faber-Krol M.C., Visser A., Essers M.C., Claassens J., Verbeek J.S., van Kooten C., Roos A., Daha M.R. Both complement and IgG Fc receptors are required for development of attenuated antiglomerular basement membrane nephritis in mice. *J. Immunol.*, 2009, vol. 183, pp. 3980–3988. doi: 10.4049/jimmunol.0901301
12. Qu Z., Cui Z., Liu G., Zhao M.H. The distribution of IgG subclass deposition on renal tissues from patients with anti-glomerular basement membrane disease. *BMC Immunol.*, 2013, vol. 14, pp. 19–26. doi: 10.1186/1471-2172-14-19



13. Schalen C., Kurl D., Christensen P. Independent binding of native and aggregated IgG in group A streptococci. *APMIS*, 1986, vol. 94B, iss. 1–6, pp. 333–338. doi: 10.1111/j.1699-0463.1986.tb03062.x
14. Stenberg L., O'Toole P., Lindahl G. Many group A streptococcal strains express two different immunoglobulin-binding proteins, encoded by closely linked genes: characterization of the proteins expressed by four strains of different M-type. *Mol. Microbiol.*, 1992, vol. 6, no. 9, pp. 1185–1194. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01557.x
15. Stenberg L., O'Toole P.W., Mestecky J., Lindahl G. Molecular characterization of protein Sir, a streptococcal cell surface protein that binds both immunoglobulin A and immunoglobulin G. *Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, no. 18, pp. 13458–13464.
16. Taylor S.R.J., Turner C.M., Elliott J.I., McDaid J., Hewitt R., Smith J., Pickering M.C., Whitehouse D.L., Cook H.T., Burnstock G., Pusey C.D., Unwin R.J., Tam F.W.K. P2X<sub>7</sub> deficiency attenuates renal injury in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2009, vol. 20, no. 6, pp. 1275–1281. doi: 10.1681/ASN.2008060559
17. Thern A., Wastfelt M., Lindahl G. Expression of two different antiphagocytotic M proteins by *Streptococcus pyogenes* of the OF<sup>+</sup> lineage. *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, no. 2, pp. 860–869.
18. Yang R., Otten M.A., Hellmark T., Mattias C., Björck L., Zhao M.-H., Daha M.R., Segelmark M. Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2010, vol. 25, no. 8, pp. 2479–2486. doi: 10.1093/ndt/gfq115

**Авторы:**

**Булова Л.А.**, д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Пигаревский П.В.**, д.б.н., руководитель отдела общей морфологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Снегова В.А.**, научный сотрудник отдела общей морфологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Кулешевич Е.В.**, младший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Жарков Д.А.**, преподаватель кафедры эпидемиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия;  
**Шален К.**, д.м.н., отдел медицинской микробиологии Лундского Университета, Лунд, Швеция;  
**Тотоян Артем А.**, д.м.н., академик РАН, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Burova L.A.**, PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Pigarevsky P.V.**, PhD, MD (Biology), Head of Department of General Morphology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Snegova V.A.**, Researcher, Department of General Morphology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Kuleshevich E.V.**, Junior Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Zharkov D.A.**, Lecturer, Department of Epidemiology, Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Schalen C.**, PhD, MD (Medicine), Department of Medical Microbiology, Lund University, Lund, Sweden;  
**Totolian Artem A.**, PhD, MD (Medicine), Academician of the Russian Academy of Sciences, Head Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 28.05.2015  
 Отправлена на доработку 06.07.2015  
 Принята к печати 05.08.2015

Received 28.05.2015  
 Revision received 06.07.2015  
 Accepted 05.08.2015

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ В ДЕТСКОМ МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ

А.В. Сергеева<sup>1</sup>, Л.Ю. Послова<sup>2</sup>, О.В. Ковалишена<sup>1</sup>, А.С. Благодравова<sup>1</sup>,  
Н.В. Епифанова<sup>3</sup>, Т.А. Сашина<sup>3</sup>, О.В. Морозова<sup>3</sup>, Н.А. Новикова<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ НО Нижегородская областная детская клиническая больница, г. Нижний Новгород, Россия

<sup>3</sup> ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора,  
г. Нижний Новгород, Россия

**Резюме.** На территории РФ в общей структуре острых кишечных инфекций удельный вес вирусных диарей среди детей колеблется в зависимости от сезона от 24 до 78% случаев. Этиологическая расшифровка вирусных острых кишечных инфекций проводится в основном среди пациентов инфекционных стационаров. Вопрос о распространенности вирусных острых кишечных инфекций в неинфекционных стационарах, в том числе как инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, остается недостаточно исследованным. Определение доли вирусного компонента в общей структуре острых кишечных инфекций сводится преимущественно к определению процентного соотношения ротавирусной инфекции без учета других возбудителей. В рамках эпидемиологического надзора за внутрибольничными инфекциями вирусной этиологии в детском многопрофильном неинфекционном стационаре проведено изучение этиологической структуры вирусных острых кишечных инфекций и молекулярно-генетическая характеристика выявленных кишечных вирусов. Была внедрена синдромальная диагностика случаев острых кишечных инфекций — выявление и обследование пациентов с признаками дисфункции желудочно-кишечного тракта, не связанной с основным заболеванием. Комплекс лабораторных методов включал: выявление и дифференциация ДНК (РНК) различных кишечных возбудителей методом ОТ-ПЦР; генотипирование кишечных вирусов методом секвенирования; анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов кДНК с применением пакета программ BLAST для идентификации близкородственных штаммов и онлайн-сервиса для автоматического генотипирования норовирусов Norovirus Genotyping Tool Version 1.0. Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ осуществляли с помощью программного обеспечения MEGA. Полученные последовательности фрагментов генома представлены в международной базе данных GenBank. Использование молекулярно-генетических методов исследования позволило дифференцировать вирусных возбудителей острых кишечных инфекций и установить факт внутрибольничной передачи. Доля острых кишечных инфекций вирусной этиологии среди пациентов, имеющих клинические признаки кишечной инфекции, и контактных лиц составила 43,8%.

## Адрес для переписки:

Сергеева Анжелика Вячеславовна  
603950, Россия, ГСП-470, г. Нижний Новгород, пл. Минина  
и Пожарского, 10/1, ГБОУ ВПО Нижегородская государственная  
медицинская академия МЗ РФ.  
Тел.: 8 (831) 436-94-81; 8 (903) 060-39-84 (моб.).  
Факс: 8 (831) 439-01-63.  
E-mail: sergeeva-av2013@yandex.ru

## Contacts:

Anzhelika V. Sergeeva  
603950, Russian Federation, GSP-470, Nizhny Novgorod, Minina  
and Pozharskogo sq., 10/1, Nizhny Novgorod State Medical Academy.  
Phone: +7 (831) 436-94-81; +7 (903) 060-39-84 (mobile).  
Fax: +7 (831) 439-01-63.  
E-mail: sergeeva-av2013@yandex.ru

## Библиографическое описание:

Сергеева А.В., Послова Л.Ю., Ковалишена О.В., Благодравова А.С.,  
Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Морозова О.В., Новикова Н.А.  
Молекулярно-генетический мониторинг острых кишечных инфекций  
вирусной этиологии в детском многопрофильном стационаре //  
Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 243–252.  
doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-243-252

## Citation:

Sergeeva A.V., Poslova L.Y., Kovalishena O.V., Blagoravova A.S.,  
Epifanova N.V., Sashina T.A., Morozova O.V., Novikova N.A. Viral etiology  
acute intestinal infections molecular monitoring in children's hospital //  
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015,  
vol. 5, no. 3, pp. 243–252. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-243-252

Этиологическая структура кишечных вирусов была представлена норовирусами (73,2%) генотипов GII.1, GII.3, GII.4 Sydney 2012, ротавирусами (23,2%) генотипов G4P[8] и G1-IP[8], а также аденовирусами (1,8%) группы F и астровирусами (1,8%) генотипов 1 и 2. Среди госпитализированных детей было 9 случаев заноса острых кишечных инфекций вирусной этиологии и 66 случаев носили внутрибольничный характер. Обследование объектов окружающей среды выявило наличие контаминации вирусами кишечной группы в 47,8% случаев.

**Ключевые слова:** норовирусы, ротавирусы, аденовирусы, астровирусы, острая кишечная инфекция, молекулярно-генетический мониторинг.

## VIRAL ETIOLOGY ACUTE INTESTINAL INFECTIONS MOLECULAR MONITORING IN CHILDREN'S HOSPITAL

Sergeeva A.V.<sup>a</sup>, Poslova L.Y.<sup>b</sup>, Kovalishena O.V.<sup>a</sup>, Blagonravova A.S.<sup>a</sup>, Epifanova N.V.<sup>c</sup>, Sashina T.A.<sup>c</sup>, Morozova O.V.<sup>c</sup>, Novikova N.A.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation

<sup>b</sup> The State Budget Hospital Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital, Nizhny Novgorod, Russian Federation

<sup>c</sup> Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Acad. I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Abstract.** On the territory of the Russian Federation in the overall structure of acute intestinal infections the proportion of viral diarrhea among children varies from 24 to 78% of cases depending on the season. The acute viral intestinal infections etiological confirmation is performed mainly among patients of infectious hospitals. The prevalence of viral acute intestinal infections in non-infectious hospitals, including infections associated with medical care, remains unclear. Currently estimation of viral component in the acute intestinal infections overall structure mainly consists in determination of rotavirus infection prevalence excluding other pathogens. As the part of viral etiology hospital infections epidemiological surveillance in non-infectious children's hospital the study of acute viral intestinal infections etiological structure and molecular genetics characterization of identified enteric viruses is conducted. The syndrome diagnosis of acute intestinal infections cases was introduced — an identification and evaluation of patients with signs of dysfunction of the gastrointestinal tract, that is not related to the underlying disease. A set of laboratory methods included identification of various intestinal pathogens DNA (RNA) by PCR-RT method; genotyping of enteric viruses using sequencing; nucleotide sequence analysis of cDNA fragments using the BLAST software package for identification of closely related strains and an online service for automatic genotyping of noroviruses by Norovirus Genotyping Tool Version 1.0. Alignment of nucleotide sequences and phylogenetic analysis was performed using the software MEGA 5.0. The obtained sequence fragments of the genome was downloaded in GenBank international database. The use of molecular genetics research methods allowed to differentiate viral pathogens of acute intestinal infections and to establish the fact of nosocomial transmission. The proportion of viral etiology acute intestinal infections in patients with clinical signs of intestinal infection, and contact persons was 43.8%. The etiological structure of intestinal virus infections was presented by noroviruses (73.2%) genotypes GII.1, GII.3, GII.4 Sydney 2012, rotaviruses (23.2%) genotypes G4P[8] and G1-IP[8], and adenovirus (1.8%) of the group F and astroviruses (1.8%) genotypes 1 and 2. Among the hospitalized children were 9 cases of viral etiology acute intestinal infections importation, and 66 of cases were of nosocomial origin. Examination of the environment revealed the presence of contamination by enteric viruses in 47.8% of cases.

**Key words:** noroviruses, rotaviruses, adenoviruses, astroviruses, acute intestinal infection, molecular-genetic monitoring.

## Введение

В настоящее время большинство острых кишечных инфекций (ОКИ) имеет вирусную природу, особенно среди детского населения. В РФ в общей структуре ОКИ на долю вирусных диарей у детей приходится от 24% в летнее время года и до 70–78% в осенне-зимний период [7]. Спектр кишечных вирусов весьма разнообразен и включает представителей двенадцати родов восьми различных семейств: *Reoviridae* (род *Rotavirus*), *Caliciviridae* (роды *Norovirus*, *Sapovirus*), *Adenoviridae* (род *Mastadenovirus*), *Astroviridae* (род *Astrovirus*), *Picornaviridae* (роды *Enterovirus*, *Par-*

*echovirus*, *Kobuvirus* — агент Аичи), *Coronaviridae* (роды *Coronavirus*, *Torovirus*), *Parvoviridae* (род *Vocavirus*), *Picobirnaviridae* (род *Picobirnavirus*) [12]. По данным многолетних региональных исследований, среди населения Нижнего Новгорода циркулируют представители одиннадцати родов [3].

Определение этиологической структуры вирусных ОКИ в основном проводится среди пациентов медицинских организаций инфекционного профиля [2, 3, 4, 5]. Вопрос о распространенности вирусных ОКИ в неинфекционных стационарах, в том числе как инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи

(ИСМП), остается недостаточно исследованным. Более изучена в этом плане ротавирусная инфекция, на долю которой приходится от 9 до 49% внутрибольничных ОКИ [5, 7]. По литературным данным, вспышки ротавирусной инфекции неоднократно регистрировались в соматических стационарах. Осложнения эпидемических ситуаций наблюдались в ЛОР-отделении, хирургических и реанимационных отделениях детских многопрофильных стационарах. Отмечено, что случаи заболевания ротавирусной инфекцией встречались среди 1% детей после нахождения в реанимационном отделении.

Следует отметить, что в немногочисленных научных публикациях определение доли вирусного компонента в общей структуре ОКИ сводится преимущественно к определению процентного соотношения ротавирусной инфекции без учета других возбудителей. Между тем имеются данные о значительной роли норовирусной инфекции как внутрибольничных ОКИ [14]. Применение молекулярно-генетических методов исследования в рамках эпидемиологического надзора за инфекциями в медицинской организации направлено на выявление всего спектра вирусных возбудителей ОКИ с молекулярно-генетической характеристикой и оценкой их идентичности.

Целью исследования явилось изучение этиологической структуры вирусных ОКИ в условиях неинфекционного многопрофильного детского стационара и молекулярно-генетическая характеристика выявленных кишечных вирусов.

## Материалы и методы

В рамках эпидемиологического надзора за внутрибольничными инфекциями вирусной этиологии в детском многопрофильном стационаре была внедрена сидромальная диагностика случаев ОКИ — выявление и обследование пациентов с признаками дисфункции желудочно-кишечного тракта, не связанной с основным заболеванием. Наличие диареи было основным показанием для проведения обследования на различные кишечные инфекции. Обследованию также подвергались лица, выявленные в результате эпидемиологического обследования — контактные с пациентами с указанным синдромом или с подтвержденными диагнозом ОКИ. За 2013 г. было выявлено и обследовано 178 человек, из них 138 детей различного возраста с наличием неинфекционной патологии различных органов и систем, 19 матерей, ухаживающих за детьми, 21 сотрудник. Дети были госпитализированы в эндокринологическое отделение (68%), в отделение раннего возраста (13%), в хирургические (9,9%), в неврологическое (4,4%), в отделение гнойной хирургии

(3,6%), в онкологическое (2,2%), прочие (1,1%). Во время нахождения в стационаре у детей развивалась клиника ОКИ.

С использованием тест-систем для экстракции РНК/ДНК («РИБО-преп»), комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК («РЕВЕРТА-L») и набора для выявления и дифференциации ДНК (РНК) микроорганизмов («АмплиСенс® ОКИ скрин-FL») производства ЦНИИЭМ (Москва, Россия), проводили поиск РНК ротавирусов группы А, норовирусов, астровирусов, энтеровирусов и ДНК аденовирусов группы F в образцах фекалий (178), мазках из ротоглотки (37), пробах окружающей среды (23). Всего проведено 1850 исследований. Молекулярную диагностику методом ПЦР в режиме реального времени осуществляли на базе проблемной научной лаборатории ПЦР-исследований НИИ профилактической медицины ГБОУ ВПО НижГМА.

Для генотипирования кишечных вирусов были использованы 132 образца, положительных на наличие возбудителей вирусных ОКИ. Исследования проводили в лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.

G[P]-типирование ротавирусов осуществляли методом ОТ-ПЦР с помощью праймеров для идентификации G1, G2, G3, G4, G9 и P[4], P[6], P[8], P[9] типов [6]. Продукты ПЦР детектировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле и трис-боратной буферной системе. Результаты регистрировали с помощью видеосистемы для документации гелей «InGenius» (Франция).

Генотипирование кишечных вирусов методом секвенирования проводили путем определения нуклеотидной последовательности фрагментов кДНК, полученных при амплификации типоспецифических участков вирусных геномов размером 365, 349 и 449 нуклеотидов для ротавирусов, норовирусов и астровирусов соответственно [8, 10, 13, 16]. Ампликоны выделяли из геля с применением наборов реагентов производства ООО «Цитокин» и ООО «ФракталБио» (Санкт-Петербург).

Определение первичной структуры фрагментов кДНК осуществляли в автоматическом режиме с использованием генетического анализатора Beckman Coulter CEQ8000 и набора реагентов DTCS Quick Start Kit («Beckman Coulter», США), согласно рекомендациям производителя. Нуклеотидные последовательности фрагментов кДНК анализировали с применением пакета программ BLAST для идентификации близкородственных штаммов и онлайн-сервиса для автоматического генотипирования норовирусов Norovirus Genotyping Tool Version 1.0.



Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ осуществляли с помощью программного обеспечения MEGA, версия 6.1 [17]. Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности кишечных вирусов, имеющиеся в базе данных GenBank, номера которых указаны на филогенетических деревьях. Филограммы были построены методом присоединения соседей (Neighbor-Joining) на основе двухпараметрической модели Kimura. Достоверность топологии филограммы оценивали с помощью бутстреп-анализа с использованием 1000 случайных выборок. На филограммах указывали статистические индексы поддержки более 70.

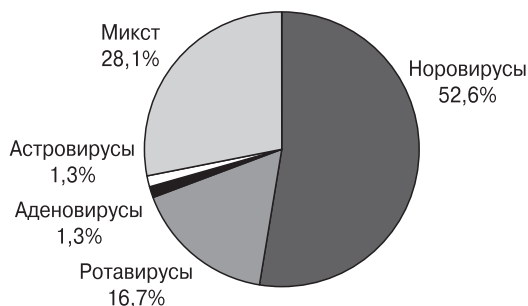
Полученные в данном исследовании последовательности фрагментов генома представлены в международной базе данных GenBank под номерами KP208780, KP208781 (астровирусы), KP208782-KP208785, KR020053 (норовирусы), KR020054 (ротавирусы).

Результаты работы подвергали статистической обработке по общепринятой методике.

## Результаты

При обследовании по показаниям 178 человек детского многопрофильного стационара вирусы кишечной группы обнаружены в 43,8±3,7% случаев. Группа, составившая 56,2±3,7%, где вирусные патогены не были обнаружены, подлежала дальнейшему бактериологическому обследованию.

Среди положительных на вирусы кишечной группы лиц (78 человек) моноинфекция выявлена в 72%, в остальных случаях (28%) наблюдалась микст-инфекция двумя вирусами ( $p < 0,01$ ) (рис. 1). В вирусных ассоциациях преобладали ротавирусная+норовирусная инфекции (более 90%). Таким образом, в условиях многопрофильного детского стационара вирусная кишечная инфекция встречалась у каждого второго ребенка, имеющего признаки диареи.



**Рисунок 1. Распределение вирусов кишечной группы, обнаруженных у пациентов в многопрофильном стационаре**

При анализе по этиологическому признаку выявлено преобладание норовирусной инфекции, на ее долю пришлось 73,2±3,3% обследованных с моноинфекцией ( $p < 0,05$ ). Ротавирусная инфекция занимала второе место и ее удельный вес составлял 23,2±3,2%. Астровирусная и аденовирусная инфекции составляли по 1,8±0,9% случаев.

По результатам эпидемиологической диагностики, среди госпитализированных детей было 9 случаев заноса ОКИ вирусной этиологии, а именно рота- и норовирусных инфекций, 66 случаев носили внутрибольничный характер. Среди матерей, находившихся в стационаре вместе с детьми, отмечено 3 случая — носительство и стертая форма норовирусной инфекции.

В условиях широкого распространения кишечной инфекции проведено исследование объектов окружающей среды одного из отделений стационара на предмет контаминации кишечными вирусами. Были взяты смывы с предметов буфета отделения, палат для пациентов, медицинского поста, санитарной комнаты и туалетов. Наличие кишечных вирусов определено в 47,8±10,4% случаев, то есть каждая вторая проба была положительна. В 39,1±14,7% случаев встречался один вирус, из которых на норовирус приходилось 26,1 и 13,0% на ротавирус. Вирусные ассоциации выявлены в двух случаях. Следует отметить, что положительные результаты на наличие кишечных вирусов были выявлены только в больничных палатах (39,1%) и туалетах (8,7%). Очевидно, что при наличии устойчивости кишечных вирусов в окружающей среде, контаминированные предметы могут явиться одним из постоянно действующих факторов передачи инфекции в условиях стационара, что требует строгого соблюдения санитарно-эпидемиологического режима.

Как известно, основным механизмом передачи кишечных вирусов является фекально-оральный механизм. Однако, учитывая, что в остром периоде заболевания вирусы могут выделяться с носоглоточной слизью и рвотными массами, не исключен аэрогенный механизм передачи. Для подтверждения данного предположения проведено молекулярно-генетическое исследование мазков насо- и ротоглотки от больных острой кишечной инфекцией на наличие кишечных вирусов. В 10,8±5,1% случаев были обнаружены различные кишечные вирусы. Из 4 положительных проб в двух образцах встречался ротавирус, в других — норовирус и аденовирус. Обнаружение генетического материала рота-, норо- и аденовирусов в мазках со слизистых ротоглотки детей с диареей может свидетельствовать о возможности реализации аэрогенного механизма передачи. Однако это требует дальнейших исследований.

На следующем этапе работы на основе установленных нуклеотидных последовательностей фрагментов генома кишечных вирусов осуществляли филогенетический анализ.

Генотипирование 20-ти ротавирусов методами ОТ-ПЦР и секвенирования показало наличие генотипов G4P[8] в шести случаях (30,0%) и G1P[8] — в четырнадцати (70,0%).

Четыре из шести случаев выделения ротавируса G4P[8], зафиксированные в марте-апреле 2013 г. в одном отделении, вероятно, были связаны между собой, и обусловлены заносом инфекции пациентом, имевшим накануне госпитализации повышение температуры до 39°C, дисфункцию желудочно-кишечного тракта (диарею, рвоту) и гиперемию глотки.

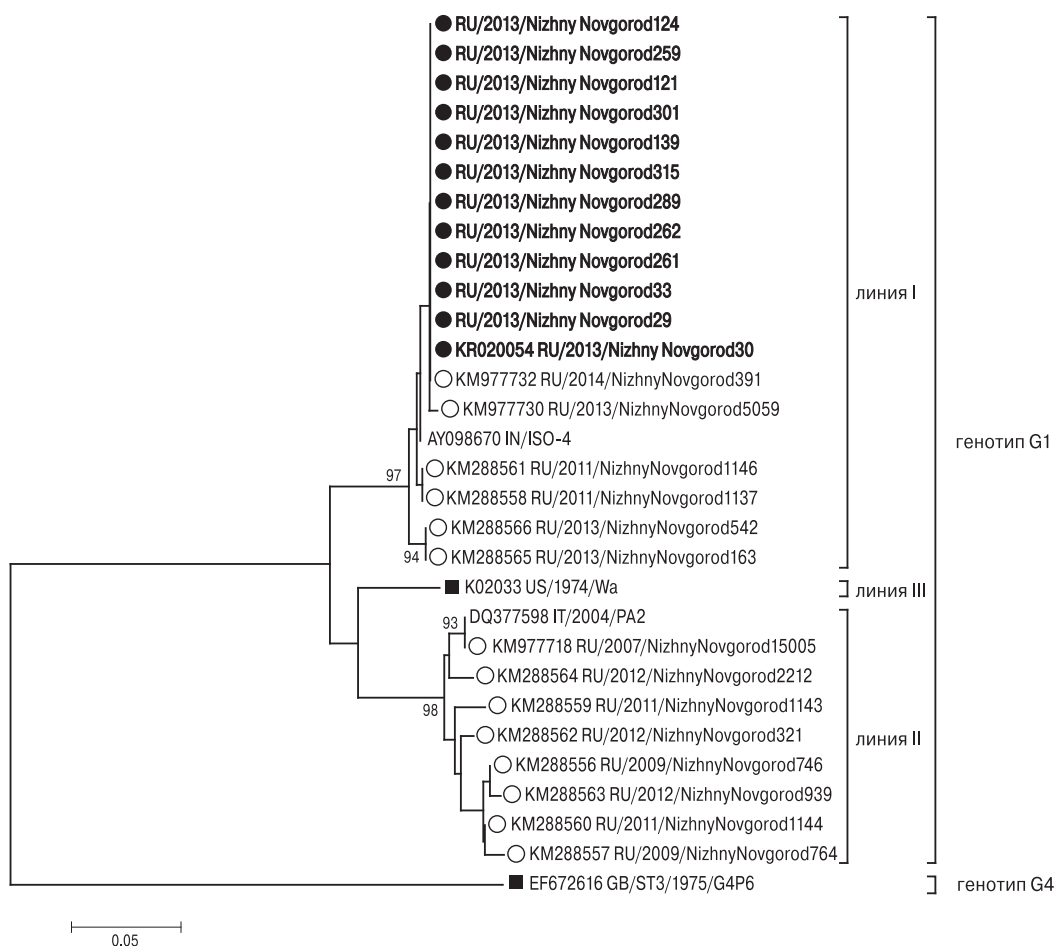
Один случай зарегистрирован в июле и один — в октябре 2013 г. Последний также представлял собой занос инфекции, так как больной поступил с температурой и гиперемией глотки, что в совокупности с проявившейся

на следующий день дисфункцией ЖКТ свидетельствовало о начальной стадии заболевания ротавирусным гастроэнтеритом.

В период наблюдения ротавирус генотипа G4P[8] доминировал на территории Нижнего Новгорода при спорадической заболеваемости [8], и его появление у больных стационара было обусловлено, по всей вероятности, неоднократным заносом в стационар.

Ротавирус генотипа G1P[8] был идентифицирован у 14-ти пациентов стационара, госпитализированных в период с июля по декабрь 2013 г. При этом появление кишечной дисфункции у пациентов наблюдалось через 4–10 дней после госпитализации. Как свидетельствует филогенетический анализ, все пациенты были инфицированы одним вариантом ротавируса (рис. 2).

Гомология нуклеотидных последовательностей составила 99,9–100%. Следует отметить, что ротавирусы генотипа G1P[8] в изучаемый



**Рисунок 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена VP7 генома ротавирусов**

**Примечание.** Названия стран указаны по двухбуквенному коду ISO-3166-1.

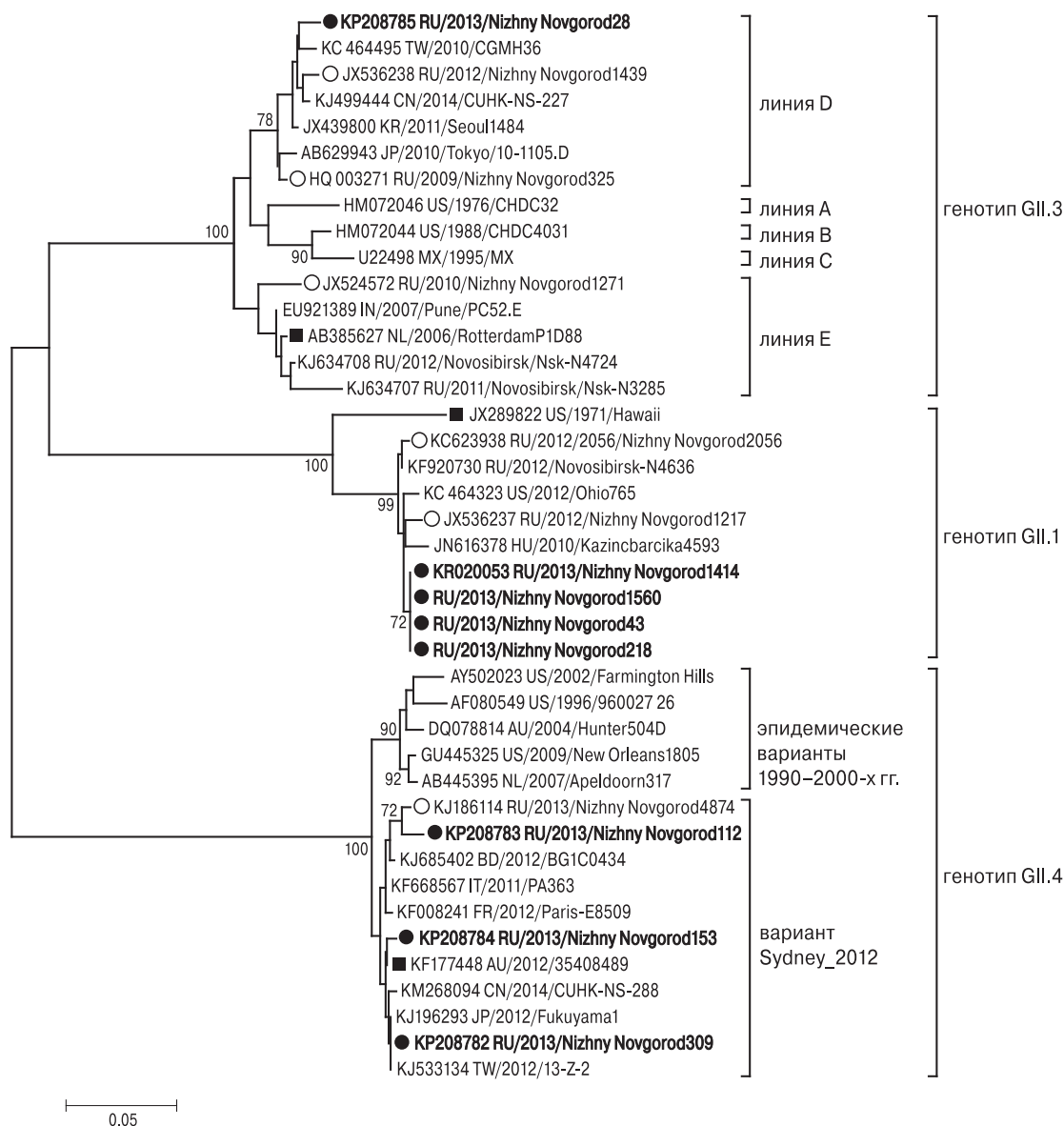
- Изоляты, выявленные в ходе данного исследования.
- Изоляты, выявленные в других исследованиях на территории Нижнего Новгорода.
- Референсные типовые штаммы ротавирусов генотипов G1 и G4.

период времени в Нижнем Новгороде имели низкую активность циркуляции (доля 12,1%) и были представлены как минимум пятью вариантами [11]. Вариант ротавируса, выявленный у пациентов стационара, по результатам филогенетического анализа отнесен к линии G1-I. Представители данной линии циркулировали в Нижнем Новгороде только в последние годы, в то время как основное место в нижегородской популяции ранее принадлежало вариантам линии G1-II. Представленные результаты свидетельствуют о наличии в многопрофильном стационаре устойчивой циркуляции внут-

рибольничного штамма ротавируса генотипа G1-I и внутрибольничной передачи данного возбудителя.

Генотипирование норовирусов проведено для девяти изолятов. Секвенирование и определение генотипа с помощью онлайн-сервиса показало, что выявленные норовирусы относились к геногруппе GII, генотипам GII.1 (44,4±16,6%), GII.4 (44,4±16,6%) и GII.3 (один изолят).

Норовирус GII.1 был обнаружен в конце марта – начале апреля 2013 г. у четырех пациентов одного отделения (рис. 3). Первый из четырех



**Рисунок 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена VP1 генома норовирусов**

**Примечание.** Названия стран указаны по двухбуквенному коду ISO-3166-1.

- Изоляты, выявленные в ходе данного исследования.
- Изоляты, выявленные в других исследованиях на территории Нижнего Новгорода.
- Референсные типовые штаммы норовирусов разных генотипов GII.1, GII.3, GII.4.

случаев (1414) документирован как занос инфекции, так как симптомы ОКИ проявились у ребенка, поступившего с повышенной температурой и гиперемией глотки, примерно через 24 часа после госпитализации. Позднее, с интервалом 1–2 недели, от двух детей с ОКИ и от матери без симптомов инфекции, обследованной по контакту с заболевшими, были выделены норовирусы, идентичные изоляту 1414 по исследуемому участку генома (43, 218, 1560). Выявленные норовирусы были сходны с единственным изолятом норовируса генотипа GII.1, обнаруженным за период 2006–2012 гг. при sporadicческой заболеваемости на территории Нижнего Новгорода (май 2012 г., изолят 1217), а также с норовирусом, вызвавшим вспышку ОКИ в одном из учебных заведений города в сентябре 2012 г. (изолят 2056) (гомология 99,9%) [2].

С учетом единства места и времени выделения норовируса GII.1 в данном исследовании, идентичности полученных нуклеотидных последовательностей, а также факта редкого обнаружения этого генотипа в Нижнем Новгороде, рассматриваемые случаи норовирусной инфекции в стационаре можно считать результатом внутрибольничной передачи инфекции.

Норовирусы GII.4, обнаруженные в ходе данного исследования, относятся к геноварианту *Sydney\_2012*, который был впервые обнаружен в Австралии в марте 2012 г. и в эпидсезон 2012–2013 гг. приобрел характер эпидемического варианта, широко распространившись по всему миру [18]. Впервые на территории Нижнего Новгорода он был идентифицирован как этиологический агент группового заболевания ОКИ в соматическом стационаре в ноябре 2013 г.

Все выявленные в данной работе изоляты варианта GII.4 *Sydney\_2012*, отличались друг от друга по исследуемому участку генома, последовательности трех из них представлены в филогенетическом дереве (рис. 3). Изолят 112, выявленный в сентябре 2013 г., входит вместе с норовирусом, вызвавшим групповое заболевание ОКИ в Нижнем Новгороде (изолят 4784), в отдельный кластер, сформированный норовирусами, циркулировавшими в ряде европейских и азиатских стран. Изоляты 153 и 309, выделенные в сентябре и декабре 2013 г., сходны с норовирусами, циркулировавшими в Азии.

Дивергенция между выявленными в данном исследовании изолятами норовируса GII.4 *Sydney* составляет 07–2,4%, они отличаются друг от друга на 2–7 нуклеотидных замен. Это с учетом короткого временного интервала между выявлением этих вирусов (сентябрь–декабрь) не позволяет считать, что они произошли от единого предка и представляют собой результат эволюции вируса в процессе внутри-

больничной циркуляции. Более вероятными представляются независимые заносы этих вирусов в стационар.

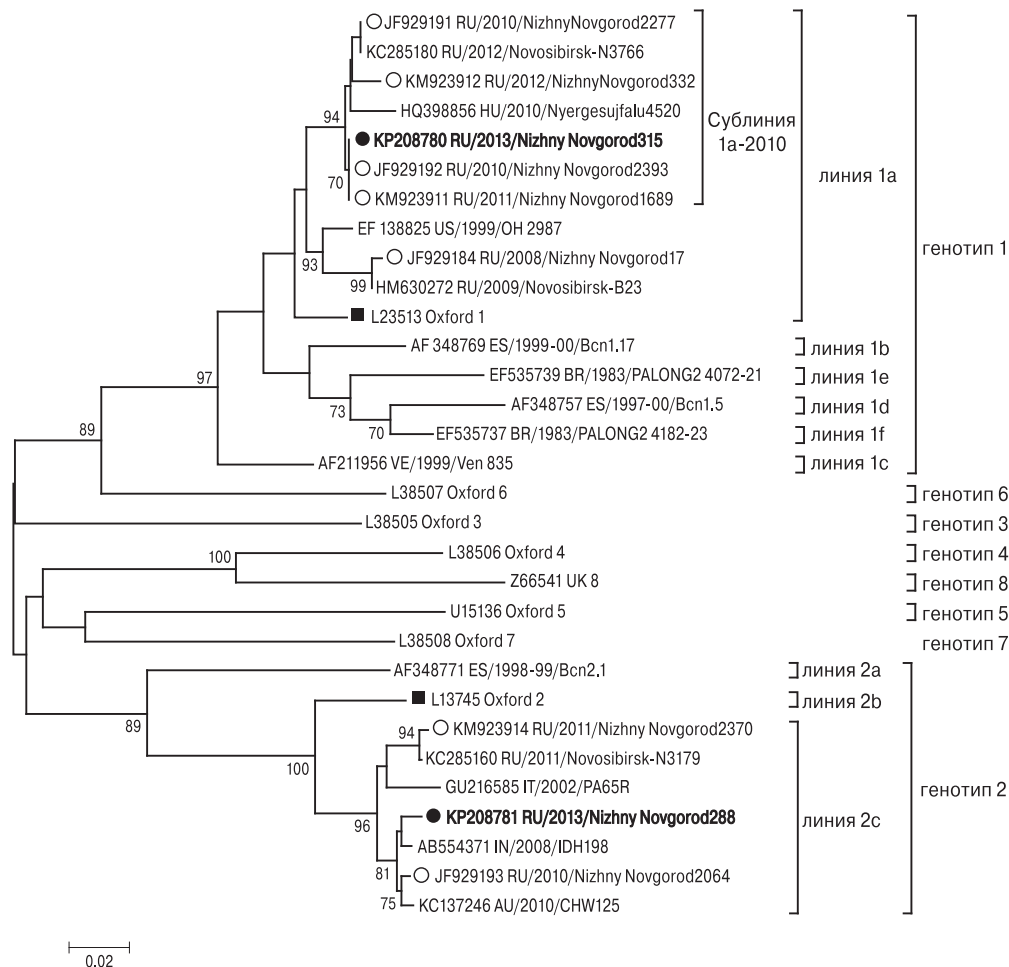
Последовательность норовируса GII.3 при филогенетическом анализе отнесена к линии D по классификации Mahar [15] (рис. 3). Норовирусы линии D, возникшей в начале 2000-х гг. и линии E, сформировавшейся в середине 2000-х гг., в настоящее время коциркулируют в мире. Представители обеих линий обнаружены в предыдущих исследованиях в Нижнем Новгороде [2]. Изолят 28 наиболее близок к нижегородскому изоляту 1439, и образует с ним, а также с рядом родственных штаммов, выявленных в последние годы в странах Азии, отдельную сублинию в составе линии D.

Астровирусы были обнаружены за период наблюдения у трех больных — у одного в моноинфекции, у двух — в микст-инфекции с ротавирусом и с рота- и норовирусом. Амплифицировать типоспецифический участок генома удалось только для двух изолятов, выделенных в декабре 2013 г. с интервалом в 8 дней в разных отделениях.

На филограмме видно, что 2 выявленных в данном исследовании изолята, принадлежат к разным генотипам (рис. 4). Изолят 315 относится к генотипу 1, линии 1a, сублинии 1a-2010. Известно, что астровирусы первого генотипа являются наиболее распространенными и обладают высоким уровнем генетической гетерогенности, которая выражается в существовании, как минимум, 6 генетических линий [11]. Ранее при исследовании астровирусов, циркулировавших на территории Нижнего Новгорода, было установлено, что с октября 2010 г. все выявленные астровирусы линии 1a относились к сублинии, которая обозначена 1a-2010 [1]. Изолят 315, выявленный нами в многопрофильном стационаре в 2013 г., был идентичен по исследуемому участку генома ряду изолятов астровирусов, обнаруженным у больных ОКИ в Нижнем Новгороде в 2010–2012 гг., от которых отличался по 1–4 нуклеотидным позициям (гомология 98,8–100%).

Изолят 288 отнесен к генотипу 2, генетической линии 2с, которую недавно было предложено дифференцировать в составе 2-го генотипа, наряду с линиями 2a и 2b [9]. В целом, астровирусы второго генотипа выявляются в мире гораздо реже, чем астровирусы 1-го генотипа. Ранее на территории Нижнего Новгорода было идентифицировано только 2 астровируса 2-го генотипа — в сентябре 2010 г. [1] и в ноябре 2011 г., оба относились к линии 2с. Гомология изолята 288 с выявленными ранее на территории Нижнего Новгорода астровирусами 2-го генотипа составляет 97,2–98,8% (отличия — по 9 и 5 нуклеотидным позициям).





**Рисунок 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена предшественника капсидных белков генома астровирусов**

**Примечание.** Названия стран указаны по двухбуквенному коду ISO-3166-1.

- Изоляты, выявленные в ходе данного исследования.
- Изоляты, выявленные в других исследованиях на территории Нижнего Новгорода.
- Референтные типовые штаммы астровирусов генотипов 1 и 2.

Результаты проведенного генотипирования астровирусов свидетельствуют о том, что эпизоды астровирусной инфекции, выявленные в ходе данного исследования, хотя и произошли с небольшим интервалом времени, не были эпидемиологически связаны друг с другом, а представляли собой результат независимых заносов в стационар извне.

## Выводы

Полученные при исследовании результаты свидетельствуют об активной циркуляции кишечных вирусов в условиях многопрофильного детского стационара. Доля ОКИ вирусной этиологии среди пациентов, имеющих клинические признаки кишечной инфекции, и контактных лиц по результатам лабораторных исследований, составила 43,8%. Каждый второй госпитализированный ребёнок с дисфункцией

желудочно-кишечного тракта, не связанной с основным заболеванием, был инфицирован кишечным вирусом.

Объекты окружающей среды в неинфекционном отделении были контаминированы вирусами кишечной группы в 47,8% случаев.

Среди выявленных и обследованных лиц доминировали норовирусы геногруппы GI (более 70%). Ротавирусы с преобладанием генотипа G1P[8] занимали второе место (23,2%). Кроме этого, были выявлены аденовирусы группы F и астровирусы генотипов 1 и 2.

Применение молекулярно-генетических методов исследования в комплексе с эпидемиологической диагностикой в рамках эпидемиологического надзора за инфекциями в медицинской организации позволяет эффективно выявлять весь спектр вирусных возбудителей ОКИ и проводить оценку их идентичности с целью установления внутрибольничной передачи.

## Список литературы/References

1. Епифанова Н.В., Новикова Н.А., Ефимов Е.И., Парфенова О.В., Луковникова Л.Б., Фомина С.Г. Молекулярно-генетическая характеристика астровирусов, циркулирующих в Нижнем Новгороде // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. № 6. С. 32–39. [Epifanova N.V., Novikova N.A., Efimov E.I., Parfenova O.V., Lukovnikova L.B., Fomina S.G. Molecular-genetic characteristic of astroviruses circulating in Nizhny Novgorod. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2012, no. 6, pp. 32–39. (In Russ.)]
2. Епифанова Н.В., Луковникова Л.Б., Новикова Н.А., Парфенова О.В., Фомина С.Г. Эпидемические варианты норовирусов генотипа GII.4 в Нижнем Новгороде в 2006–2012 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 2. С. 64–72. [Epifanova N.V., Lukovnikova L.B., Novikova N.A., Parfenova O.V., Fomina S.G. Epidemic variants of genotype noroviruses GII.4 in Nizhny Novgorod in 2006–2012. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 2, pp. 64–72. (In Russ.)]
3. Епифанова Н.В., Луковникова Л.Б., Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Зверев В.В., Пономарёва Н.В., Парфёнова О.В., Новиков Д.В., Волкова М.А., Новикова Н.А. Этиологическая структура вирусных кишечных инфекций у детей в Нижнем Новгороде // Медицинский альманах. 2010. № 2 (11). С. 233–236. [Epifanova N.V., Lukovnikova L.B., Golitsyna L.N., Fomina S.G., Zverev V.V., Ponomareva N.V., Parfenova O.V., Novikov D.V., Volkova M.A., Novikova N.A. Etiological structure of viral intestinal infections in children in Nizhny Novgorod. *Meditsinskii al'manakh = Medical Almanac*, 2010, no. 2 (11), pp. 233–236. (In Russ.)]
4. Жираковская Е.В., Аксанова Р.Х., Горбунова М.Г., Тикунов А., Курильщикова А.М., Соколов С.Н., Нетёсов С.В., Тикунова Н.В. Генетическое разнообразие изолятов ротавирусов группы А, выявленных в Западной Сибири в 2007–2011 гг. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012. № 4. С. 33–41. [Zhirakovskaia E.V., Aksanova R.Kh., Gorbunova M.G., Tikunov A., Kuril'shchikov A.M., Sokolov S.N., Netesov S.V., Tikunova N.V. Genetic diversity of group A rotavirus isolates found in Western Siberia in 2007–2011. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2012, no. 4, pp. 33–41. (In Russ.)]
5. Жираковская Е.В., Тикунов А.Ю., Курильщикова А.М., Дёмина А.В., Покровская И.В., Шеронова О.Б., Позднякова Л.Л., Нетёсов С.В., Тикунова Н.В. Этиологическая структура острых кишечных инфекций у взрослых в Новосибирске // Инфекционные болезни. 2013. Т. 11, № 2. С. 31–37. [Zhirakovskaia E.V., Tikunov A.Yu., Kuril'shchikov A.M., Demina A.V., Pokrovskaya I.V., Sheronova O.B., Pozdnyakova L.L., Netesov S.V., Tikunova N.V. Etiological structure of acute intestinal infections in adults in Novosibirsk. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2013, vol. 11, no. 2, pp. 31–37. (In Russ.)]
6. Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Федорова О.Ф. G[P]-генотипирование ротавирусов с использованием полимеразной цепной реакции: Методические рекомендации. Нижний Новгород, 2007. 16 с. [Novikova N.A., Epifanova N.V., Fedorova O.F. G[P]-genotipirovanie rotavirusov s ispol'zovaniem polimeraznoi tsepnoi reaktsii: Metodicheskie rekomendatsii [G[P]-genotyping of rotaviruses using the polymerase chain reaction: Methodological recommendations]. *Nizhny Novgorod*, 2007. 16 p.]
7. Новокшонов А.А., Соколова Н.В., Сахарова А.А., Бережкова Т.В. Клиническая эффективность нового энтеросорбента в комплексной терапии острых кишечных инфекций вирусной этиологии у детей // Лечащий врач. 2009. № 7. С. 78–80. [Novokshonov A.A., Sokolova N.V., Sakharova A.A., Berezhkova T.V. The clinical efficacy of a new enterosorbent in the treatment of acute intestinal infections of viral etiology in children. *Lechashchii vrach = The Attending Physician*, 2009, no. 7, pp. 78–80. (In Russ.)]
8. Bull R.A., Tu E.T.V., McIver C.J., Rawlinson W.D., White P.A. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 2, pp. 327–333. doi: 10.1128/JCM.44.2.327–333.2006
9. De Grazia S., Platia M.A., Rotolo V., Colomba C., Martella V., Giammanco G.M. Surveillance of human astrovirus circulation in Italy 2002–2005: emergence of lineage 2c strains. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011, vol. 17, no. 1, pp. 97–101. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03207.x
10. Di Stefano D.J., Kraiouchkine N., Mallette L., Maliga M., Kulnis G., Keller P.M., Clark H.F., Shaw A.R. Novel rotavirus VP7 typing assay using a one-step reverse transcriptase PCR protocol and product sequencing and utility of the assay for epidemiological studies and strain characterization, including serotype subgroup analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 12, pp. 5876–5880. doi: 10.1128/JCM.43.12.5876–5880.2005
11. Gabbay Y.B., Leite J.P., Oliveira D.S., Nakamura L.S., Nunes M.R.T., Mascarenhas J., D'Arc P., Heinemann M.B., Linhares A.C. Molecular epidemiology of astrovirus type 1 in Belém, Brazil, as an agent of infantile gastroenteritis, over a period of 18 years (1982–2000): identification of two possible new lineages. *Virus Res.*, 2007, vol. 129, no. 2, pp. 166–174. doi: 10.1016/j.virusres.2007.07.006
12. Glass R.I., Bresee J., Jiang B., Gentsch J., Ando T., Fankhauser R., Noel J., Parashar U., Rosen B., Monroe S.S. Gastroenteritis viruses: an overview. *Novartis Found Symp.*, 2001, pp. 5–19.
13. Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Fuminori H.B., Takeda N., Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 4, pp. 1548–1557. doi: 10.1128/JCM.41.4.1548–1557.2003
14. Kambhampati A., Koopmans M., Lopman B.A. Burden of norovirus in healthcare facilities and strategies for outbreak control. *J. Hosp. Infect.*, 2015, vol. 89, no. 4, pp. 296–301. doi: 10.1016/j.jhin.2015.01.011
15. Mahar J.E., Bok K., Green K.Y., Kirkwood C.D. The importance of intergenetic recombination in norovirus GII.3 evolution. *J. Virol.*, 2013, no. 87, pp. 3687–3698. doi: 10.1128/JVI.03056-12
16. Noel J.S., Lee T.W., Kurtz J.B., Glass R.I., Monroe S.S. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, vol. 33, no. 4, pp. 797–801.

17. Tamura K., Stecher G., Peterson D., FilipSKI A., Kumar S. MEG A6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, no. 30, pp. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
18. Van Beek J., Ambert-Balay K., Botteldoorn N., Eden J.S., Fonager J., Hewitt J., Iritani N., Kroneman A., Vennema H., Vinjé J., White P.A., Koopmans M., on behalf of NoroNet. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Eurosurveillance*, 2013, vol. 18, iss. 1, pp. 8–9.

**Авторы:**

**Сергеева А.В.**, к.м.н., старший преподаватель кафедры эпидемиологии, зав. проблемной научной лабораторией ПЦР-исследований НИИ профилактической медицины, ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия;

**Послова Л.Ю.**, к.м.н., зав. эпидемиологическим отделом ГБУЗ НО Нижегородская областная детская клиническая больница, г. Нижний Новгород, Россия;

**Ковалишена О.В.**, д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии, зам. директора по науке НИИ профилактической медицины ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия;

**Благонравова А.С.**, д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии, директор НИИ профилактической медицины ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия;

**Епифанова Н.В.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

**Сашина Т.А.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

**Морозова О.В.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

**Новикова Н.А.**, д.б.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, г. Нижний Новгород, Россия.

**Authors:**

**Sergeeva A.V.**, PhD (Medicine), Senior Lecturer of the Department of Epidemiology, Head of Problematic Scientific Laboratory PCR-studies, Scientific Research Institute of Preventive Medicine, Nizhny Novgorod State Medical Academy of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Poslova L.Yu.**, PhD (Medicine), Head of Epidemiological Department of the State Budget Hospital Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Kovalishena O.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Epidemiology, Deputy Director of Science Scientific Research Institute of Preventive Medicine of the Nizhny Novgorod State Medical Academy of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Blagonravova A.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Epidemiology, Director of Scientific Research Institute of Preventive Medicine of the Nizhny Novgorod State Medical Academy of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Epifanova N.V.**, PhD (Biology), Leading Researcher Assistant of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Acad. I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Sashina T.A.**, Junior Researcher, Assistant of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Acad. I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Morozova O.V.**, Junior Researcher, Assistant of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Acad. I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

**Novikova N.A.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Acad. I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.05.2015  
Отправлена на доработку 10.06.2015  
Принята к печати 13.08.2015

Received 20.05.2015  
Revision received 10.06.2015  
Accepted 13.08.2015

# КОРРЕЛЯЦИЯ CD4 ЛИМФОЦИТОВ И ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ С УРОВНЕМ L-ЛИЗИНА ПЛАЗМЫ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ

Е.В. Буторов

КУ ХМАО-Югры Сургутский Центр по профилактике СПИД, г. Сургут, Россия

**Резюме.** *Введение.* Прямое и опосредованное цитопатическое действие ВИЧ, изменение интенсивности и направленности метаболических процессов, развивающийся иммунный дисбаланс и вирусиндуцированная дестабилизация гомеостаза в совокупности формируют полиморфизм клинической симптоматики и полиорганность поражений при ВИЧ-инфекции. В научных источниках представлены данные об увеличении белкового, липидного и основного обмена, азотистого и аминокислотного дисбаланса в асимптоматической стадии заболевания. Дальнейшие исследования метаболических изменений и, в частности, аминокислотного профиля вследствие инфицирования вирусом иммунодефицита человека представляют практический интерес с позиций патофизиологии ВИЧ-инфекции. Целью работы является изучение взаимосвязи иммуносупрессии и увеличения вирусной нагрузки с уровнем L-лизина плазмы у ВИЧ-инфицированных лиц в связи с клиническим течением заболевания. *Материалы и методы.* Образцы венозной крови для определения гематологических и иммунологических показателей, вирусной нагрузки отбирались в пробирки объемом 5 мл, содержащих 1,6 мг/мл K<sup>2</sup> ЭДТА (BD Vacutainer®, США) и исследовались по стандартным методикам. Для определения концентрации L-лизина, венозная кровь центрифугировалась в течение 10 мин (3500 об./мин) для отделения плазмы. Образцы плазмы депротеинизировали 3% раствором сульфосалициловой кислоты и центрифугировали в течение 10 мин (3500 об./мин) для осаждения белков плазмы. Аликвоты супернатанта в объеме 100 мкл переносились в пробирки Эппендорф и хранились при температуре –40°C до проведения исследования методом тонкослойной хроматографии. Образцы цельной крови для определения уровня РНК ВИЧ-1 центрифугировались в течение 10 мин (3500 об./мин), аликвоты плазмы в объеме 1,0 мл переносились в пробирки Эппендорф и хранились при температуре –40°C до проведения исследования. Для определения гематологических и иммунологических параметров цельная венозная кровь исследовалась по стандартным методикам в течение 2 ч в лаборатории центра. Определение уровня РНК ВИЧ-1 выполнено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием коммерческого комплекта с пределом чувствительности 500 копий РНК ВИЧ-1 в мл (АмплиСенс®, ВИЧ-монитор-FRT, Россия), на амплификаторе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (Rotor-Gene Q, QIAGEN, Германия). Лабораторная методика оценки параметров клеточного иммунитета у ВИЧ-позитивных лиц проводилась на проточном цитометре (Coulter® Epics XL, Beckman Coulter, США) по стандартной методике, с определением уровня CD3, CD4, CD8 лимфоцитов в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) с помощью моноклональных антител. Исследование концентрации аминокислоты L-лизина проведено методом тонкослойной хроматографии с фиксацией нингидриновым реагентом и спектрофотометрической детекцией анализируемых субстратов. Для количественной оценки хроматограмм использовано программное обеспечение TLC® Manager 4.00. *Результаты.* В исследовании установлено наличие прямой корреляционной связи

---

**Адрес для переписки:**

Буторов Евгений Владимирович  
628412, Россия, г. Сургут, Тюменская область, а/я 500,  
КУ ХМАО-Югры Сургутский Центр по профилактике СПИД.  
Тел./факс: 8 (3462) 25-47-32.  
E-mail: butorov888@gmail.com

**Contacts:**

Evgeny V. Butorov  
628412, Russian Federation, Surgut, P.O.B. 500, The Municipal  
Center of HIV/AIDS prophylaxis.  
Phone/fax: +7 (3462) 25-47-32.  
E-mail: butorov888@gmail.com

**Библиографическое описание:**

Буторов Е.В. Корреляция CD4 лимфоцитов и вирусной нагрузки с уровнем L-лизина плазмы у ВИЧ-инфицированных больных // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 253–264.  
doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-253-264

**Citation:**

Butorov E.V. Correlation between CD4 lymphocytes, viral load and L-lysine plasma level in HIV-infected patients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 253–264.  
doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-253-264



между количеством CD4 лимфоцитов и уровнем L-лизина плазмы ( $P < 0,01$ ). Соответственно, выявлена обратная корреляционная связь между количеством копий РНК ВИЧ-1 и уровнем L-лизина ( $P < 0,05$ ) в общей когорте больных с ВИЧ-инфекцией. В ходе исследования выявлено снижение уровня L-лизина плазмы у больных в стадиях 4а, 4б, 4в, относительно сравнимых показателей у больных в 3 стадии заболевания и группой доноров ( $P < 0,01$  и  $P < 0,001$  соответственно). Полученные результаты свидетельствуют о наличии аминокислотного дисбаланса у ВИЧ-инфицированных, в частности, достоверного снижения уровня L-лизина плазмы, коррелирующего с основными объективными критериями клинической классификации ВИЧ-инфекции — вирусной нагрузкой и степенью иммуносупрессии. *Обсуждение.* Установлена обратная корреляционная связь между количеством копий РНК ВИЧ-1 и концентрацией L-лизина в плазме. Наиболее низкие показатели уровня аминокислоты выявлены в прогрессирующих стадиях ВИЧ-инфекции на фоне максимальных значений вирусной нагрузки. В то же время, угнетение репликации ВИЧ при приеме противовирусных препаратов сопровождается достоверным увеличением концентрации L-лизина с превышением референсных значений. Максимально низкие значения аминокислоты и количества копий РНК ВИЧ-1 зафиксированы у пациентов с медленным прогрессированием заболевания: «контроллеров» и «медленных прогрессоров», что подтверждает предположение о лимитирующем влиянии L-лизина на интенсивность синтеза вирусных белков и репликации ВИЧ, посредством изменения активности tRNA<sup>Lys</sup>. Результатами настоящего исследования предполагается, что избыток незаменимой аминокислоты увеличивает уровень вирусной нагрузки, патогенетически усугубляя иммуносупрессию и способствуя клиническому прогрессированию заболевания. Дальнейшее изучение метаболических изменений и, в частности, аминокислотного профиля, вследствие инфицирования вирусом иммунодефицита человека, представляется перспективным направлением в создании эффективных методов коррективки возникающих нарушений и контроля ВИЧ-инфекции.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, вирусная нагрузка, CD4 лимфоциты, L-лизин, L-аргинин, ВААРТ.

## CORRELATION BETWEEN CD4 LYMPHOCYTES, VIRAL LOAD AND L-LYSINE PLASMA LEVEL IN HIV-INFECTED PATIENTS

Butorov E.V.

*The Municipal Center of HIV/AIDS prophylaxis, Surgut, Russian Federation*

**Abstract.** *Introduction.* HIV-infection is associated with significant pathological changes of the host metabolic processes, such as energy dysfunction, dyslipidemia, protein catabolic effects and amino acid imbalance, which ultimately form the polymorphism of clinical symptoms of the disease. The significant disturbances of protein and lipid metabolism are widely described in asymptomatic and advanced stage HIV-infected patients, but infection-related amino acid abnormalities is not fully explored. The further research of HIV impact on the host metabolic processes in particular, the plasma amino acid profile, are essential for understanding the pathophysiology of HIV-infection. Our aim was to determine the association between CD4 lymphocytes, viral load and plasma L-lysine levels in clinical stages HIV-infected patients. *Material and methods.* A total of 750 HIV-1-infected males before highly active antiretroviral therapy (HAART) monitored in our center. The patients were classified into four stages of the disease 3, 4a, 4b and 4c, according to the classification system for HIV-infection in Russian Federation (2006). Quantitative HIV-1 RNA assay was performed using (RT-PCR) reverse-transcriptase polymerase chain reaction. The plasma L-lysine levels were assessed by thin layer chromatography (TLC). *Results.* We observed that plasma L-lysine concentrations markedly decreased with the clinical stages of HIV-infection. Low levels of essential amino acid were found in 57% of HIV-infected subjects in the asymptomatic stage (3), 67% and 68% in the advanced stages (4a and 4b, 4c, respectively). Our data revealed that plasma amino acid concentrations were positively correlated with CD4 count lymphocytes ( $P < 0.01$ ) and inversely with HIV viral load ( $P < 0.05$ ) in the total cohort. The mean L-lysine acid levels were significantly lower in advanced stage (4a and 4b, 4c) HIV-infected patients than in controls and asymptomatic stage (3) patients ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively). *Conclusion.* There was evidence of the association between plasma L-lysine and HIV-1 RNA level, immunological markers and clinical stages of HIV-infection among the entire cohort. The results show that advanced stages of HIV-infection are characterized by significant changes in plasma L-lysine concentrations with the disease stages of HIV-infection. Levels of this basic amino acid negatively correlating with viral load and inversely with CD4 count lymphocytes. These findings are important for understanding the pathophysiology of HIV-infection and the development of new approaches in the treatment. Although the mechanism is at present conjectural, the influence of plasma L-lysine on the HIV-1 RNA levels must be considered and remains to be proved.

**Key words:** HIV-infection, viral load, CD4 lymphocytes, L-lysine, L-arginine, HAART.

## Введение

Эпидемия ВИЧ/СПИД продолжает оставаться одной из глобальных проблем здравоохранения. По данным UNAIDS, более 35,3 млн людей инфицированы ВИЧ в настоящее время. Несмотря на оптимистичные заявления о снижении на 33% новых случаев ВИЧ-инфекции за последнее десятилетие, в 2013 г. зафиксировано около 2,1 млн новых случаев инфицирования и более 1,6 млн человек умерли вследствие ВИЧ/СПИД [12].

Актуальность проблемы требует разработки эффективных вакцин, лекарств, поиска новых методов и подходов по контролю ВИЧ-инфекции. Решение этого вопроса требует дальнейшего изучения биологии вируса, как с позиций его взаимодействия с клетками иммунной системы, так и патогенеза системных метаболических нарушений в инфицированном организме.

В научной литературе представлены данные о существенных изменениях показателей липидного, белкового обмена и азотистого равновесия [1, 7, 14, 27] при прогрессировании ВИЧ-инфекции. Имеющиеся сведения о наличии аминокислотного дисбаланса противоречивы и отражены в единичных публикациях [2, 6, 9, 15, 17].

В то же время, метаболические нарушения при различных патологических состояниях [3, 20, 22, 23, 26, 28] ведут к модификации аминокислотного профиля на уровне организма. Ключевая роль влияния экстрацеллюлярной концентрации аминокислот на жизненный цикл и репликацию ряда вирусов не вызывает сомнений [4, 10, 11, 16, 19, 29]. Опубликованные данные свидетельствуют, что дисбаланс аминокислот увеличивает вероятность темпов прогрессирования вирусной инфекции посредством негативного изменения показателей белковой составляющей гомеостаза. Использование аминокислотного профиля приемлемо как в качестве маркера динамики прогрессирования инфекционного процесса, так и с позиций коррекции метаболических нарушений в инфицированном организме [18].

Общеизвестно, что на формирование вирусных частиц, в первую очередь, оказывает влияние наличие достаточного фонда свободных субстратов белкового обмена — аминокислот инфицированной клетки. Репликация вируса требует значительных пластических и энергетических ресурсов клетки-хозяина, что в конечном итоге приводит к качественному и количественному смещению синтеза клеточных белков в сторону репродукции протеинов вируса и изменению интра- и экстрацеллюлярного уровня аминокислот в зависимости от интенсивности и длительности инфекционного процесса [21, 25].

Аминокислоты являются не только основой белкового синтеза в патогенезе вирусной инфекции, но и выступают в качестве регуляторов экспрессии генов через механизм аминокислотной регуляции факторов транскрипции [5, 13, 24]. Данный алгоритм является ключевым в патогенезе вируса иммунодефицита человека и подробно представлен в научных источниках. Модификация одноцепочечной геномной ВИЧ РНК в двухцепочечную ДНК посредством обратной транскриптазы является частью механизма репликации в жизненном цикле ретровируса. Но именно инициация обратной транскрипции возможна только при наличии в клетке активированной лизиновой транспортной РНК (tRNA<sup>Lys</sup>), являющейся праймером обратной транскриптазы ВИЧ [8].

Наличие достаточной концентрации эссенциальной аминокислоты L-лизина в инфицированных ВИЧ клетках позволяет активировать tRNA<sup>Lys</sup> и инициировать репликацию вируса. В настоящее время нет научных данных, подтверждающих эффект влияния данной аминокислоты на репродукцию вируса иммунодефицита человека.

Целью нашего исследования является определение возможной прямой взаимосвязи между уровнем репликации ВИЧ-1, маркерами иммуносупрессии и концентрацией L-лизина плазмы.

Предполагается, что аминокислота L-лизин является ключевым элементом в жизненном цикле вируса иммунодефицита человека и недостаток или избыток эссенциального субстрата оказывает влияние на темпы прогрессирования заболевания, вызываемого ВИЧ. Для подтверждения гипотезы определялся уровень L-лизина, вирусная нагрузка и иммунологические маркеры у пациентов в связи с клиническими стадиями ВИЧ-инфекции и в группе больных с медленным прогрессированием заболевания.

## Материалы и методы

*Пациенты.* Для исследования использованы образцы цельной крови 750 ВИЧ-инфицированных мужчин, наблюдаемых в Сургутском центре по профилактике ВИЧ/СПИД. Возрастной диапазон больных — от 21 до 39 лет, средний возраст составил  $34 \pm 5,7$  (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение).

В группы сравнения ВИЧ-инфицированные пациенты отбирались с учетом возраста, стадии заболевания, вероятного периода инфицирования, наличия коинфекций, периода выполнения исследования.

Образцы цельной крови отбирались в ходе рутинного периодического клинического мониторинга гематологических, иммунологических и вирусологических показателей при ВИЧ-инфекции.

650 пациентов, не получающих высокоактивную противоретровирусную терапию (ВААРТ) распределены согласно клинической классификации ВИЧ-инфекции, принятой на территории Российской Федерации (2006 г.): группа I (3 субклиническая стадия); группа II (4а стадия вторичных заболеваний, 6–10 лет с момента заражения) и группа III (4б, 4в стадии вторичных заболеваний, 7–12 лет с момента заражения).

Пациенты с уровнем CD4 лимфоцитов ниже 200 клеток/мкл и вирусной нагрузкой более 1 млн копий/мл исключались из наблюдения.

Группа I: n = 360 (3 субклиническая стадия).

Группа II: n = 210 (4а стадия вторичных заболеваний).

Группа III: n = 80 (4б, 4в стадии вторичных заболеваний).

Группы сравнения: 100 ВИЧ-инфицированных больных, принимающих противовирусную терапию не менее 2 лет, из них 25% пациентов получали нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ) в сочетании с ненуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (ННИОТ), 5% — только препараты группы НИОТ и 70% ВИЧ-инфицированных получали комбинацию препаратов группы ННИОТ и ингибиторы протеазы (ИП). Возрастной диапазон больных — от 24 до 45 лет, средний возраст —  $36 \pm 5,4$  (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение).

Группа ВИЧ-инфицированных больных с медленным прогрессированием заболевания:

1. «контроллеры», пациенты с константным уровнем вирусной нагрузки менее 500 копий/мл и абсолютным количеством CD4 лимфоцитов более 500 клеток/мкл в течение более чем 10 лет после инфицирования ВИЧ (n = 13);
2. «медленные прогрессоры», ВИЧ-инфицированные с уровнем РНК ВИЧ-1 менее 10 000 копий/мл и количеством CD4 лимфоцитов более чем 400 клеток/мкл на протяжении более 7 лет от момента инфицирования вирусом иммунодефицита человека (n = 25).

Референсные значения содержания аминокислоты L-лизина в плазме определены при исследовании крови здоровых доноров (n = 120).

Образцы крови были получены после информированного согласия пациентов.

*Лабораторные исследования.* Образцы венозной крови для определения гематологических и иммунологических показателей, вирусной нагрузки отбирались в пробирки, объемом 5 мл, содержащие 1,6 мг/мл  $K^2$  ЭДТА (BD Vacutainer®, США) и исследовались по стандартным методикам.

Для определения концентрации L-лизина, венозная кровь центрифугировалась в течение 10 мин (3500 об./мин) для отделения плазмы.

Образцы плазмы депротеинизировали 3% раствором сульфосалициловой кислоты и центрифугировали в течение 10 мин (3500 об./мин) для осаждения белков плазмы. Аликвоты супернатанта в объеме 100 мкл переносились в пробирки Эппендорф и хранились при температуре  $-40^\circ C$  до проведения исследования методом тонкослойной хроматографии.

Образцы цельной крови для определения уровня РНК ВИЧ-1 центрифугировались в течение 10 мин (3500 об./мин.), аликвоты плазмы в объеме 1,0 мл переносились в пробирки Эппендорф и хранились при температуре  $-40^\circ C$  до проведения исследования.

Для определения гематологических и иммунологических параметров цельная венозная кровь исследовалась по стандартным методикам в течение 2 ч в лаборатории центра.

Определение уровня РНК ВИЧ-1 выполнено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием коммерческого комплекта с пределом чувствительности 500 копий РНК ВИЧ-1 в мл (АмплиСенс®, ВИЧ-монитор-FRT, Россия), на амплификаторе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (Rotor-Gene Q, QIAGEN, Германия).

Лабораторная методика оценки параметров клеточного иммунитета у ВИЧ-позитивных лиц проводилась на проточном цитометре (Coulter® Epics XL, Beckman Coulter, США) по стандартной методике, с определением уровня CD3, CD4, CD8 лимфоцитов в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) с помощью моноклональных антител.

Исследование концентрации аминокислоты L-лизина проведено методом тонкослойной хроматографии с фиксацией нингидриновым реагентом и спектрофотометрической детекцией анализируемых субстратов. Для количественной оценки хроматограмм использовано программное обеспечение TLC® Manager 4.00.

*Статистический анализ.* Полученные данные обрабатывались общепринятыми методами статистической обработки цифрового материала с определением средних арифметических значений ( $M$ ), среднеквадратических отклонений ( $\sigma$ ), стандартной ошибки средних величин ( $m$ ).

Для сравнения концентрации L-лизина в сравниваемых группах применен t-тест Стьюдента. Корреляция между РНК ВИЧ-1, CD4 и концентрацией аминокислоты оценивалась коэффициентом парной корреляции Пирсона ( $r$ ). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  с.д. (стандартное отклонение), достоверными считали данные при уровне значимости не менее 95% ( $P < 0,05$ ). Статистический анализ проводили с использованием статистического программного пакета Biostat®.

## Результаты

### Уровень аминокислоты L-лизина в образцах плазмы ВИЧ-инфицированных больных

Концентрация L-лизина оценивалась в образцах плазмы пациентов, распределенных в группы согласно клинической классификации ВИЧ-инфекции, и сравнивалась с показателями группы здоровых лиц (доноры). Клинические, иммунологические и вирусологические данные ВИЧ-инфицированных больных и группы контроля представлены в таблице 1.

В ходе исследования установлено, что у 57% пациентов в 3 «субклинической стадии» (I группа), 67 и 68% пациентов в стадиях вторичных заболеваний (4а и 4б, 4в; II и III группа соответственно), содержание аминокислоты в плазме снижено в сравнении со средним референсным значением уровня L-лизина группы здоровых лиц.

Выявлено, что содержание аминокислоты уменьшается в связи с клиническим прогрессированием ВИЧ-инфекции. Средний уровень L-лизина (мкмоль/л) значительно ниже у ВИЧ-инфицированных в прогрессирующих 4а и 4б, 4в стадиях заболевания (II и III группа; 234,3±136,0 и 149,8±110,9) в сравнении с группой контроля (276,2±120,7;  $P < 0,005$  и  $P < 0,001$  соответственно) и группой больных в 3 «субклинической стадии» (261,8±143,7;  $P < 0,01$  и  $P < 0,001$  соответственно).

Достоверной разницы в содержании аминокислоты в плазме ВИЧ-инфицированных из I группы и лиц из группы контроля не выявлено ( $P = 0,50$ ).

В то же время, у 80% (100/80) пациентов, получающих ВААРТ, уровень L-лизина значительно увеличился. Концентрация аминокислоты составила 320,5±114,3, что достоверно выше значений у ВИЧ-инфицированных из II и III групп, не получающих противовирусную терапию ( $P < 0,0001$  и  $P < 0,0001$ ). Также обнаружено достоверное различие содержания L-лизина у пациентов на фоне ВААРТ и контролем ( $P < 0,001$ ).

Исследование образцов плазмы больных с ВИЧ на фоне обострения герпесвирусной инфекции показало низкий уровень аминокислоты (170,8±144,9) в сравнении с референсными значениями ( $P < 0,01$ ).

Полученные данные о содержании аминокислоты L-лизина в образцах плазмы ВИЧ-инфицированных больных и группы контроля представлены в таблице 2.

### Уровень аминокислоты L-лизина и CD4 лимфоцитов

Снижение абсолютного и относительного количества CD4 лимфоцитов на фоне увеличения вирусной репликации являются значимым клиническим маркером прогрессирования ВИЧ-инфекции.

Полученные данные подтверждают развитие иммуносупрессии у ВИЧ-инфицированных больных: в 3 (490,0±230,7), 4а (341,4±240,7) и 4б, 4в (241,5±168,2) стадиях заболевания, абсолютное количество CD4 лимфоцитов (клеток/мкл) имеет достоверную тенденцию к снижению в сравнении с группой контроля (1278,0±235,2;  $P < 0,001$  для всех групп сравнения; t-тест Стьюдента). Отмечено увеличение Т-хелперов в группе пациентов получающих ВААРТ (CD4 = 452,3±212,1).

Абсолютное количество CD8 лимфоцитов также достоверно снижено во всех группах больных, распределенных по клиническим стадиям заболевания в сравнении с группой здоровых лиц (768,0±314,3;  $P < 0,0001$  для всех групп; t-тест Стьюдента).

Максимальные уровни иммуносупрессии (CD4) выявлены у ВИЧ-инфицированных больных на фоне обострения герпесвирусной инфекции и в 4б, 4в (III группа) стадии заболевания (289,3±175,2 и 241,5±168,2 соответственно).

В ходе исследования установлена прямая корреляционная связь между уровнем L-лизина плазмы и абсолютным количеством CD4 лимфоцитов в общей когорте больных с ВИЧ ( $r = 0,19$ ;  $P < 0,008$ ; коэффициент кор-

**ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ, ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ И ГРУППЫ КОНТРОЛЯ**

	Стадии ВИЧ-инфекции (2006)			Контроль (n = 120)
	Группа I (3 стадия) (n = 360)	Группа II (4а стадия) (n = 210)	Группа III (4б, 4в стадия) (n = 80)	
Возраст (годы)	34±5,6	34±5,2	34±5,1	35±4,6
ИМ (кг/м <sup>2</sup> )	22,73±2,54	22,92±3,30	22,12±2,37	22,65±2,91
РНК ВИЧ-1 (копий/мл)	107,600±10,100**	188,600±22,050**	327,200±46,990**	–
CD4 (клеток/мкл)	490,2±230,7* **	341,4±240,7* **	241,5±168,2* **	1278±235,2
CD8 (клеток/мкл)	1098,0±481,4*	1047,2±523,5*	1088,0±394,6*	768,0±314,3
CD4/CD8	0,44±0,19* **	0,34±0,20* **	0,29±0,25* **	1,75±0,18

**Примечание.** \*Пациенты относительно контроля,  $P < 0,05$ ; \*\*пациенты 3, 4а стадии относительно пациентов 4б, 4в стадий,  $P < 0,05$ . Значения представлены как среднее±стандартное отклонение.



**ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ АМИНОКИСЛОТЫ L-ЛИЗИНА В ПЛАЗМЕ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ И ГРУППЫ КОНТРОЛЯ**

ВИЧ-инфицированные больные	L-лизин (мкмоль/л)	Группа контроля (мкмоль/л) (n = 120)	Коэффициент Стьюдента (t)
Общая когорта (n = 650)	215,3±150,4	276,2±120,7	P < 0,041 (Д)
Группа I (3 стадия) (n = 360)	261,8±143,7	276,2±120,7	P = 0,50 (НД)
Группа II (4а стадия) (n = 210)	234,3±136,0	276,2±120,7	P < 0,005 (Д)
Группа III (4б, 4в стадия) (n = 80)	149,8±110,8	276,2±120,7	P < 0,001 (Д)
ВИЧ-инфицированные с обострением герпесвирусной инфекции (n = 14)	170,8±144,9	276,2±120,7	P < 0,01 (Д)
ВИЧ-инфицированные больные, получающие ВААРТ (4а, 4б, 4в стадии) (n = 100)	320,5±114,3	276,2±120,7	P < 0,001 (Д)

**Примечание.** Д — различия считались достоверными при P < 0,05; НД — различия не достоверны. Значения представлены как среднее±стандартное отклонение.

реляции Пирсона). Наиболее сильная корреляция выявлена в группе больных 4б и 4в стадий ( $r = 0,70$ ;  $P < 0,03$ ), отсутствие корреляционной связи не зафиксировано в группе ВИЧ-инфицированных на фоне обострения герпесвирусной инфекции и у пациентов, получающих ВААРТ (табл. 3).

#### Уровень аминокислоты L-лизина и количество копий РНК ВИЧ-1

Полученные данные свидетельствуют об очевидном увеличении уровня РНК ВИЧ-1 в связи с клиническим прогрессированием ВИЧ-инфекции. Средние значения вирусной нагрузки у больных в 4а стадии (II группа) ( $190\,300 \pm 22\,080$  копий/мл) и 4б, 4в (III группа) ( $331\,100 \pm 47\,300$ ) значительно превышают показатели пациентов в 3 стадии (I группа) ( $108\,500 \pm 10\,300$ ,  $P < 0,001$  и  $P < 0,0001$  соответственно; t-тест Стьюдента).

Аналогичная достоверная разница в количестве копий РНК ВИЧ-1 выявлена при сравнении больных, получающих ВААРТ ( $629,8 \pm 96,7$ ), относительно показателей у пациентов из I, II, III группы ( $P < 0,0001$  для всех групп сравнения).

Максимальные уровни вирусной нагрузки зафиксированы у ВИЧ-инфицированных больных с обострением герпесвирусной инфекции ( $1\,075\,300 \pm 653,7$ ).

При сравнении уровня L-лизина плазмы и количества копий РНК ВИЧ-1 у пациентов в группах I, II и III установлена обратная корреляционная связь ( $r = -0,18$ ,  $P < 0,006$ ;  $r = -0,23$ ,  $P < 0,03$  и  $r = -0,48$ ,  $P < 0,006$  соответственно; коэффициент корреляции Пирсона).

Достоверная разница уровней аминокислоты и вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных больных, принимающих противовирусную терапию и на фоне обострения герпесвирусной инфекции ( $P = 0,83$ ) не обнаружена (табл. 4).

При ранжировании пациентов общей когорты по уровню виремии, наиболее сильная обратная корреляционная связь выявлена при вирусной нагрузке от 5000 до 50 000 копий/мл ( $r = -0,42$ ,  $P < 0,0001$ ). Соответственно, менее выраженная обратная корреляционная связь зафиксирована у пациентов при вирусной нагрузке от 5000 до 75 000 копий/мл и от 5000 до 100 000 копий/мл ( $r = -0,29$ ,  $P < 0,002$  и  $r = -0,24$ ,  $P < 0,007$ ). Слабая обратная корреляционная связь обнаружена в группах больных

**ТАБЛИЦА 3. СРАВНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ L-ЛИЗИНА ПЛАЗМЫ И АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА CD4 ЛИМФОЦИТОВ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ**

ВИЧ-инфицированные больные	CD4 лимфоциты (клеток/мкл)	L-лизин (мкмоль/л)	Коэффициент корреляции Пирсона (r)
Общая когорта (n = 650)	356,9±221,3	215,3±150,4	$r = 0,19$ , $P < 0,008$ (Д)
Группа I (3 стадия) (n = 360)	490,2±230,7	261,8±143,7	$r = 0,14$ , $P < 0,049$ (Д)
Группа II (4а стадия) (n = 210)	341,4±240,7	234,3±136,0	$r = 0,21$ , $P = 0,04$ (Д)
Группа III (4б, 4в стадия) (n = 80)	241,5±168,2	149,8±110,8	$r = 0,70$ , $P < 0,03$ (Д)
ВИЧ-инфицированные с обострением герпесвирусной инфекции (n = 14)	284,1±173,2	170,8±144,9	$r = 0,57$ , $P = 0,10$ (НД)
ВИЧ-инфицированные, получающие ВААРТ (4а, 4б, 4в стадии) (n = 100)	452,3±212,1	320,5±114,3	$r = 0,02$ , $P = 0,90$ (НД)

**Примечание.** Д — различия считались достоверными при P < 0,05; НД — различия не достоверны. Значения представлены как среднее±стандартное отклонение.

**ТАБЛИЦА 4. СРАВНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ L-ЛИЗИНА ПЛАЗМЫ И УРОВНЯ РНК ВИЧ-1 У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ**

ВИЧ-инфицированные больные	РНК ВИЧ-1 (копий/мл)	L-лизин (мкмоль/л)	Коэффициент корреляции Пирсона (r)
Общая когорта (n = 650)	209 600±18 700	215,3±150,4	r = -0,14, P < 0,023 (Д)
Группа I (3 стадия) (n = 360)	108 500±10 300	261,8±143,7	r = -0,18, P < 0,006 (Д)
Группа II (4а стадия) (n = 210)	190 300±22 050	234,3±136,0	r = -0,23, P < 0,031 (Д)
Группа III (4б, 4в стадия) (n = 80)	331 100±47 300	149,8±110,8	r = -0,48, P = 0,006 (Д)
ВИЧ-инфицированные пациенты с обострением герпесвирусной инфекции (n = 14)	1 075 300±653,7	170,8±144,9	r = -0,05, P = 0,86 (НД)
ВИЧ-инфицированные больные, получающие ВААРТ (4а, 4б, 4в стадии) (n = 100)	629,8±96,7	320,5±114,3	r = -0,02, P = 0,83 (НД)

**Примечание.** Д — различия считались достоверными при P < 0,05; НД — различия не достоверны. Значения представлены как среднее±стандартное отклонение.

с количеством копий РНК ВИЧ-1 от 5000 до 500 000 в мл и от 5000 до 1 млн в мл (r = -0,15, P < 0,03 и r = -0,12, P < 0,04, соответственно) (табл. 5, рис. 1).

Результаты исследования свидетельствуют о наличии очевидной связи между вирусной нагрузкой, количеством CD4 лимфоцитов и уровнем аминокислоты L-лизина у ВИЧ-инфицированных больных в 3, 4а и 4б, 4в клинических стадиях заболевания (рис. 2).

#### Уровень аминокислоты L-лизина в образцах плазмы ВИЧ-инфицированных с медленным прогрессированием заболевания

Из общего массива пациентов, наблюдаемых в «Центре по профилактике ВИЧ/СПИД», в группу «контроллеров» отобраны 13 ВИЧ-инфицированных больных на основании следующих критериев: постоянный уровень вирусной нагрузки менее 500 копий/мл и абсолютное количество CD4 лимфоцитов более 500 клеток/мкл в течение более чем 10 лет после инфицирования ВИЧ. В группу «медленных прогрессоров» включены 25 пациентов с по-

стоянным уровнем РНК ВИЧ-1 менее 10 000 копий/мл и количеством CD4 лимфоцитов более чем 400 клеток/мкл на протяжении более 7 лет от момента инфицирования вирусом иммунодефицита человека.

В группы сравнения включены 100 больных («классические прогрессоры»), имеющие положительный ВИЧ-статус более 5 лет и 120 доноров.

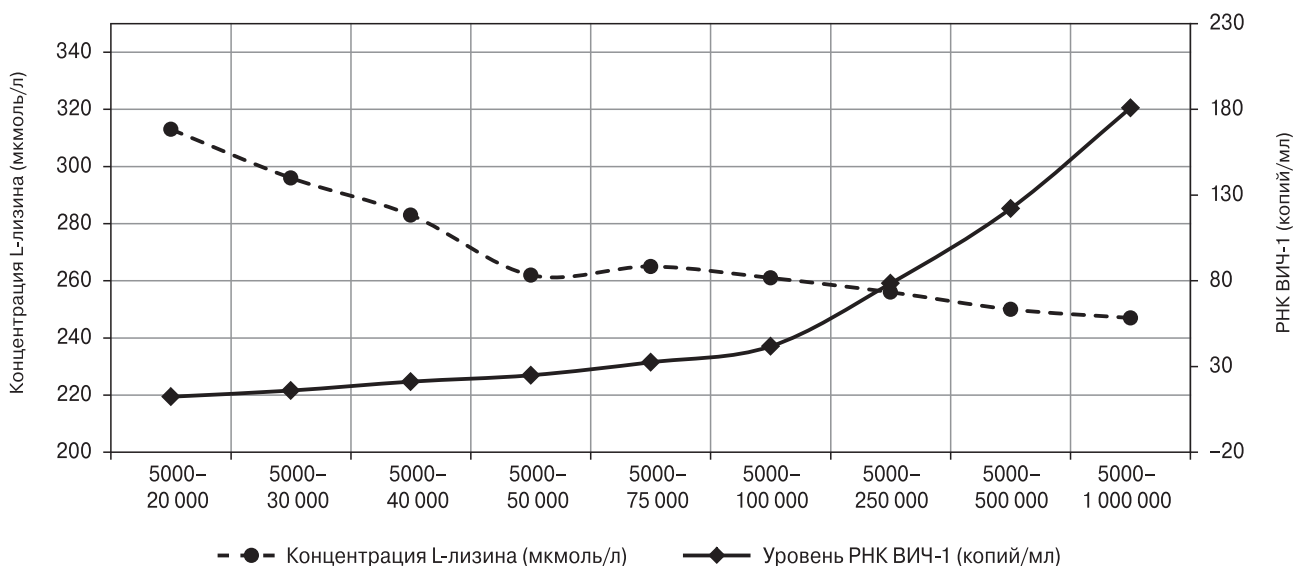
В ходе исследования проведена оценка уровня L-лизина плазмы, вирусной нагрузки и количества CD4 лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных из группы «контроллеров», «медленных прогрессоров» в сравнении с «классическими прогрессорами» и здоровыми лицами.

Среднее значение копий РНК ВИЧ-1 в группе «контроллеров» составило 550,3±135,8 в мл, у «медленных прогрессоров» вирусная нагрузка выше, 2635±837,4 копий/мл, и у пациентов из группы сравнения зафиксировано максимальное значение — 188 700±147 300 копий/мл. Абсолютное количество CD4 лимфоцитов в группах сравнения распределено в нисходящем порядке: «контроллеры» — 550,1±123,9 клеток/мкл,

**ТАБЛИЦА 5. СРАВНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ L-ЛИЗИНА ПЛАЗМЫ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ, РАНЖИРОВАННЫХ ПО УРОВНЮ РНК ВИЧ-1**

Уровень РНК ВИЧ-1	РНК ВИЧ-1 (копий/мл)	L-лизин (мкмоль/л)	Коэффициент корреляции Пирсона (r)
5000–20 000 (n = 42)	12 400±4432	314,3±150,6	r = -0,35, P < 0,028 (Д)
5000–30 000 (n = 57)	15 990±7155	292,1±151,7	r = -0,32, P < 0,018 (Д)
5000–40 000 (n = 72)	21 190±11 960	284,8±154,20	r = -0,35, P < 0,003 (Д)
5000–50 000 (n = 77)	24 900±14 870	261,7±134,2	r = -0,43, P < 0,0001 (Д)
5000–75000 (n = 108)	32 480±23 070	265,2±156,0	r = -0,29, P < 0,002 (Д)
5000–100 000 (n = 123)	41 790±35 000	261,4±154,8	r = -0,24, P < 0,007 (Д)
5000–250 000 (n = 162)	78 490±76 600	256,1±151,3	r = -0,16, P < 0,048 (Д)
5000–500 000 (n = 188)	122 100±133 500	250,1±150,9	r = -0,15, P < 0,035 (Д)
5000–1 000 000 (n = 257)	180 900±263 600	247,2±142,5	r = -0,12, P < 0,040 (Д)

**Примечание.** Д — различия считались достоверными при P < 0,05; НД — различия не достоверны. Значения представлены как среднее±стандартное отклонение.



**Рисунок 1. Концентрация L-лизина плазмы у ВИЧ-инфицированных больных, ранжированных по уровню РНК ВИЧ-1**

«медленные прогрессоры» —  $477,2 \pm 326,8$  клеток/мкл, у «классических прогрессоров» выявлено наименьшее количество CD4 лимфоцитов —  $354,0 \pm 198,5$  клеток/мкл.

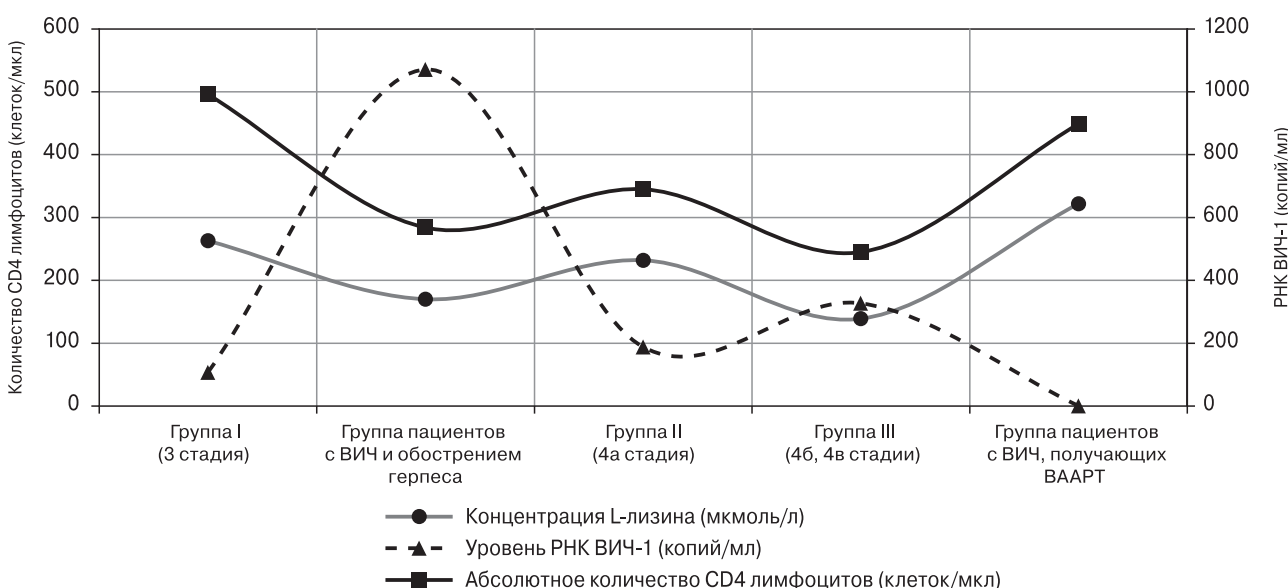
У 75% (13/9) ВИЧ-инфицированных «контроллеров», 60% (25/15) «медленных прогрессоров» и 66% (100/66) «классических прогрессоров» содержание аминокислоты в плазме снижено в сравнении со средним референсным значением уровня L-лизина.

Концентрация аминокислоты достоверно ниже в группе «контроллеров» и «медленных прогрессоров» в сравнении с показателями ВИЧ-инфицированных из группы «классичес-

ких прогрессоров» ( $P < 0,0001$  и  $P < 0,007$  соответственно; t-тест Стьюдента) и доноров ( $P < 0,0001$  и  $P < 0,01$  соответственно).

Средний уровень L-лизина плазмы у ВИЧ «контроллеров» практически соответствует значениям группы здоровых лиц ( $P = 0,18$ ).

Таким образом, максимально низкие уровни аминокислоты и наиболее высокие абсолютные значения CD4 лимфоцитов выявлены у ВИЧ «контроллеров» и «медленных прогрессоров» относительно ВИЧ-инфицированных «классических прогрессоров» и контроля. Соответственно, максимальная вирусная нагрузка зафиксирована в группе «классических прогрессоров».



**Рисунок 2. Корреляция L-лизина плазмы, уровня РНК ВИЧ-1 и абсолютного количества CD4 лимфоцитов в связи с клиническими стадиями ВИЧ-инфекции**

Уровень L-лизина плазмы, иммунологические и вирусологические показатели ВИЧ-инфицированных больных с медленным прогрессированием заболевания представлены в таблице 6.

## Обсуждение

Данное исследование выполнено с целью подтверждения гипотезы о наличии взаимосвязи между уровнем несинтезируемой в организме человека аминокислоты L-лизина и количеством копий РНК ВИЧ-1.

Предполагается, что недостаток или избыток данного незаменимого субстрата белкового обмена может оказывать определенное участие в регулировании процесса репликации ВИЧ и тем самым способствовать прогрессированию заболевания. Постоянный синтез вирусных белков требует огромного расхода аминокислотного фонда, что в конечном итоге приводит к вирусиндуцированному метаболическому дисбалансу и дестабилизации гомеостаза инфицированного организма.

Согласно выдвинутой гипотезе, L-лизин является ключевым элементом в жизненном цикле вируса иммунодефицита человека и затрагивает уязвимый в механизме репликации ВИЧ этап, связанный с инициацией транскрипции РНК вируса через активацию праймера обратной транскриптазы (tRNA<sup>Lys</sup>). В то же время общеизвестно, что активность tRNA<sup>Lys</sup> зависит, в том числе, от присутствия в интрацеллюлярной среде достаточного количества ковалентной аминокислоты.

Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют о наличии достоверного изменения содержания L-лизина у ВИЧ-инфицированных больных в связи с клиническим течением заболевания, что подтверждает выдвинутую ранее гипотезу. Концентрация аминокислоты в плазме достоверно снижена у пациентов, не принимающих противовирусную терапию, в прогрессирующих стадиях 4а, 4б и 4в ВИЧ-инфекции. Соответственно, определена достоверная обратная корреляционная

связь уровня L-лизина плазмы и вирусной нагрузки и прямая корреляция с абсолютным количеством CD4 лимфоцитов.

Основываясь на результатах исследования можно постулировать, что избыток или недостаток концентрации эссенциального для организма человека L-лизина, влияет на интенсивность синтеза вирусных белков и репликации ВИЧ, что патогенетически влечет усугубление иммуносупрессии и способствует клиническому прогрессированию ВИЧ-инфекции.

Данные выводы подтверждаются, на первый взгляд, парадоксальными результатами исследования уровня L-лизина у больных с медленным прогрессированием заболевания. Концентрация аминокислоты в плазме у ВИЧ «контроллеров» и «медленных прогрессоров» достоверно снижена на фоне максимально низких показателей вирусной нагрузки, в то время как при классическом течении заболевания зафиксирована достоверная обратная корреляционная связь между уровнем L-лизина и количеством копий РНК ВИЧ.

Полученные данные можно объяснить наличием определенных ограничивающих механизмов у «контроллеров» и «медленных прогрессоров» и/или дефицитом несинтезируемой аминокислоты, лимитирующей как синтез вирусных белков, так и инициацию репликации вируса посредством изменения активности tRNA<sup>Lys</sup>.

Поступление в организм ВИЧ-инфицированных больных физиологически адекватного или избыточного уровня L-лизина создает необходимый резерв для стабильного увеличения репродукции вирусных частиц на фоне снижения уровня аминокислоты в плазме. Теоретически, снижение вирусной нагрузки будет способствовать увеличению концентрации аминокислоты, что подтвердилось результатами исследования. Выявлено, что угнетение репликации вируса у пациентов, принимающих противовирусные препараты, сопровождается значительным увеличением фонда L-лизина в плазме с превышением референсных значений.

**ТАБЛИЦА 6. СРАВНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ L-ЛИЗИНА ПЛАЗМЫ, УРОВНЯ РНК ВИЧ-1 И АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА CD4 ЛИМФОЦИТОВ У ВИЧ «КОНТРОЛЛЕРОВ», «МЕДЛЕННЫХ ПРОГРЕССОРОВ» И «КЛАССИЧЕСКИХ ПРОГРЕССОРОВ»**

	ВИЧ «контроллеры» (n = 13)	ВИЧ «медленные прогрессоры» (n = 25)	ВИЧ «классические прогрессоры» (n = 100)	Контроль (n = 120)
L-лизин (мкмоль/л)	162,4±116,3* **	221,2±130,8* **	237,0±145,3	276,2±120,7
РНК ВИЧ-1 (копий/мл)	550,3±135,8*	2635±837,4*	188 700±147 300	–
CD4 лимфоциты (клеток/мкл)	550,1±123,9* **	477,2±326,8* **	354,0±198,5**	1278±235,2

**Примечание.** \*ВИЧ «контроллеры», «медленные прогрессоры» относительно «классических прогрессоров», P < 0,01; \*\*ВИЧ «контроллеры», «медленные прогрессоры» относительно контроля, P < 0,01. Значения представлены как среднее±стандартное отклонение.



Общеизвестно, что при инфекционной патологии различного генеза происходят существенные изменения интенсивности и направленности метаболических процессов, связанные с преобладанием катаболизма белков над их синтезом, развитием отрицательного азотистого баланса, активацией процессов гликогенолиза и глюконеогенеза, нарушениями внутриклеточного обмена аминокислот [4, 10, 11, 16, 19, 29]. Возникающий метаболический дисбаланс вследствие внедрения и паразитирования инфекционного агента является неспецифическим защитным механизмом стабилизации гомеостаза и оптимального функционирования физиологических систем организма [1, 9, 14, 25]. Клинический мониторинг метаболических изменений в динамике инфекционного процесса представляет практический интерес с позиций патофизиологии для корректировки возникающих нарушений и создания эффективных терапевтических методов контроля заболевания.

В научных источниках встречаются данные об изменении аминокислотного профиля при различных патологических состояниях, в том числе при ряде инфекционных заболеваний [3, 20, 22, 23, 26, 28]. Дисбаланс аминокислот в связи с ВИЧ-инфекцией малоизучен и представлен единичными и противоречивыми сведениями [2, 6, 9, 15, 17], в то же время значимость мониторинга аминокислотного спектра в патогенетическом аспекте заболевания не вызывает сомнений. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о наличии, в частности, достоверных изменений концентрации L-лизина в связи с клиническим течением ВИЧ-инфекции.

В ходе исследования установлено, что у 57% пациентов в 3 «субклинической стадии» и у 68% пациентов в 4а и 4б, 4в стадиях вторичных заболеваний, содержание аминокислоты в плазме снижено в сравнении показателем группы здоровых лиц. Существенное снижение уровня L-лизина ниже референсного минимума (144 мкмоль/л) зафиксировано в 32% исследованных образцов плазмы ВИЧ-инфицированных больных, в то время как у 80% пациентов, принимающих противовирусную терапию, концентрация аминокислоты достоверно увеличилась.

Влияние факторов питания на выявленные колебания уровня L-лизина плазмы нивелировано константными показателями индекса массы тела в сравниваемых группах пациентов. Снижение концентрации аминокислоты в связи с клиническим течением ВИЧ-инфекции обусловлены в первую очередь достоверным вирусспецифическим воздействием на внутриклеточный обмен L-лизина.

Общеизвестно, что снижение веса при прогрессирующих стадиях заболевания происхо-

дит в первую очередь за счет потери мышечной массы. На фоне колоссальных объемов синтеза вирусных протеинов происходит хроническое компенсаторное пополнение фонда несинтезируемых аминокислот из внутренних резервов организма [1, 3, 14, 20, 22, 27], что с течением времени приводит к существенному изменению аминокислотного профиля и дестабилизации гомеостаза на поздних стадиях ВИЧ-инфекции.

В то же время в научной литературе имеются сведения о влиянии дефицита эссенциальных субстратов белкового синтеза в экстрацеллюлярной среде на ингибирование и/или абортирование репликации в некоторых вирусных системах [3, 20, 22, 23, 26, 28]. Нарушения в структуре капсида и недостаток вирусных нуклеиновых кислот выявлены у реовируса и ряда других вирусов [4, 10, 11, 16, 19, 29]. Отсутствие аминокислоты L-лизина в клеточных культурах не приводило к полному прекращению репродукции реовируса, но способствовало образованию значительного количества дефектных вирусных частиц, свободных от вирусной нуклеиновой кислоты [16]. При добавлении лимитирующей аминокислоты в экстрацеллюлярную среду зафиксировано восстановление репродукции полноценных вирусных частиц.

В то же время в эксперименте с предварительным «аминокислотным голоданием» клеточной культуры и последующей инокуляции вируса, выявлено значительное усиление ингибирующего эффекта дефицита лимитирующей аминокислоты на вирусную репликацию. Формирование вирусных частиц было полностью прекращено, за исключением синтеза ряда капсидных белков.

На основании имеющихся сведений о достоверном влиянии качественного и количественного спектра аминокислот на темпы репликации вирусных систем предполагается, что изменение уровня L-лизина может способствовать рецидивированию герпесвирусной инфекции у ВИЧ-инфицированных больных. Данное предположение аргументируется фактом реактивации вируса простого герпеса типа (ВПГ) в связи с увеличением вирусной нагрузки при ВИЧ-инфекции и известным феноменом антагонизма между L-лизином и L-аргинином, лимитирующего репликацию ВПГ.

Результаты настоящего исследования подтверждают наличие минимальных значений аминокислоты на фоне максимальной вирусной нагрузки в группе ВИЧ-инфицированных с рецидивирующей герпесвирусной инфекцией. С высокой степенью вероятности можно предположить, что у пациентов с низкой концентрацией L-лизина существует высокий риск рецидива герпесвирусной инфекции.

## Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о наличии аминокислотного дисбаланса у ВИЧ-инфицированных больных, в частности, достоверного снижения уровня L-лизина плазмы, коррелирующего с основными объективными критериями клинической классификации ВИЧ-инфекции — вирусной нагрузкой и степени иммуносупрессии.

Установлена обратная корреляционная связь между количеством копий РНК ВИЧ-1 и концентрацией L-лизина в плазме. Наиболее низкие показатели уровня аминокислоты выявлены в прогрессирующих стадиях ВИЧ-инфекции на фоне максимальных значений вирусной нагрузки. В то же время, угнетение репликации ВИЧ при приеме противовирусных препаратов сопровождается достоверным увеличением концентрации L-лизина с превышением референсных значений. Максимально

низкие значения аминокислоты и количества копий РНК ВИЧ-1 зафиксированы у пациентов с медленным прогрессированием заболевания: «контроллеров» и «медленных прогрессоров», что подтверждает предположение о лимитирующем влиянии L-лизина на интенсивность синтеза вирусных белков и репликации ВИЧ посредством изменения активности tRNA<sup>Lys</sup>.

Результатами настоящего исследования предполагается, что избыток незаменимой аминокислоты увеличивает уровень вирусной нагрузки, патогенетически усугубляя иммуносупрессию и способствуя клиническому прогрессированию заболевания.

Дальнейшее изучение метаболических изменений и, в частности, аминокислотного профиля, вследствие инфицирования вирусом иммунодефицита человека представляется перспективным направлением в создании эффективных методов коррективы возникающих нарушений и контроля ВИЧ-инфекции.

## Список литературы/References

1. Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Терсенов О.А. Биохимические сдвиги и их оценка в диагностике патологических состояний. М.: Медицинская книга, 2002. 318 с. [Byshevskiy A.Sh., Galyan S.L., Tersenev O.A. *Biokhimicheskie sdvigi i ikh otsenka v diagnostike patologicheskikh sostoyanii* [Biochemical changes and their evaluation in the diagnosis of pathological states]. Moscow: Medical book, 2002, 318 p.]
2. Alireza A., Tahereh S. Hyperhomocysteinemia in HIV-infected individuals: correlation of a frequent prothrombotic factor with CD4+ cell count. *Oman. Med. J.*, 2012, vol. 27, no. 3, pp. 224–227. doi: 10.5001/omj.2012.50
3. Beisel W.R., Sawyer W.D., Ryll E.D., Crozier D. Metabolic effects of intracellular infections in man. *Ann. Internal Med.*, 1967, vol. 67, pp. 744–779. doi:10.7326/0003-4819-67-4-744
4. Everitt E., Sundquist B., Philipson L. Mechanism of the arginine requirement for adenovirus synthesis // I. Synthesis of structural protein. *J. Virol.*, 1971, vol. 8, pp. 742–753.
5. Fafournoux P., Bruhat A., Jousse C. Amino acid regulation of gene expression. *Biochem. J.*, 2000, vol. 351, no. 1, pp. 1–12.
6. Fuchs D., Möller A.A., Reibnegger G., Stöckle E., Werner E.R., Wachter H. Decreased serum tryptophan in patients with HIV-1 infection correlates with increased serum neopterin and with neurologic/psychiatric symptoms. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 1990, vol. 3, no. 9, pp. 873–876.
7. Grunfeld C., Feingold K. Metabolic disturbances and wasting in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 1992, vol. 327, no. 5, pp. 329–37. doi:10.1056/nejm199207303270506
8. Guo F., Cen S., Niu M., Javanbakht H., Kleiman L. Specific inhibition of the synthesis of human Lysyl-tRNA synthetase results in decreases in tRNALys incorporation, tRNALys annealing to viral RNA, and viral infectivity in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, 2003, vol. 77, no. 18, pp. 9817–9822.
9. Hortin G.L., Landt M., Powderly W.G. Changes in plasma amino acid concentrations in response to HIV-1 infection. *Clin. Chem.*, 1994, vol. 40, no. 5, pp. 785–789.
10. Ikeda K., Yamasaki H., Suzuki Y., Hajime K.A., Arakawa T. Novel strategy with acidic arginine solution for the treatment of influenza a virus infection (Review). *Exp. Ther. Med.*, 2010, vol. 1, no. 2, pp. 251–256. doi: 10.3892/etm\_00000039
11. Inglis V.B.M. Requirement of arginine for the replication of herpes virus. *J. Gen. Virol.*, 1968, vol. 3, pp. 9–17. doi: 10.1099/0022-1317-3-1-9
12. The GAP Report. *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)*, 2014, 422 p.
13. Kilberg M.S., Hutson R.G., Laine R.O. Amino acid-regulated gene expression in eukaryotic cells. *FASEB J.*, 1994, vol. 8, no. 1, pp. 13–19.
14. Kotler D.P., Tierney A.R., Wang J., Pierson R.N. Magnitude of body-cell-mass depletion and the timing of death from wasting in AIDS. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989, vol. 50, pp. 444–447.
15. Laurichesse H., Tauveron I., Gourdon F., Cormerais L., Champredon C., Charrier S., Rochon C., Lamain S., Bayle G., Laveran H., Thieblot P., Beytout J., Grizard J. Threonine and methionine are limiting amino acids for protein synthesis in patients with AIDS. *J. Nutr.*, 1998, vol. 128, no. 8, pp. 1342–1348.
16. Loh P.C., Oie H.K. Role of lysine in the replication of reovirus: I. Synthesis of complete and empty virions. *J. Virol.*, 1969, vol. 4, no. 6, pp. 890–895.
17. Lukashova E.V., Berezov T.T. L-Lysine alpha-oxidase: physico-chemical and biological properties. *Biochemistry*, 2002, vol. 67, no. 10, pp. 1394–1402.

18. Maeda J., Higashiyama M., Imaizumi A., Nakayama T., Yamamoto H., Daimon T., Yamakado M., Imamura F., Kodama K. Possibility of multivariate function composed of plasma amino acid profiles as a novel screening index for non-small cell lung cancer: a case control study. *BMC Cancer*, 2010, vol. 10, p. 690. doi: 10.1186/1471-2407-10-690
19. Naito T., Irie H., Tsujimoto K., Ikeda K., Arakawa T., Koyama A.H. Antiviral effect of arginine against herpes simplex virus type 1. *Int. J. Mol. Med.*, 2009, vol. 23, no. 4, pp. 495–499. doi: 10.3892/ijmm\_00000156
20. Pisters P.W., Brennan M.F. Amino acid metabolism in human cancer cachexia. Review. *Annu. Rev. Nutr.*, 1990, vol. 10, pp. 107–132. doi: 10.1146/annurev.nu.10.070190.000543
21. Schneider R.J., Shenk T. Impact of virus infection on host cell protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1987, vol. 56, pp. 317–332. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.001533
22. Sherman I.W. Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bull. World Health Organ.*, 1977, vol. 55, no. 2–3, pp. 265–276.
23. Tankersley R.W. Amino acid requirements of herpes simplex virus in human cells. *J. Bacteriol.*, 1964, vol. 87, pp. 609–613.
24. Tisne C., Roques B.P., Dardel F. The annealing mechanism of HIV-1 reverse transcription primer onto the viral genome. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, no. 5, pp. 3588–3595.
25. Wannemacher R.W.Jr. Key role of various individual amino acids in host response to infection. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1977, vol. 30, no. 8, pp. 1269–1280.
26. Wannemacher R.W.Jr., Pekarek J.R., Bartelloni P.J., Vollmer R.T., Beisel W.R. Changes in individual plasma amino acids following experimentally induced sand fly fever virus infection. *Metabolism*, 1972, vol. 21, no. 1, pp. 67–76. doi: 10.1016/0026-0495(72)90021-2
27. Wheeler D.A., Gibert C.L., Launer C.A., Muurahainen N., Elion R.A., Abrams D.I., Bartsch G.E. Weight loss as a predictor of survival and disease progression in HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 1998, vol. 18, pp. 80–85.
28. Wigand R., Kümel G. Amino acid requirement of adenovirus multiplication. *J. Gen. Virol.*, 1978, vol. 39, pp. 281–292. doi: 10.1099/0022-1317-39-2-281
29. Yamasaki H., Tsujimoto K., Koyama A.H., Ejima D., Arakawa T. Arginine facilitates inactivation of enveloped viruses. *J. Pharm. Sci.*, 2008, vol. 97, no. 8, pp. 3067–3073. doi: 10.1002/jps.21224

**Автор:**

**Буторов Е.В.**, к.м.н., врач-эпидемиолог, врач клинической лабораторной диагностики, КУ ХМАО-Югры Сургутский Центр по профилактике СПИД, г. Сургут, Россия.

**Author:**

**Butorov E.V.**, PhD (Medicine), Clinical Epidemiologist, Clinical Pathologist, The Municipal Center of HIV/AIDS Prophylaxis, Surgut, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.10.2014  
Отправлена на доработку 07.01.2015  
Принята к печати 09.07.2015

Received 02.10.2014  
Revision received 07.01.2015  
Accepted 09.07.2015

# НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В К АНАЛОГАМ НУКЛЕОЗ(Т)ИДОВ M204I/V У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В

Е.А. Елпаева, А.Б. Комиссаров, М.М. Писарева, М.П. Грудинин, О.И. Киселев

ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Для лечения хронического гепатита В (ХГВ) широко используются аналоги нуклеоз(т)идов (АН), такие как ламивудин (ЛАМ), телбивудин (ТБВ), адефовир (АДФ), энтекавир (ЭНТ). Однако длительное применение этих препаратов часто приводит к развитию лекарственной устойчивости. Наиболее часто встречаются замены метионина на валин в 204 положении обратной транскриптазы (rtM204V), либо метионина на изолейцин (rtM204I). Раннее выявление мутаций устойчивости к АН имеет большое значение для определения стратегии лечения пациентов с ХГВ. В настоящее время существует много высокочувствительных технологий обнаружения мутаций устойчивости, таких как секвенирование нового поколения, метод обратной гибридизации с использованием олигонуклеотидных зондов (LiPA), масс-спектрометрический метод. Однако эти методы требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, поэтому их использование в клинических лабораториях пока не получило широкого применения. Целью данной работы было разработать простой и точный метод для определения мутации rtM204I/V, основанный на ПЦР в реальном времени. Разработанный метод показал высокую специфичность и чувствительность (1000 копий/мл), он менее трудоемок, не нуждается в дополнительном оборудовании, более быстрый и экономичный в сравнении с другими методами. Мутации устойчивости ВГВ к АН определяли в 5 группах пациентов с ХГВ. Пациенты первой группы получали монотерапию пегилированным интерфероном (n = 12), второй группы — ламивудином (n = 10), третьей группы — телбивудином (n = 7), четвертой группы — энтекавиром (n = 15). В пятую группу вошли пациенты, не получавшие противовирусную терапию (n = 3). Среди обследованных 47 пациентов с ХГВ распространенность мутаций в YMDD-мотиве полимеразы у пациентов, получавших ламивудин, составила 10%, энтекавир — 20%, телбивудин — 28%. У двух пациентов были выявлены последовательности YIDD/YVDD и у одного — YMDD/YIDD. ПЦР-метод обнаружения мутаций устойчивости ВГВ rtM204I/V к АН с детекцией в режиме реального времени может быть использован для первичного скрининга пациентов с ХГВ, не отвечающих на лечение АН. Применение данного метода ограничит число образцов для углубленного изучения первичных и компенсаторных мутаций устойчивости к АН методом секвенирования. При сравнении разработанного метода с широко используемым секвенированием по Сенжеру, данный метод более быстрый, экономичный и способен выявлять минорные варианты популяции ВГВ.

**Ключевые слова:** вирус гепатита В, ПЦР, мутации, секвенирование, хронический гепатит В, аналоги нуклеоз(т)идов.

---

**Адрес для переписки:**

Елпаева Екатерина Александровна  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17,  
ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ.  
Тел.: 8 (921) 584-76-90; 8 (812) 499-15-20.  
E-mail: elpaeva@influenza.spb.ru

**Contacts:**

Ekaterina A. Elpaeva  
197376, Russian Federation, St. Petersburg,  
Professor Popov str., 15/17, Research Institute of Influenza.  
Phone: +7 (921) 584-76-90; +7 (812) 499-15-20.  
E-mail: elpaeva@influenza.spb.ru

**Библиографическое описание:**

Елпаева Е.А., Комиссаров А.Б., Писарева М.М., Грудинин М.П., Киселев О.И. Новый метод определения мутации устойчивости вируса гепатита В к аналогам нуклеоз(т)идов M204I/V у пациентов с хроническим гепатитом В // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 265–272. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-265-272

**Citation:**

Elpaeva E.A., Komissarov A.B., Pisareva M.M., Grudin M.P., Kiselev O.I. New method for determining hepatitis B virus resistance mutations M204I/V to nucleos(t)ide analogues in patients with chronic hepatitis B // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 265–272. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-265-272



## NEW METHOD FOR DETERMINING HEPATITIS B VIRUS RESISTANCE MUTATIONS M204I/V TO NUCLEOS(T)IDE ANALOGUES IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B

Elpaeva E.A., Komissarov A.B., Pisareva M.M., Grudinina M.P., Kiselev O.I.

Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Analogues of nucleos(t)ides (AN) such as lamivudine (LAM), telbivudine (TBV), adefovir (ADP), entecavir (ENT) are widely used for the treatment of chronic hepatitis B (CHB). However, the prolonged treatment using these drugs often leads to the development of drug resistance. The most common substitutions in the reverse transcriptase are methionine for valine (rtM204V), or methionine for isoleucine (rtM204I) at position 204. Early AN-resistant mutations detection is of great importance to determine the treatment strategy of patients with CHB. Currently there are many highly sensitive methods for detection of drug resistance mutations, such as next-generation sequencing, reverse hybridization-based line probe assay (LiPA), mass spectrometry. However, these methods require expensive equipment and reagents, and they are not widely used in clinical laboratories. The aim of this study was to develop a simple and accurate real-time PCR method for detection of rtM204I/V mutation. This method showed high specificity and sensitivity (1000 copies/ml), it is less laborious and does not require additional equipment, fast and cost effective compared to other methods. HBV mutations of resistance to AN were determined in 5 groups of patients with CHB. Patients of the first group received monotherapy with pegylated interferon (n = 12), the second group — lamivudine (n = 10), the third group — telbivudine (n = 7), the fourth group — entecavir (n = 15). The fifth group consisted of patients who did not receive antiviral therapy (n = 3). The frequency of mutations in HBV polymerase YMDD-motif was determined among 47 patients with CHB: it was 10% for lamivudine treated patients, 20% — for entecavir, 28% — for telbivudine. YIDD/YVDD motifs were identified in two patients and YMDD/YIDD — in one patient. Real-time PCR method for the detection of AN-resistant rtM204I/V mutations in HBV polymerase can be used in routine diagnostics for primary screening of patients not responding to AN treatment. The application of this method can reduce the number of samples for in-depth study of primary and compensatory mutations of resistance to AN by sequencing method. The developed method versus Sanger-sequencing is fast, economical, and provides the detection of minor variants of HBV populations.

**Key words:** hepatitis B virus, real-time PCR, mutations, sequencing, chronic hepatitis B, analogues of nucleos(t)ides.

### Введение

Для лечения хронического гепатита В широко используются аналоги нуклеозидов/нуклеотидов (АН), такие как ламивудин (ЛАМ), телбивудин (ТБВ), адефовир, энтекавир (ЭНТ). Однако длительное применение этих препаратов приводит к развитию лекарственной устойчивости [5, 8, 10].

Мутации устойчивости к АН определяются, прежде всего, заменами в высококонсервативном мотиве тирозин—метионин—аспарагиновая кислота—аспарагиновая кислота (YMDD) С-домена полимеразы ВГВ (rt203-206). Наиболее часто встречаются замены метионина на валин в 204 положении обратной транскриптазы (rtM204V), либо метионина на изолейцин (rtM204I) [9, 14]. Раннее выявление мутаций устойчивости к АН имеет большое значение для определения стратегии лечения пациентов с ХГВ [2].

В настоящее время существует много высокочувствительных технологий обнаружения мутаций устойчивости, таких как секвенирование нового поколения [7], метод обратной гибридизации с использованием олигонуклеотидных зондов (LiPA) [11], масс-спектрометрический метод [12], технология микрочипов [6]. Однако эти методы требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, поэтому их использование в клинических лабораториях пока не получило широкого применения. В 2013 году стала доступна отечественная коммерческая тест-система для

выявления мутаций устойчивости к АН «АмплиСенс® HBV-Resist-Seq». Этот метод основан на амплификации фрагмента гена полимеразы с последующим определением нуклеотидной последовательности методом секвенирования по Сенжеру. Однако данный метод имеет ряд недостатков. Во-первых, трудоемкость и использование ДНК-анализатора приводит к высокой конечной стоимости анализа. Во-вторых, невозможность определить минорные варианты популяции вируса, а также присутствие в одном образце различных вариантов ВГВ.

Использование метода ПЦР в реальном времени для выявления мутаций устойчивости в рутинной диагностике оправдано для первичного скрининга пациентов, не отвечающих на лечение АН. Однако для назначения соответствующей терапии у пациентов с заменой rtM204I/V необходимы данные о других заменах в области обратной транскриптазы, что может быть исследовано другими методами [1, 2, 10].

### Материалы и методы

Обследовано 47 пациентов с ХГВ. Мутации устойчивости ВГВ к АН определяли в 5 группах пациентов с ХГВ. Пациенты первой группы получали монотерапию пегилированным интерфероном (PEG-IFN), средний возраст в этой группе составил 38±17,3 лет, соотношение мужчин и женщин — 10 (83%) к 2 (17%); пациенты второй группы [средний возраст 23,9±16,6 лет,

ТАБЛИЦА 1. СХЕМА ОЦЕНКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

Аминокислота Праймаер	Метионин (M, Met)		Изолейцин (I, Ile)		Валин (V, Val)	
	ПЦР(-)	АТН	ПЦР(-)	АТН	ПЦР(+)	ГТН
Pr1	ПЦР(-)	АТН	ПЦР(-)	АТН	ПЦР(+)	ГТН
Pr2	ПЦР(+)	АТГ	ПЦР(-)	АТН	ПЦР(+)	ГТГ
					ПЦР(-)	ГТН

по половому составу: мужчин — 7 (70%), женщин — 3 (30%) принимали ламивудин (ЛАМ), пациенты третьей группы [средний возраст 36,7±14,4 лет, мужчин — 5 (86%), женщин — 1 (14%)] — телбивудин (ТБВ); пациенты четвертой группы [средний возраст 33,8±11,3 лет, мужчин — 10 (67%), женщин — 5 (33%)] — энтекавир (ЭНТ). В пятую группу [средний возраст 43±17 лет, мужчин — 2 (67%), женщин — 1 (33%)] вошли пациенты, не получавшие противовирусную терапию (ПВТ).

**ПЦР в реальном времени.** Для определения мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). При дизайне оригинальных праймеров был модифицирован метод выявления YMDD-мутантов, использующий универсальную матрицу для ПЦР-РВ [4, 13, 15].

Мутации устойчивости к АН определяли при помощи набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green (НПК «СИНТОЛ», Россия). ПЦР смесь (смесь-1) содержит реакционный буфер с SYBR Green, 200 мкМ каждого dNTP, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 ед. Taq-полимеразы, 100 пкМ праймера PrF (5'-АТАСААСАССТГТАТТССС АТСССАТ). Образец ДНК вносили параллельно в 3 пробирки, содержащие смесь-1 и праймеры Pr1 (5'-СССССААТАСССАТСАТСНАС), Pr2 (5'-СССССААТАСССАТСАТСС) и PrC (5'-СССССААТАСССАТСАТС) соответственно. Праймеры Pr1 и Pr2 подобраны таким образом, чтобы выявить замену в YMDD-мотиве гена полимеразы (табл. 1). Праймер PrC является положительным контролем на наличие ДНК ВГВ и не зависит от наличия или отсутствия мутации.

Амплификацию проводили в термоциклере Rotor-Gene (Corbett Research, Австралия). Термальный профиль реакции: 1) начальная денатурация 95°C — 5 мин; 2) 95°C — 15 с, 62°C — 20 с, 62°C — 20 с (измерение флуоресценции на каждом цикле), уменьшение температуры отжига праймеров (Touch Down) с шагом 1°C, 7 циклов; 3) 95°C — 15 с, 55°C — 20 с, 62°C — 20 с (измерение флуоресценции на каждом цикле), 30 циклов. По окончании реакции была построена кривая плавления в диапазоне от температуры отжига праймеров до температуры полной денатурации — примерно 95°C.

Расчет эффективности ПЦР проводили по формуле  $E = 10^{-1/K}$ , где E — показатель эффективности ПЦР, K — угол наклона прямой зависимости разведения ДНК от значения Ct.

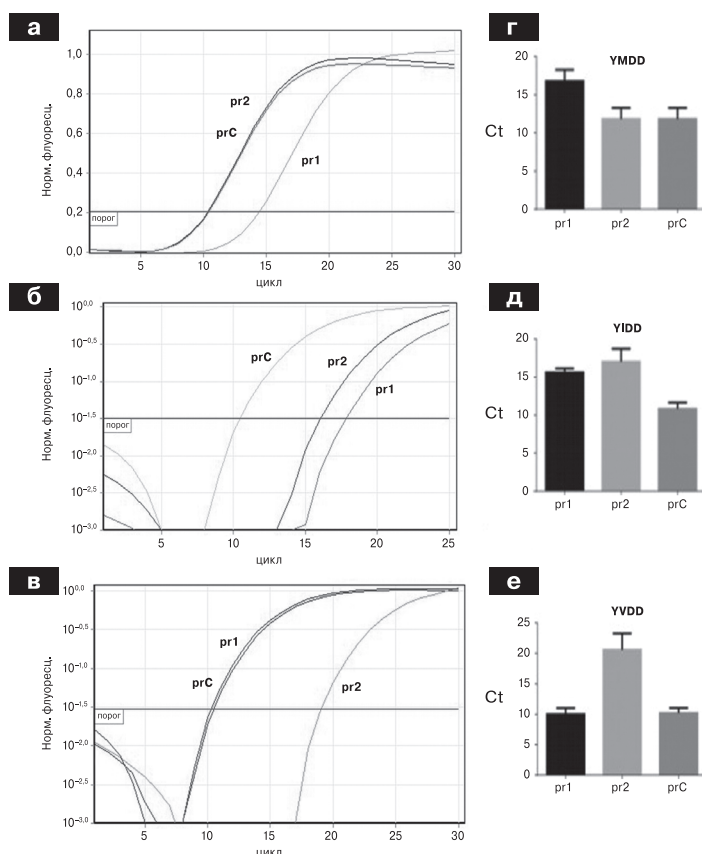
**Клонирование последовательностей ДНК, кодирующих YMDD/YIDD/YVDD-мотивы в вектор pUC18.** Клонирование последовательностей ДНК, кодирующих M, I и V в 204 положении обратной транскриптазы, в вектор pUC18 проводили по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции EcoRI и HindIII. Рестрикционную смесь очищали при помощи коммерческого набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, США). Для проведения реакции лигирования использовали реагенты фирмы «Fermentas» (Литва). Для трансформации плазмидами pUC18-YMDD, pUC18-YVDD и pUC18-YIDD были использованы бактериальные клетки *E. coli* штамм DH5α, который выращивали на питательной среде LB (Luria-Bertani) с ампициллином (50 мкг/мл). Плазмидную ДНК выделяли набором QIAGEN Plasmid Kit (Qiagen, США). Полученную плазмидную ДНК секвенировали методом Сэнжера при помощи праймеров M13F и M13R.

**Секвенирование.** Амплификацию фрагмента генома ВГВ для определения мутаций проводили с помощью оригинальных праймеров (YMDD-F: 5'-СТССААТСАТСАТССААС; YMDD-R: 5'-GGGTТАААТГТАТСССА) методом, разработанным в НИИ гриппа [2]. Анализ и очистку продуктов ПЦР для секвенирования проводили электрофорезом в 2%-ном агарозном геле с добавлением бромида этидия. ДНК из агарозного геля выделяли коммерческим набором QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Секвенирование проводили методом Сэнжера при помощи набора реагентов ABI prism BigDye Terminator v3.1 Kit с использованием оригинальных праймеров на приборе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США). Анализ последовательностей и построение выравниваний проводили с помощью программы Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, США).

## Результаты

### Специфичность метода

Для оценки специфичности праймеров были сконструированы плазмиды pUC18 со вставкой из последовательностей ДНК, кодирующих M, I и V в 204 положении обратной транскриптазы. Наличие вставки в данных плазмидах было подтверждено секвенированием с использованием праймеров M13F и M13R. Расчет статистически достоверной разницы в среднем значении Ct для pUC-18-YMDD [разница достоверна между Pr1 и Pr2 (P = 0,0079), между Pr1 и PrC (P = 0,0079)



**Рисунок 1. Специфичность праймеров для анализа мутаций утойчивости *rtM204I/V* и расчет статистически достоверной разницы в значении *Ct* для *pUC-18-YMDD*, *pUC-18-YIDD* и *pUC-18-YVDD***

**Примечание.** Амплификация плазмид *pUC-18-YMDD* в концентрации  $10^4$  копий/мл (а), *pUC-18-YIDD* в концентрации  $10^3$  копий/мл (б), *pUC-18-YVDD* в концентрации  $10^3$  копий/мл (в). Средние значения *Ct* для *pUC-18-YMDD* (г), для *pUC-18-YIDD* (д), для *pUC-18-YVDD* (е).

и не достоверна между Pr2 и PrC ( $P > 0,9999$ ), *pUC-18-YIDD* [разница достоверна между Pr1 и PrC ( $P = 0,0079$ ), между Pr2 и PrC ( $P = 0,0079$ ) и не достоверна между Pr1 и Pr2 ( $P = 0,1429$ )] и *pUC-18-YVDD* [разница достоверна между Pr1 и Pr2 ( $P = 0,0079$ ), между Pr2 и PrC ( $P = 0,0079$ ) и не достоверна между Pr1 и PrC ( $P > 0,9999$ )] позволил определить положительные результа-

ты ПЦР: для *pUC-18-YMDD*  $\Delta Ct1 \geq 5$ ,  $\Delta Ct2 < 5$ ; для *pUC-18-YIDD*  $\Delta Ct1 \geq 5$ ,  $\Delta Ct2 \geq 5$ ; для *pUC-18-YVDD*  $\Delta Ct1 < 5$ ,  $\Delta Ct2 \geq 5$ , где  $\Delta Ct1 = Ct Pr1 - Ct PrC$ ,  $\Delta Ct2 = Ct Pr2 - Ct PrC$ . Результаты представлены на рисунке 1.

Для оценки специфичности праймеров в образцах, содержащих различные варианты ВГВ, плазмиды *pUC-18-YIDD* и *pUC-18-YVDD* были смешаны с плазмидой *pUC-18-YMDD* («дикий тип») в конечной концентрации  $10^5$  копий/мл (табл. 2). Было показано, что праймеры, выявляющие замену *rtM204V* специфичны, если образец содержит 30 и более процентов плазмиды *pUC-18-YVDD*. В случаях, если образец содержит 10 и менее процентов плазмиды *pUC-18-YVDD* замена *rtM204V* не выявляется, а регистрируется только «дикий» тип вируса. Праймеры, выявляющие замену *rtM204I*, показали аналогичные результаты. Было показано, что в образцах, содержащих три плазмиды: 30% *pUC-18-YIDD*, 30% *pUC-18-YVDD* и 40% *pUC-18-YMDD*, выявлялись три варианта последовательности ВГВ (*rtM204M/I/V*) с преобладанием «мутантных» типов вируса (*rtM204I* и *rtM204V*). В образцах, содержащих 60% *pUC-18-YMDD*, 30% *pUC-18-YVDD* и 10% *pUC-18-YIDD*, регистрировались только последовательности с заменой *rtM204V*

**ТАБЛИЦА 2. ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРАЙМЕРОВ В ОБРАЗЦАХ СО СМЕШАННОЙ ПОПУЛЯЦИЕЙ ВИРУСА**

№	Образец	Итоговый результат
1	50% <i>pUC-18-YVDD</i> + 50% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/V
2	30% <i>pUC-18-YVDD</i> + 70% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/V
3	10% <i>pUC-18-YVDD</i> + 90% <i>pUC-18-YMDD</i>	M
4	50% <i>pUC-18-YIDD</i> + 50% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/I
5	30% <i>pUC-18-YIDD</i> + 70% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/I
6	10% <i>pUC-18-YIDD</i> + 90% <i>pUC-18-YMDD</i>	M
7	30% <i>pUC-18-YIDD</i> + 30% <i>pUC-18-YVDD</i> + 40% <i>pUC-18-YMDD</i>	V/I/M
8	10% <i>pUC-18-YIDD</i> + 30% <i>pUC-18-YVDD</i> + 60% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/V
9	30% <i>pUC-18-YIDD</i> + 10% <i>pUC-18-YVDD</i> + 60% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/I

и «дикий» тип вируса. Аналогично, в образцах, содержащих 60% pUC-18-YMDD, 30% pUC-18-YIDD и 10% pUC-18-YVDD, выявлялись только последовательности с заменой rtM204I и «дикий» тип вируса.

### Чувствительность метода

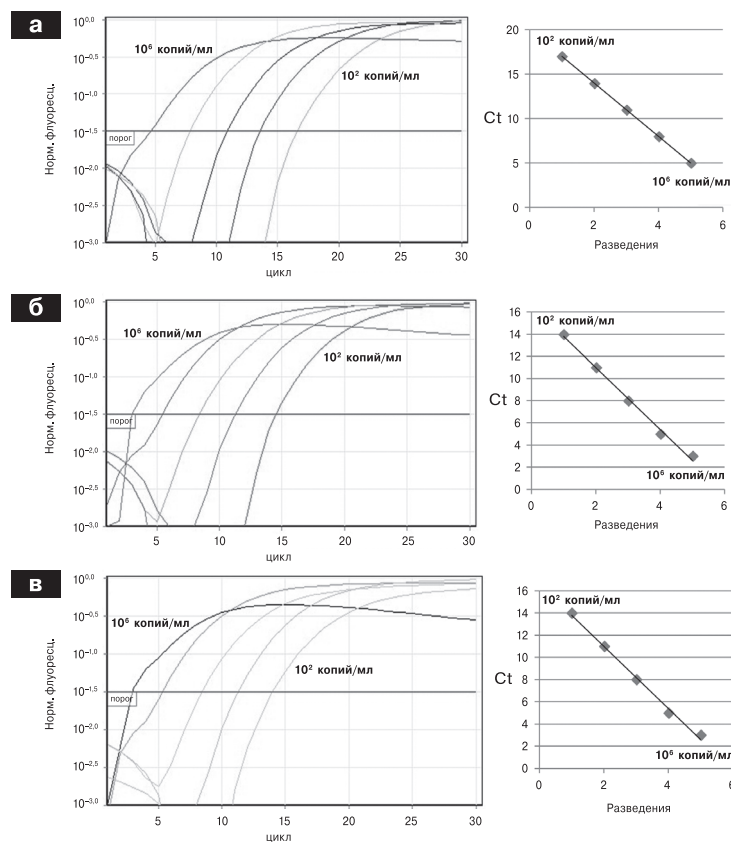
Чувствительность метода ПЦР оценивали с помощью серии разведений плазмид pUC-18-YMDD, pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD до конечных концентраций 1 млн, 100 тыс., 10 тыс., 1 тыс. и 100 копий/мл (пять повторов для каждого разведения). Результаты представлены на рисунках 2–4.

### Расчет эффективности ПЦР

Во всех исследуемых образцах для серии разведений был рассчитан показатель эффективности ПЦР (E). Во всех случаях  $E = 2$ , что подтверждает специфичность данных реакций без образования побочных продуктов или димеров праймеров (рис. 2–4). Отсутствие побочных продуктов также подтверждает анализ кривых плавления для данных реакций (данные не приводятся).

### Сравнение результатов ПЦР и секвенирования по Сенжеру

В сыворотке крови от пациентов первой и пятой групп вирусов, содержащих мутации устойчивости rtM204I/V к АН, выявлено не было (табл. 3). В сыворотке крови от пациентов второй группы у одного человека после 18 месяцев лечения ламивудином были выявлены вирусы с заменой в 204 положении обратной транскриптазы. При этом методом секвенирования по Сенжеру была определена только замена метионина на изолейцин, в то время как методом ПЦР в реальном времени выявлена смесь последовательностей, кодирующих как замену метионина на изолейцин, так и — на валин. Данный пациент после неэффективной терапии ламивудином получал в течение 14 месяцев телбивудин, что привело к выявлению вирусов только с заменой rtM204V обоими методами. Интересно отметить, что через месяц лечения телбивудином у этого пациента методом секвенирования обнаружена субпопуляция ВГВ с заменой rtM204V, в то время как методом ПЦР выявляли ВГВ с заменами метионина и на изолейцин, и на валин. У одного пациента после 58 месяцев лечения ТБВ была



**Рисунок 2. Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды pUC-18-YMDD в концентрациях  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  копий/мл**

**Примечание.** (а) Амплификация с праймерами PrF и Pr1, стандартные кривые:  $Y = -3X + 20$ . Slope = -3.  $R^2 = 1$ .  $E = 2$ .

(б) Амплификация с праймерами PrF и Pr2, стандартные кривые:  $Y = -2,8X + 16,6$ . Slope = -2,8.  $R^2 = 0,99$ .  $E = 2$ .

(в) Амплификация с праймерами PrF и prC, стандартные кривые:  $Y = -2,8X + 16,6$ . Slope = -2,8.  $R^2 = 0,99$ .  $E = 2$ .



обнаружен вирус с заменой rtM204I, причем методом ПЦР кроме «мутантного» был обнаружен и «дикий» тип вируса. Еще через 7 месяцев у данного пациента обоими методами обнаруживался только «мутантный» тип вируса (rtM204I). У трех пациентов четвертой группы были выявлены вирусы, содержащие мутации устойчивости к энтекавиру (rtM204V).

### Обсуждение

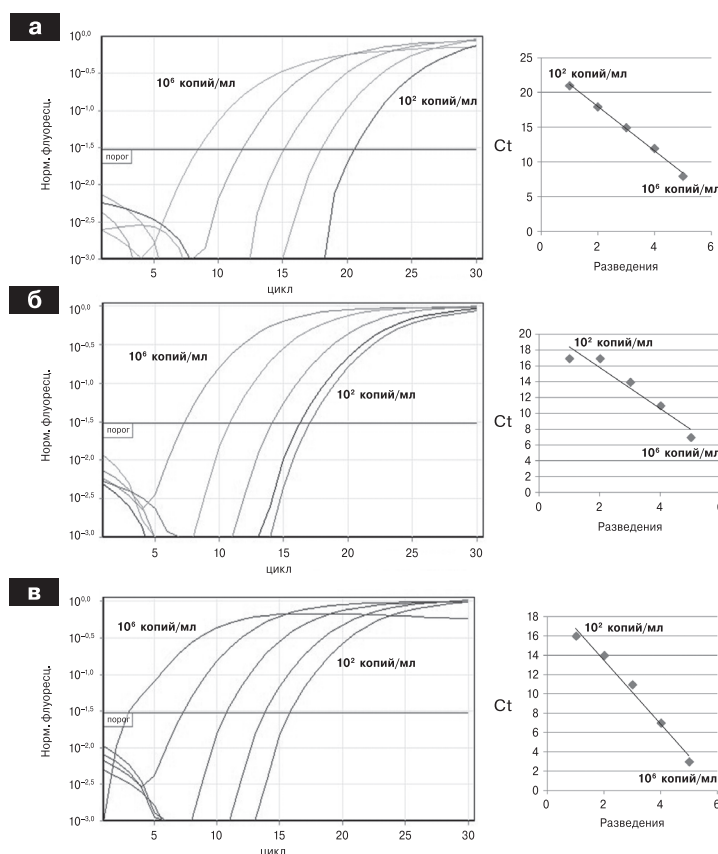
В последние десятилетия в России для лечения ХГВ широко применяются аналоги нуклеозидов (ламивудин, телбивудин и энтекавир). Однако длительная терапия данными препаратами в ряде случаев не была эффективна из-за возникновения мутации устойчивости rtM204I/V, которые разрушают YMDD (тирозин, метионин, аспартат, аспартат) locus в каталитическом центре гена полимеразы и создают стерические препятствия для нужного связывания с АН [3, 10]. Применение аналогов нуклеотидов (адефовир и тенофовир) у пациентов с устойчивостью к ламивудину, телбивудину и энтекавиру показало высокую эффективность [2, 9]. В связи с этим,

раннее выявление мутаций устойчивости к АН имеет большое значение для определения стратегии лечения пациентов с ХГВ.

В последние годы все больше исследований связаны с разработкой новых методов для выявления мутаций устойчивости. К наименее трудоемким, быстрым и доступным методам относятся различные варианты проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [4, 13, 15]. Поэтому был разработан метод, основанный на ПЦР-РВ, для определения мутации устойчивости rtM204I/V.

Разработанный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью (1000 копий/мл) и позволяет определять различные варианты популяции ВГВ. Было показано, что данный метод выявляет «мутантные» варианты вируса, составляющие 30% и более от общей популяции ВГВ.

Общая распространенность мутаций в YMDD-мотиве полимеразы у пациентов, получавших ламивудин, составила 6%, энтекавир — 3%, телбивудин — 20%. У двух из 83 пациентов были выявлены последовательности YMDD/YIDD и у одного человека — YIDD/YVDD.



**Рисунок 3. Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды pUC-18-YIDD в концентрациях  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  копий/мл**

**Примечание.** (а) Амплификация с использованием праймеров PrF и Pr1, стандартные кривые:  $Y = -2,2X + 24,4$ . Slope =  $-3,2$ .  $R^2 = 0,99$ . E = 2. (б) Амплификация с использованием праймеров PrF и Pr2, стандартные кривые:  $Y = -2,6X + 21$ . Slope =  $-2,6$ .  $R^2 = 0,93$ . E = 2. (в) Амплификация с использованием праймеров PrF и prC, стандартные кривые:  $Y = -3,3X + 20,1$ . Slope =  $-3,3$ .  $R^2 = 0,98$ . E = 2.

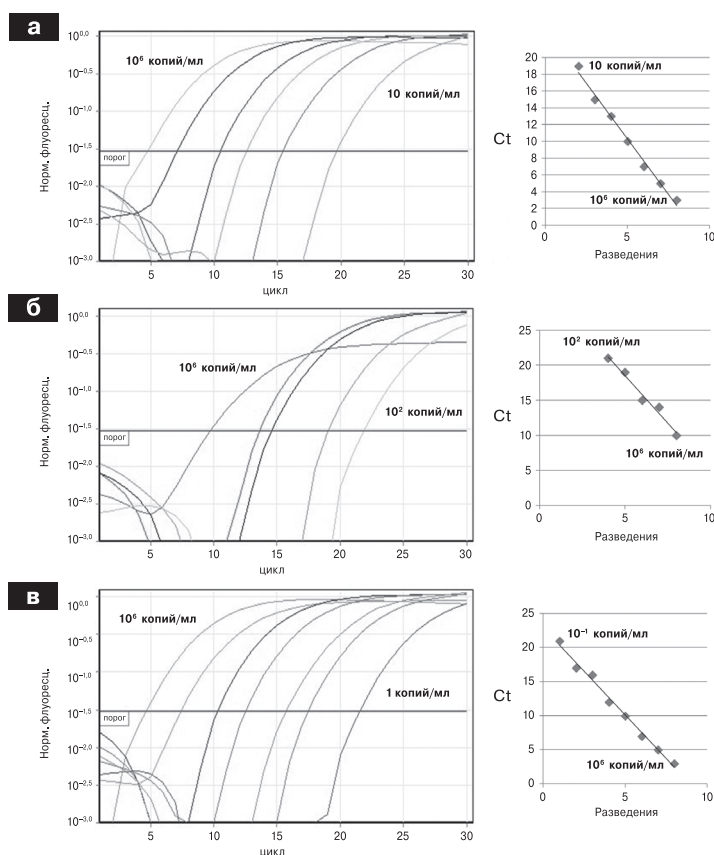
Предложенный метод не позволяет дифференцировать последовательности для прямого определения rtM204I. В дальнейшем данный метод может быть модифицирован для обнаружения YIDD путем добавления праймеров в смесь-1. Преимуществом данного метода является простота анализа. Выявление последовательностей ВГВ с заменой rtM204V может быть рассчитано по разнице между Ct значения образца (Pr1) и контроля (PrC) без дополнительных количественных стандартов. Неспецифический отжиг праймеров, как рассчитано выше, исключается при значениях  $\Delta Ct < 5$ .

## Заключение

Метод обнаружения мутаций устойчивости ВГВ rtM204I/V к АН при помощи ПЦР в реальном времени — быстрый и точный инструмент для первичного скрининга пациентов с ХГВ, не отвечающих на лечение. При сравнении разработанного метода с широко используемым секвенированием по Сенжеру, данный метод более быстрый, экономичный и способен выявлять минорные варианты популяции ВГВ.

**ТАБЛИЦА 3. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ У БОЛЬНЫХ ХГВ**

	Замена rtM204I/V методом секвенирования по Сенжеру (n, %)	Замена rtM204I/V методом ПЦР в реальном времени (n, %)
Группа I PEG-IFN, n = 12	M (12, 100%)	M (12, 100%)
Группа II ЛАМ, n = 10	M (9, 90%)	M (9, 90%)
	I (1, 10%)	V/I (1, 10%)
Группа III ТБВ, n = 7	M (5, 72%)	M (5, 72%)
	I	I/M
	(1, 14%)	I
	(1, 14%)	(1, 14%)
Группа IV ЭНТ, n = 15	M (12, 80%)	M (12, 80%)
	V (3, 20%)	V (3, 20%)
Группа V без ПВТ, n = 3	M (3, 100%)	M (3, 100%)



**Рисунок 4. Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды pUC-18-YVDD в концентрациях  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ ,  $10^{-1}$  копий/мл**

**Примечание.** (а) Амплификация с праймерами PrF и Pr1, стандартные кривые:  $Y = -2,6X + 23,5$ . Slope = -2,6.  $R^2 = 0,99$ . E = 2.  
(б) Амплификация с праймерами PrF и Pr2, стандартные кривые:  $Y = -2,7X + 32$ . Slope = -2,7.  $R^2 = 0,97$ . E = 2.  
(в) Амплификация с праймерами PrF и prC, стандартные кривые:  $Y = -2,6X + 22,9$ . Slope = -2,6.  $R^2 = 0,99$ . E = 2.

## Список литературы/References

1. Елпаева Е.А., Порецкова Е.А., Ковеленов А.Ю., Аликян И.С., Гальбрайт Р.Б., Грудинин М.П., Эсауленко Е.В. Генотипическая характеристика вируса гепатита В у хронически инфицированных больных // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2009. № 15. С. 56–59. [Elpaeva E.A., Poretzkova E.A., Kovelenov A.Yu., Alikyan J.S., Galbraikh R.B., Grudin M.P., Esaulenko E.V. Genotypic characterization of the hepatitis B virus in chronically infected patients. *Dal'nevostochnyi zhurnal infektsionnoi patologii = Far Eastern Journal of Infection Pathology*, 2009, no. 15, pp. 56–59. (In Russ.)]
2. Елпаева Е.А., Писарева М.М., Никитина О.Е., Кижло С.Н., Грудинин М.П., Дуданова О.П. Роль мутантных форм вируса гепатита В в прогрессирующем течении хронического гепатита В // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. Естественные и технические науки. 2014. Т. 143, № 6. С. 41–46. [Elpaeva E.A., Pisareva M.M., Nikitina O.E., Kizhlo S.N., Grudin M.P., Dudanova O.P. The role of the mutant forms of hepatitis B virus in the progressive course of chronic hepatitis B. *Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye i tekhnicheskie nauki = Scientific Notes of Petrozavodsk State University. Natural and Engineering Sciences*, 2014, vol. 143, no. 6, pp. 41–46. (In Russ.)]
3. Dandri M., Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut*, 2012, vol. 61, no. 1, pp. 6–17. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302056
4. Feng Z.L., Yu X.Y., Lu Z.M., Geng D.Y., Zhang L., Chen S.J. Rapid detection of the hepatitis B virus YMDD mutant using AllGlo™ probes. *Clin. Chim. Acta.*, 2011, vol. 412, iss. 11–12, pp. 1018–1021. doi: 10.1016/j.cca.2011.02.012
5. Gao S. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. *World J. Hepatol.*, 2015, vol. 7, no. 8, pp. 1086–1096. doi: 10.4254/wjh.v7.i8.1086
6. Hua W., Zhang G., Guo S., Li W., Sun L., Xiang G. Microarray-based genotyping and detection of drug-resistant HBV mutations from 620 Chinese patients with chronic HBV infection Brazilian. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 19, no. 3, pp. 291–295. doi: 10.1016/j.bjid.2015.03.012
7. Ko S.-Y., Oh H.-B., Park C.-W., Lee H.C., Lee J.-E. Analysis of hepatitis B virus drug-resistant mutant haplotypes by ultra-deep pyrosequencing. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 10, pp. 404–411. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03951.x
8. Lin C.-L., Kao J.-H. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2015, vol. 5, no. 5, pp. a021436–a021436. doi: 10.1101/cshperspect.a021436
9. Locarnini S., Yuen L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. *Antivir. Ther.*, 2010, vol. 15, no. 3, pp. 451–461. doi: 10.3851/IMP1499
10. Locarnini S., Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection. *Antivir. Ther.*, 2010, vol. 15, no. 3, pp. 3–14. doi: 10.3851/IMP1619
11. Niesters H.G.M., Zoulim F., Pichoud C., Buti M., Shapiro F., D'Heuvaert N., Celis L., Doutreloigne J., Sablon E. Validation of the INNO-LiPA HBV DR assay (version 2) in monitoring hepatitis B virus-infected patients receiving nucleoside analog treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, vol. 54, no. 3, pp. 1283–1289. doi: 10.1128/AAC.00970-09
12. Rybicka M., Stalke P., Dreczewski M., Smiatacz T., Bielawski K.P. High-throughput matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative approach to monitoring drug resistance of hepatitis B virus. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 1, pp. 9–14. doi: 10.1128/JCM.01891-13
13. Shi M., Yang Z.J., Wang R.S., Zhang H., Zhu Y.F., Xu Y.P., Lin Q.Y., Jin L.J. Rapid quantitation of lamivudine-resistant mutants in lamivudine treated and untreated patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin. Chim. Acta.*, 2006, vol. 373, iss. 1–2, pp. 172–175. doi: 10.1016/j.cca.2006.05.023
14. Stuyver L.J., Locarnini S.A., Lok A., Richman D.D., Carman W.F., Dienstag J.L., Schinazi R.F. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology*, 2001, vol. 33, no. 3, pp. 751–757. doi: 10.1053/jhep.2001.22166
15. Wang R.S., Zhang H., Zhu Y.F., Han B., Yang Z.J. Detection of YMDD mutants using universal template real-time PCR. *World J. Gastroenterol.*, 2006, vol. 12, no. 8, pp. 1308–1311. doi: 10.3748/wjg.v12.i8.1308

**Авторы:**

**Елпаева Е.А.**, научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Комиссаров А.Б.**, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Писарева М.М.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Грудинин М.П.**, к.б.н., зав. лабораторией молекулярной вирусологии и генной инженерии, зам. директора по науке и развитию ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Киселев О.И.**, академик РАН, д.б.н., профессор, директор ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Elpaeva E.A.**, Researcher of the Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

**Komissarov A.B.**, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

**Pisareva M.M.**, PhD (Biology), Leading Researcher of the Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

**Grudin M.P.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Deputy Director for Research and Development, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

**Kiselev O.I.**, PhD, MD (Biology), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.07.2015  
Отправлена на доработку 22.07.2015  
Принята к печати 13.08.2015

Received 17.07.2015  
Revision received 22.07.2015  
Accepted 13.08.2015

# ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO* ИНТЕРФЕРОНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.Н. Лисаков<sup>1</sup>, Ф.Г. Нагиева<sup>1</sup>, Е.П. Баркова<sup>1</sup>, Л.А. Гайдерова<sup>2</sup>, А.Ю. Федотов<sup>1</sup>,  
В.Г. Никулина<sup>1</sup>, М.В. Гаврилова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ НЦ экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ, Москва, Россия

**Резюме.** *Введение.* Известно, что интерферон (IFN), представляющий собой цитокин, является важной частью иммунной системы и необходим для полного выражения иммунного ответа на антигенный стимул. Также считается, что каждый антиген является интерферогеном. В связи с тем, что интерфероны индуцируют антивирусное состояние посредством связывания со специфическими рецепторами, то эти рецепторы можно определять непосредственно на клеточных мембранах иммунокомпетентных клеток человека. *Цель.* Оценить интерферогенность некоторых серотипов вирусов гриппа А по показателям функциональной активности  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерфероновых рецепторов (IFNAR и IFNGR) на мононуклеарных клетках периферической крови человека (МКПК), индуцированных *in vitro* вирусами гриппа А различных серотипов. *Материалы и методы.* Метод основан на выделении лимфоцитов из венозной гепаринизированной крови человека, индуцировании лимфоцитов *in vitro* при 36,5°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, забора образцов в различные временные интервалы, окраске их ФИТЦ-конъюгатом на основе мышиных антиидиотипических антител, структурно имитирующих IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  человека, то есть антирецепторных антител для IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  человека, фиксации окрашенных образцов параформальдегидом и оценке показателей экспрессии интерфероновых рецепторов (IFNAR) на проточном цитометре. *Результаты.* В экспериментах *in vitro* выявляли интерферогенность трех серотипов вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1), Краснодар/101/59 (H2N2) и Рязань/6103/87 (H3N2). Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) донора с группой крови «0», резус плюс, индуцировали облученной неинфекционной аллантоисной жидкостью с гемагглютинирующей активностью. Экспрессию IFNAR и IFNGR на МПК выявляли с помощью маркеров IFNR человека, меченых флуоресцеинизотиоцианатом и оценивали в проточном цитофлуориметре. Параллельно сравнивали экспрессию IFNAR и IFNGR на МПК, праймированных и непраймированных малыми дозами IFN $\alpha$  человека. Было установлено, что экспрессия IFNAR на МПК, индуцированных антигеном вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1) с высокой гемагглютинирующей активностью была выше у праймированных МПК в сравнении с непраймированными и выше в сравнении с экспрессией IFNAR на МПК, индуцированных антигенами вирусов гриппа А/Краснодар/101/59 (H2N2) и А/Рязань/6103/87 (H3N2) с более низкой гемагглютинирующей активностью. Необходимо отметить, что экспрессия IFNAR на МПК, индуцированных антигеном вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1) и праймированных малыми дозами IFN $\alpha$ , держалась на высоком уровне, начиная с 1 часа с момента индукции антигеном и продолжалась на высоких цифрах в течение 5 часов. Анализ уровня экспрессии IFNGR на МПК, индуцированных антигенами вируса гриппа А различных серотипов показал, что, во-первых, усиление экспрессии IFNGR на МПК, праймированных низкими дозами IFN $\alpha$  не происходило.

## Адрес для переписки:

Нагиева Фирая Галиевна  
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15, стр. 1,  
ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН.  
Тел.: 8 (495) 674-76-45 (моб.).  
E-mail: fgn42@yandex.ru

## Contacts:

Firaya G. Nagieva  
115088, Russian Federation, Moscow, 1<sup>st</sup> Dubrovskaya str., 15/1,  
Research Institute Vaccine and Serum named after I.I. Mechnikov.  
Phone: +7 (495) 674-76-45 (mobile).  
E-mail: fgn42@yandex.ru

## Библиографическое описание:

Лисаков А.Н., Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Гайдерова Л.А., Федотов А.Ю.,  
Никулина В.Г., Гаврилова М.В. Исследование *in vitro* интерфероновых  
рецепторов иммунокомпетентных клеток при экспериментальной  
гриппозной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3.  
С. 273–278. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-273-278

## Citation:

Lisakov A.N., Nagieva F.G., Barkova E.P., Gaiderova L.A., Fedotov A.Y.,  
Nikulina V.G., Gavrilova M.V. The immunocompetent cells receptors research  
under experimental influenza infection *in vitro* // Russian Journal of Infection  
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 273–278.  
doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-273-278



Во-вторых, усиление экспрессии IFNGR на МПК не было связано с уровнем гемагглютинирующей активности антигенов вирусов гриппа А. **Выводы.** Результаты экспериментов однозначно показывают, что все использованные в работе серотипы вирусов гриппа А обладают интерфероногенностью, о чем косвенно можно судить по уровню экспрессии IFNAR и IFNGR на МПК, индуцированных указанными вирусными антигенами. Степень интерфероногенности у различных серотипов вируса гриппа А связана с одной стороны, с уровнем гемагглютинирующей активности вируса при оценке IFNAR, с другой стороны, с серотипами вирусов при оценке IFNGR.

**Ключевые слова:** мононуклеарные клетки, периферическая кровь, активация лимфоцитов, культивирование *in vitro*, вирусы гриппа, интерфероновые рецепторы, экспрессия рецепторов, проточная цитометрия.

## THE IMMUNOCOMPETENT CELLS RECEPTORS RESEARCH UNDER EXPERIMENTAL INFLUENZA INFECTION *IN VITRO*

Lisakov A.N.<sup>a</sup>, Nagieva F.G.<sup>a</sup>, Barkova E.P.<sup>a</sup>, Gaiderova L.A.<sup>b</sup>, Fedotov A.Y.<sup>a</sup>, Nikulina V.G.<sup>a</sup>, Gavrilova M.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute Vaccine and Serum named after I.I. Mechnikov, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Research Center for Expertise of Means Medical Application, Moscow, Russian Federation

**Abstract. Introduction.** It is known that interferon is a cytokine and is a substantial part of the immune system necessary for antigenic challenge immune response full expression. Also it is considered that every antigen is an interferon inducer. Interferon induces antiviral response via binding to specific receptors, these receptors can be revealed straight on cell membranes of immune cells. **Research objective.** To evaluate the interferon inducer ability of some Influenza A virus strains upon indications of receptors functional activity (capacity) to alpha and gamma interferons on peripheral mononuclear blood cells (PBMC) induced *in vitro* by different Influenza A virus strains. **Material and methods.** The method is based on lymphocytes separation from the venous heparinized blood, with followed by *in vitro* lymphocytes inducing at temperature 36.5°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. Blood samples were taken in different time intervals, labelled by mouse anti-idiotypic FITC-conjugated antibodies, structurally simulated human alpha and gamma interferon, samples were fixed with paraformaldehyde. Interferon receptors expression were performed by flow cytometer. **Results.** The *in vitro* experiments have determined the interferon-inducing ability of three influenza virus strains: A/PR8/34 (H1N1), A/Krasnodar/101/59 (H2N2) and A/Ryazan/6103/87 (H3N2). MPBC blood sample (blood group was 0, Rh factor – positive) was induced by irradiated non-infectious allantoic fluid with hemagglutinating activity. Expression of alpha and gamma interferon receptors (alpha and gamma IFNR) on MPBC was determined by IFNR markers labelled with FITC and its (expression) was estimated by flow cytometer. In parallel we compared expression of alpha and gamma IFNR on MPBC in primed and non primed cells by low doses of human alpha interferon. It was found that expression of alpha and gamma IFNR on MPBC, induced influenza A/PR8/34 (H1N1) antigen, with high hemagglutinating activity was higher in primed MPBC in comparison with non primed and higher than expression was induced by influenza virus A/Krasnodar/101/59 (H2N2) and A/Ryazan/6103/87 (H3N2) with lower hemagglutinating activity. It should be noted that IFN alpha receptor (IFNAR) expression on induced by influenza virus strain A/PR8/34 (H1N1) and primed by low doses of alpha interferon, repose on high level from induction point (1 hour) and protract during high level during 5 hours. Evaluation of gamma IFNR (IFNGR) expression level on MPBC induced by different influenza virus strains testify that firstly up-regulation IFNGR expression on MPBC primed by low doses of alpha interferon is absent and secondly up-regulation IFNGR on MPBC bear no relation with hemagglutinating activity of Influenza virus antigen. **Conclusion.** Experiment results clearly suggest that all influenza strains used carry the interferon induced ability which is possible to see by expression of IFNAR and IFNGR on MPBC induced by described above virus antigens. Rate of interferon induce ability in different influenza virus A connected on one side with virus hemagglutinating activity level in estimating IFNAR and on the other side with virus strains in estimating IFNGR.

**Key words:** mononuclear cells, peripheral blood, lymphocyte activation, cultivation *in vitro*, influenza viruses, interferon receptors, receptors expression, flow cytometry.

## Введение

Ранее нами было показано, что мышинные моноклональные антиидиотипические антитела с альфа и гамма интерфероноподобными свойствами, обладали способностью связываться с интерфероновыми рецепторами (IFNR), экспрессированными на мембране иммунокомпетентных клеток человека. С помощью моноклональных антиидиотипических антител, меченых флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) было показано, что активация иммунной системы, связанная с инфекцией, отражается на степе-

ни экспрессии  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерфероновых рецепторов (IFNAR и IFNGR) на иммунокомпетентных клетках человека. При этом, у лиц с глубокими нарушениями иммунной системы, например, у ВИЧ-инфицированных, выявляется высокая степень экспрессии IFNAR и IFNGR, а при развитии клинически выраженного СПИД, возрастает экспрессия рецепторов только для IFN $\gamma$  [1, 2].

В последние годы в научной прессе широко дискутируется вопрос об интерфероногенности вирусов гриппа и других респираторных вирусов и о механизмах ингибции ими интерферонов. Так, было показано, что неструктурный белок

NS 1 вируса гриппа А ингибирует врожденный иммунный ответ организма путем угнетения индукции интерферона [5]. Также было показано, что неструктурный белок NS 1 респираторного синцитиального вируса ингибирует синтез  $IFN\alpha/\beta$ , хотя механизмы, ответственные за это известны не полностью [6].

В работах Скуркович С.В. с соавт. было сделано предположение, что интерферон в организме необходим для полного выражения иммунного ответа на антигенный стимул и что любой антиген является интерфероногеном [8].

Целью настоящей работы является оценка интерфероногенности некоторых серотипов вирусов гриппа А по показателям функциональной активности  $IFNAR$  и  $IFNGR$  на мононуклеарных клетках периферической крови человека (МПК), индуцированных *in vitro* вирусами гриппа А различных серотипов.

## Материалы и методы

Антирецепторные маркеры со специфичностью для  $IFN\alpha$  и  $IFN\gamma$  человека получены из мышинных лимфоцитарных гибридом, секретирующих антиидиотипические моноклональные антитела, путем их культивирования в брюшной полости сингенных мышей после предварительного введения пристана. Собранные асцитические жидкости концентрировали и очищали каприловой кислотой и сульфатом аммония и конъюгировали с ФИТЦ по методикам [3, 9].

**Вирусы.** Аллантаисные варианты вирусов гриппа А получали в развивающихся 9-дневных куриных эмбрионах. В экспериментах были использованы следующие серотипы вирусов гриппа А/PR8/34 (H1N1), Краснодар/101/59 (H2N2) и Рязань/6103/87 (H3N2). Полученные вирусосодержащие аллантаисные жидкости были адаптированы к культурам клеток линии MDCK. Инфекционный титр вируса, полученный с инфицированных клеток MDCK, оценивали по цитопатическому действию вирусов на клетки (ЦПД<sub>50</sub>), который подтверждали в реакции прямой иммунофлуоресценции со специфическими мышинными сыворотками мечеными ФИТЦ, а также по гемагглютинирующей активности вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) с 0,4% взвесью эритроцитов морских свинок. Для получения флуоресцирующих иммунных сывороток мышей линии BALB/c иммунизировали внутрибрюшинно аллантаисными вариантами вирусов гриппа А и полученные сыворотки после очистки и концентрации сульфатом аммония и каприловой кислотой, конъюгировали с ФИТЦ.

**Культивирование вирусов гриппа А в клеточной культуре MDCK.** В культуральных флаконах площадью 75 см<sup>2</sup> выращивали клетки MDCK в питательной среде ДМЕМ с 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и гентамицином 40 мкг/мл. Перед заражением клеток вирусами, сформиро-

вавшийся монослой трижды промывали фосфатно-буферным раствором (ФБР), содержащим ионы  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  и вносили аллантаисную вирусосодержащую жидкость. Множественность заражения составляла 0,01. Поддерживающая среда состояла из среды ДМЕМ с 2 мкг/мл кристаллического трипсина и 40 мкг/мл гентамицина. Контакт ВСЖ с клетками проводили при 36,5°C в течение 1 ч. Неадсорбированный ВСЖ удаляли и вносили поддерживающую среду ДМЕМ с 2 мкг/мл трипсина. Через 72 ч культивирования после деструкции клеточного монослоя на 70–80% культуральные флаконы с инфицированными клетками двукратно замораживали на минус 70°C с последующим размораживанием, клеточную взвесь центрифугировали и надосадочную вирусосодержащую жидкость распределяли на небольшие пулы и замораживали на минус 70°C до использования. Перед использованием ВСЖ вирусов гриппа А, определяли их инфекционную активность методом предельного разведения на клетках MDCK, выращенных на 24-луночных культуральных планшетах. Для индукции МПК человека один из пулов ВСЖ размораживали и облучали под УФ бактерицидной лампой дважды по 20 мин с расстояния 30 см.

**Выделение лимфоцитов.** МПК выделяли из гепаринизированной (20 ед/мл) крови человека «0» группы, Rh<sup>+</sup>, в градиенте фикола при плотности 1,077 г/см<sup>3</sup> (ПанЭко, США) путем центрифугирования в течение 20 мин при 1500 об./мин. Клеточную фракцию трижды промывали холодным фосфатно-солевым буферным раствором (ФБР), осадок клеток ресуспендировали в среде RPMI-1640 с 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), индуцировали антигенами вирусов гриппа различных серотипов и в разные временные интервалы готовили образцы для проточной цитометрии.

**Пробоподготовка лимфоцитов для проточной цитометрии.** В две пробирки (Эппендорф) вносят по 100 мкл тщательно перемешанного образца лимфоцитов и добавляют по 5 мкл флуоресцирующих  $\alpha$ - и  $\gamma$ -антиидиотипических антител, перемешивают на вортексе в течение 5 с, инкубируют 45 мин при комнатной температуре в темноте. Окрашенные лимфоциты центрифугируют при 800g в течение 7 мин, надосадок удаляют пипеткой со сменным наконечником, осадок промывают центрифугированием с ФБР комнатной температуры 2 раза, затем фиксируют дважды свежешелуфированным 2% параформальдегидом. Суспензию окрашенных и фиксированных лимфоцитов переносят в специальные пробирки для установки в прибор. Пробу встряхивают на вортексе в течение 5 с и помещают в проточный цитометр Coulter EPICS XL (4-цветный; Product for Beckman Coulter/COULTER EPICS XL). Цитометрию проводят по стандартной методике. Полученные результаты анализируют.

**Праймирование лимфоцитов.** Праймирование лимфоцитов проводилось за 30 мин до внесения вируса гриппа А путем внесения лейкоцитарного IFN $\alpha$  в дозе 8–20 ед на  $2 \times 10^6$  лимфоцитов [4].

Статистическая обработка проведена по программе Prism 4 (Graph Red).

## Результаты и обсуждение

Эксперименты для оценки экспрессии интерфероновых рецепторов (IFNR) на мононуклеарных клетках периферической крови человека (МПК), индуцированных антигенами вирусов гриппа А были поставлены в шестилуночных планшетах (Costar, США). Суспензию МПК после подсчета клеток в камере Горяева распределяли по 2 мл в каждую лунку шестилуночной планшеты с концентрацией  $1 \times 10^6$  лимфоцитов в 1 мл в среде RPMI-1640 с 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). При этом, за 30 мин до внесения ВСЖ, предварительно, в три лунки вносили по 0,5 мл IFN $\alpha$  с 20 ед. активности, а в три другие лунки вносили по 0,5 мл среды RPMI-1640 с 1% БСА. Через 30 мин культивирования при 36,5°C в атмосфере с 5% CO $_2$  при периодическом перемешивании клеточной суспензии, во все 6 лунок вносили по 0,5 мл облученной ВСЖ, содержащей различные серотипы вирусов гриппа А. Далее планшеты продолжали культивировать в инкубаторе с 5% CO $_2$  при температуре 36,5°C. Образцы проб извлекали через 1, 3, 5 и 24 ч.

К отобраным образцам МПК после пятисекундного встряхивания на вортексе вносили равный объем меченых ФИТЦ моноклональных антиидиотипических антирецепторных антител, выдерживали в течение 45 мин в темноте и продолжали пробоподготовку для проточной цитофлуориметрии, описанной подробно в материалах и методах.

В таблице 1 представлены результаты исследования инфекционной и гемагглютинирующей активности вирусов гриппа А с инфицированных клеток МДСК до и после облучения.

Результаты, представленные в таблице 1 показывают, что инфекционная активность облученной ВСЖ, оцененная на клетках МДСК отсутствовала, а гемагглютинирующая активность не изменилась.

В таблице 2 отражены данные уровня экспрессии IFNAR на МПК человека, индуцированных вирусами гриппа А различных серотипов.

Анализ уровня экспрессии IFNAR на МПК, индуцированных вирусом гриппа А серотипа H1N1 с более высокой гемагглютинирующей активностью в сравнении с другими серотипами, показывает, что максимальная экспрессия IFNAR наблюдается через 3 ч с момента индукции — как без праймирования IFN $\alpha$ , так и с праймированием. Однако уровень экспрессии IFNAR у праймированных лимфоцитов выше, в сравнении с непраймированными. Так, сравнивая уровень экспрессии IFNAR у прай-

**ТАБЛИЦА 1. ИНФЕКЦИОННАЯ И ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ВИРУСОВ ГРИППА А РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ С ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК МДСК ДО И ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ**

Вирусы гриппа А	Инфекционная активность в Ig ИФ** 50/0,5 мл		Гемагглютинирующая активность (в обратных величинах)	
	до облучения	после облучения	до облучения	после облучения
PR8/34 (H1N1)	5,0	0	1024	1024
Краснодар/101/59 (H2N2)	4,0	0	256	256
Рязань/6103/87 (H3N2)*	4,0	0	256	256

**Примечание.** \*изolat вируса гриппа А, выделен в нашей лаборатории в период эпидемии гриппа в г. Рязани в 1987 г.;

\*\*инфекционные фокусы.

**ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ IFNAR НА МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ГРИППА А РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ ПО ДАННЫМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

Вирусы гриппа А	Время индукции (в часах)	Уровень экспрессии IFNAR на мононуклеарных клетках человека (в %)			
		Без праймирования	С праймированием	Разница между показателями (абс./%)	P
PR/8/34 (H1N1)	1	1,86±0,02	4,03±0,09	2,17/53,8%	< 0,0001
	3	4,72±0,06	7,52±0,04	2,8/37,2%	< 0,0001
	5	2,07±0,03	5,17±0,13	3,1/59,9%	< 0,0001
	24	0,96±0,07	1,54±0,05	0,58/30,6%	0,0001
Краснодар/101/59 (H2N2)	1	0,86±0,04	0,80±0,05	0,06/6,9%	ns
	3	1,56±0,05	4,36±0,04	2,8/64,2%	< 0,0001
	5	2,90±0,04	2,59±0,03	0,31/10,6%	< 0,0001
	24	1,38±0,06	1,03±0,05	0,35/25,3%	< 0,0001
Рязань/6103/87 (H3N2)	1	0,42±0,04	0,57±0,04	0,15/2,6%	ns
	3	1,43±0,03	3,38±0,06	1,95/57,6%	< 0,0001
	5	2,55±0,04	3,72±0,06	1,17/31,4%	< 0,0001
	24	1,10±0,06	1,11±0,09	0,01/9,0%	ns

**ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ IFNGR НА МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ГРИППА А РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ**

Вирусы гриппа А	Время индукции (в часах)	Уровень экспрессии IFNGR на мононуклеарных клетках человека (в %)			
		Без праймирования	С праймированием	Разница между показателями (абс./%)	P
PR/8/34 (H1N1)	1	1,18±0,04	0,96±0,03	0,22/18,6%	< 0,0001
	3	1,31±0,03	2,39±0,05	1,08/45,1%	< 0,0001
	5	3,33±0,06	2,94±0,02	0,39/11,7%	0,0002
	24	1,84±0,03	0,95±0,03	0,89/48,3%	< 0,0001
Краснодар/101/59 (H2N2)	1	0,93±0,05	0,99±0,04	0,06/6,0%	ns
	3	4,11±0,06	3,22±0,12	0,89/21,6%	< 0,0001
	5	5,75±0,04	3,64±0,04	2,11/36,6%	< 0,0001
	24	0,71±0,07	0,73±0,04	0,02/2,7%	ns
Рязань/6103/87 (H3N2)	1	1,21±0,05	1,16±0,03	0,05/4,1%	
	3	3,35±0,05	3,56±0,05	0,21/5,8%	ns
	5	4,54±0,01	3,56±0,1	0,20/4,4%	0,0064
	24	0,61±0,02	1,43±0,08	0,82/57,3%	0,0004

мированных и непраймированных лимфоцитов, необходимо отметить, что уже через 1 ч после индукции лимфоцитов антигеном вируса гриппа А (H1N1), у праймированных лимфоцитов на 53,8% уровень экспрессии был выше, чем у непраймированных. Разница статистически достоверна при уровне значимости  $p < 0,0001$ . Разница уровней экспрессии IFNAR у праймированных и непраймированных лимфоцитов через 3 ч после индукции антигеном вируса гриппа А (H1N1) составляла 37,2%. Этот показатель также статистически достоверен при уровне значимости  $p < 0,0001$ .

Через 5 ч после индукции лимфоцитов антигеном вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1) уровень экспрессии IFNAR у непраймированных лимфоцитов резко снижался на 59,9% в сравнении с праймированными лимфоцитами, то есть у праймированных лимфоцитов экспрессия IFNAR держалась на высоком уровне, начиная с первого часа с момента индукции антигеном вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1) и продолжалась на высоких цифрах в течение 5 ч.

Из литературы известно, что клетки, до индукции вирусом, обработанные низкими дозами интерферона, образуют больше интерферона, чем необработанные. Механизм усиливающего действия предварительной обработки интерфероном остается неясным. Предполагают, что при такой обработке увеличивается базальный уровень мРНК интерферона, которая и обуславливает более быструю и его эффективную индукцию [4].

Анализ уровня экспрессии IFNAR на МПК, индуцированных антигенами вирусов гриппа А серотипов (H2N2) и (H3N2) с более низкой гемагглютинирующей активностью, показывает, что у праймированных лимфоцитов более высокий уровень экспрессии IFNAR на МПК наблюдается к 3 часам с момента индукции и по абсолютной величине выше по сравнению с непраймированными лимфоцитами у которых максимальный показатель экспрессии ниже

и достигается к 5 часам после индукции. Возможно различия в показателях экспрессии IFNAR на МПК, индуцированных антигенами вирусов гриппа А различных серотипов, связаны с различной гемагглютинирующей активностью вирусов, а не с серотипами.

В таблице 3 представлены результаты экспрессии IFNGR на МПК человека, индуцированных вирусами гриппа А различных серотипов.

Анализ уровня экспрессии IFNGR на МПК, индуцированных антигенами вируса гриппа А различных серотипов показывает, что, во-первых, усиление экспрессии IFNGR на лимфоцитах, праймированных низкими дозами IFN $\alpha$  не происходит. Во-вторых, усиление экспрессии IFNGR на МПК не связано с уровнем гемагглютинирующей активности индуцирующих антигенов. Так, максимальный уровень экспрессии IFNGR на лимфоцитах наблюдался через 3 ч с момента индукции антигеном вируса гриппа А серотипа H1N1 и резко снижался к 5 часам, а экспрессия IFNGR на МПК, индуцированных антигенами вируса гриппа А серотипов H2N2 и H3N2 продолжалась в течение 5 ч на высоких показателях экспрессии IFNGR.

Таким образом, по результатам, полученным в наших экспериментах с использованием меченых ФИТЦ антирецепторных моноклональных антител для IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  человека, можно однозначно утверждать, что все использованные в работе серотипы вирусов гриппа А обладают интерфероногенностью, о чем косвенно судят по индукции ими на мононуклеарных клетках человека IFN $\alpha$  для IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  человека. Степень интерфероногенности у различных серотипов вируса гриппа А связана с одной стороны, как с уровнем гемагглютинирующей активности, например, у серотипа H1N1 вируса гриппа А/PR8/34 в случае экспрессии IFNAR, так и с серотипами в случае экспрессии IFNGR.

Как известно, из наших предыдущих экспериментов [1, 2] и данных литературы [7], у лиц с глубокими нарушениями иммунной системы,



выявляется высокая степень экспрессии рецепторов для IFN $\gamma$ . Экстраполируя эти данные на полученные нами результаты, относящиеся к более высокому уровню экспрессии IFN $\gamma$  у серотипов H2N2 и H3N2, в частности, вирусов

гриппа А/Краснодар/101/59 и Рязань/6103/87, соответственно, можно предположить, что вирусы указанных серотипов в случае эпидемической вспышки могут вызвать более глубокие нарушения иммунной системы организма.

## Список литературы/References

1. Баркова Е.П., Вдовина Е.Т., Нагиева Ф.Г., Юшук Н.В., Знойко О.О., Никулина В.Г., Воробьев А.С. Функциональная активность интерфероновых рецепторов мононуклеаров периферической крови пациентов с вирусными гепатитами // Биопрепараты. 2001. № 4. С. 18–21. [Barkova E.P., Vdovina E.T., Nagieva F.G., Ushuk N.V., Znoiko O.O., Nikulina V.G., Vorobev A.S. Functional activity (capacity) interferon receptors peripheral blood mononuclear cells of patients with viral hepatitis. *Biopreparaty = Biopharmaceuticals*, 2001, no. 4, pp. 18–21. (In Russ.)]
2. Баркова Е.П., Нагиева Ф.Г., Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Никулина В.Г., Бабаянц А.А., Крель П.Е., Анджапаридзе О.Г. Экспрессия рецепторов для человеческих интерферонов альфа и гамма на поверхности мононуклеарных клеток периферической крови при некоторых вирусных инфекциях // Вопросы вирусологии. 1998. Т. 43, № 6. С. 16–18. [Barkova E.P., Nagieva F.G., Kuznetsov V.P., Belyaev D.L., Nikulina V.G., Babayants A.A., Krel P.E., Andzaparidze O.G. Expression receptors to human alpha and gamma interferon on surface of peripheral blood mononuclear cells in some virus infections. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1998, vol. 43, no. 6, pp. 16–18. (In Russ.)]
3. Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж. Клаус. М.: Мир, 1990. 395 с. [Lymphocytes. Methods / Ed. Klaus G.]. Moscow: Mir, 1990, 395 p. (In Russ.)]
4. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины. М.: Медицина, 1981. 283 с. [Solovov V.D., Bektemirov T.A. *Interferony v teorii i praktike meditsiny* [Interferons in theory and practice in medicine]. Moscow: Meditsina, 1981. 283 p. (In Russ.)]
5. Mizukoshi E., Kaneko S., Yanagi M., Ohno H., Kaji K., Terasaki S., Shimoda A., Matsushita E., Kobayashi K. Expression of interferon alpha/beta receptor in the liver of chronic hepatitis C patients. *J. Med. Virol.*, 1998, vol. 56, no. 3, pp. 217–223.
6. Reik L.M., Maines S.L., Ryan D.E., Levin W., Bandiera S., Thomas P.E. A simple, non-chromatographic purification procedure for monoclonal antibodies. Isolation of monoclonal antibodies against cytochrome P450 isozymes. *J. Immunol. Methods*, 1987, vol. 100, no. 1–2, pp. 123–130.
7. Ren J., Liu T., Pang L., Li K., Garofalo R.P., Casola A., Bao X. A novel mechanism for the inhibition of interferon regulatory factor-3-dependent gene expression by human respiratory syncytial virus NS1 protein. *J. Gen. Virol.*, 2011, 92 (Pt. 9), pp. 2153–2159. doi: 10.1099/vir.0.032987-0
8. Skurkovich S.V., Eremkina E.I. The probable role of interferon in allergy. *Ann. Allergy*, 1975, vol. 35, no. 6, pp. 356–360.
9. Woo H.M., Kim K.S., Lee J.M., Shim H.S., Cho S.J., Lee W.K., Ko H.W., Keum Y.S., Kim S.Y., Pathinayake P., Kim C.J., Jeong Y.J. Single-stranded DNA aptamer that specifically binds to the influenza virus NS1 protein suppresses interferon antagonism. *Antiviral Res.*, 2013, vol. 100, no. 2, pp. 337–345. doi:10.1016/j.antiviral.2013.09.004.

### Авторы:

**Лисаков А.Н.**, младший научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;  
**Нагиева Ф.Г.**, д.м.н., доцент, зав. лабораторией гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;  
**Баркова Е.П.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;  
**Гайдерова Л.А.**, к.м.н., зав. лабораторией иммунологии ФГБУ НЦЭСМП МЗ РФ, Москва, Россия;  
**Федотов А.Ю.**, младший научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;  
**Никулина В.Г.**, к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;  
**Гаврилова М.В.**, научный сотрудник лаборатории синтеза иммуноглобулинов ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия.

### Authors:

**Lisakov A.N.**, Junior Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;  
**Nagieva F.G.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;  
**Barkova E.P.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;  
**Gaiderova L.A.**, PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Immunology, Scientific Center for Expertise of Means Medical Application, Ministry of Health Care, Russian Federation, Moscow, Russian Federation;  
**Fedotov A.Y.**, Junior Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;  
**Nikulina V.G.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;  
**Gavrilova M.V.**, Researcher, Laboratory of Synthesis of Immunoglobulins, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.04.2015  
 Отправлена на доработку 14.05.2015  
 Принята к печати 23.07.2015

Received 21.04.2015  
 Revision received 14.05.2015  
 Accepted 23.07.2015

# АНАЛИЗ ДАННЫХ ЛАБОРАТОРНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ НА ЛЯМБЛИОЗ У РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП НАСЕЛЕНИЯ НЕНЕЦКОГО АВТОНОМНОГО ОКРУГА

Н.С. Бобырева, Г.Н. Дегтева

*НИИ Арктической медицины ГБОУ ВПО Северный государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Архангельск, Россия*

**Резюме.** Ненецкий автономный округ (НАО) относится к территориям Крайнего Севера России. Округ является единственным регионом России, где до сих пор отсутствуют дороги. Экстремальные природные условия, а также характер расселения жителей в НАО снижают доступность оказания квалифицированной специализированной медицинской помощи, как лицам коренных национальностей, так и других народностей, проживающих на территории округа, что требует использования специфических форм организации медицинского обслуживания населения. В статье представлены данные собственных проведенных исследований на лямблиоз у различных категорий населения в НАО, полученные в результате применения практики обследования населения в труднодоступных регионах Арктической зоны Российской Федерации на примере НАО при финансовой поддержке нефтяных компаний, работающих на территории округа. Материалом для исследования являлись сыворотка крови и эмульсия кала. В процессе исследования использовались следующие методы диагностики: для сыворотки крови — скрининговые иммунологические методы с использованием наборов российского производства, основанные на выявлении антител к антигенам лямблий в сыворотке крови, для эмульсии кала — микроскопический анализ нативного мазка, метод обогащения с использованием одноразовых концентраторов «Paraser», иммунологические методы диагностики, основанные на выявлении специфического лямблиозного антигена в пробах фекалий с применением наборов для иммуноферментной диагностики отечественного производства. Для обработки результатов использовался метод описательных статистик (средние значения, процент, ошибки среднего, построение линии тренда), выполненные в программе SPSS 20.00, Excel 2010, метод анализа данных официальной статистической отчетности лечебных учреждений по обследованию на лямблиоз, данные Управления Роспотребнадзора по НАО и данные собственных исследований в период с 2002 по 2013 год. Всего в процессе исследования выполнено 10 356 исследований на лямблиоз, зарегистрировано заболеваний по лямблиозу 3470 случаев, что составило 99,14% от общего количества зарегистрированных протозоозов и 37,4% от всех зарегистрированных на территории НАО паразитозов. Сравнение проводилось среди населения поселков округа, в которых проживают как коренные жители, ведущие кочевой образ жизни, так и представители других этнических групп, ведущих оседлый образ, с городским населением города Нарьян-Мара. В статье приведен анализ показателей заболеваемости по лямблиозу по данным окружной официальной статистической отчетности по сравнению с показателями заболеваемости в Российской Федерации за тот же период времени. Статистический анализ данных

---

**Адрес для переписки:**

Бобырева Наталья Станиславовна  
163000, Россия, г. Архангельск, Троицкий пр., 51,  
НИИ Арктической медицины ГБОУ ВПО СГМУ МЗ РФ.  
Тел.: 8 (182) 21-08-17. Факс: 8 (182) 28-62-82.  
E-mail: nata.bobyreva@yandex.ru

**Contacts:**

Natalia S. Bobyreva  
163000, Russian Federation, Arkhangelsk, Troitskii av., 51,  
Northern State Medical University.  
Phone: +7 (182) 21-08-17. Fax: +7 (182) 28-62-82.  
E-mail: nata.bobyreva@yandex.ru

**Библиографическое описание:**

Бобырева Н.С., Дегтева Г.Н. Анализ данных лабораторного обследования на лямблиоз у различных групп населения Ненецкого автономного округа // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 279–284. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-279-284

**Citation:**

Bobyreva N.S., Degteva G.N. Laboratory testing results Analysis of giardiasis prevalence among different population groups in the Nenets autonomous district // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 279–284. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-279-284

проводился с помощью пакета программ Excel 2010. В результате исследования установлена взаимосвязь распространенности лямблиоза у населения НАО по таким критериям, как место проживания, половая принадлежность, род занятий и возрастная структура обследованных.

**Ключевые слова:** коренное население, ненцы, кочевой образ жизни, оседлый образ жизни, лямблиоз, протозоозы, труднодоступные регионы Арктической зоны РФ.

## LABORATORY TESTING RESULTS ANALYSIS OF GIARDIASIS PREVALENCE AMONG DIFFERENT POPULATION GROUPS IN THE NENETS AUTONOMOUS DISTRICT

Bobyreva N.S., Degteva G.N.

Northern State Medical University, Institute of Arctic Medicine, Arkhangelsk, Russian Federation

**Abstract.** The Nenets Autonomous District (NAD) refers to the territories of the Russia's Far North. The country is the only region of Russia, where there are still no roads. The extreme weather conditions, as well as residential patterns in the NAD reduce the availability of specialized medical care, as indigenous people and other nationalities living in the district, which requires the use of health care management specific forms. The article presents data on giardiasis studies amongst different categories of the NAD population, obtained as a result of the population surveys in remote regions of the Russian Federation Arctic zone. Samples studied were serum and faecal emulsion. The study used the following laboratory methods: for serum — Giardia lamblia antibody screening method using ELISA kit, emulsion stool — native smear microscopy analysis, the method of enrichment using disposable concentrators «Parasep» immunological diagnostic methods based on the detection of specific lamblia antigen in faeces using ELISA kits. For statistics was used descriptive statistics analysis (mean values, the percentage error of the mean, the construction of the trend line) with program SPSS 20.00, Excel 2010, the method of analysis of official statistical reporting hospitals survey on giardiasis, data of Rospotrebnadzor (Russian Sanitary service) for NAD and data from own research from 2002 to 2013. Just in the process of research carried out research on the 10 356 giardiasis, registered diseases by 3470 cases of giardiasis, accounting for 99.14% of the total number of protozoosises registered and 37.4% of all registered in the NAD parasitosis. The comparison was made among the population of the county towns, home to both the indigenous people, nomadic, and representatives of other ethnic groups, sedentary with urban population of the city of Naryan-Mar. The article analyzes the incidence rates for giardiasis according to district official statistical reporting compared with the incidence in the Russian Federation for the same period of time. Statistical analysis was performed using the software package Excel 2010. The study found an association of giardiasis prevalence in the population of the NAD on criteria such as location, gender, occupation and age structure examined.

**Key words:** indigenous peoples, Nenets, nomadic, sedentary, giardiasis, protozoozy, remote regions of the Russian Arctic.

## Введение

Лямблиоз, возбудителем которого является *Lambliа intestinalis* (*Giardia lamblia*), относится к наиболее распространенным и часто встречающимся кишечным протозойным инфекциям [9]. Возбудитель лямблиоза первым обнаружил в фекалиях человека с диареей и охарактеризовал Антон Ван Левенгук в 1681 г. Впоследствии эти простейшие были подробно описаны в 1859 г. Д.Ф. Лямблем, который наблюдал их в фекалиях детей с диареей в Праге.

До 1970-х гг. патогенность лямблий ставилась под сомнение, что было связано с отсутствием отчетливых клинических симптомов заболевания и характерных патологоанатомических изменений пораженных органов при лямблиозе, а также с широким распространением случаев носительства этого паразита. В 1981 г. *Lambliа intestinalis* была отнесена к патогенным кишечным протозоозам, которые способны вызывать заболевание у человека [1, 4, 9].

По данным экспертов ВОЗ, ежегодно лямблиозом заражается около 200 млн человек, однако клинические проявления заболевания регистрируются только у 500 тыс. человек [3, 7, 8]. В Российской Федерации по данным официальной статистической отчетности ежегодно регистрируется до 150 тыс. новых случаев лямблиоза, при этом 80% из них у детей до 14 лет [7].

В Ненецком автономном округе (НАО), несмотря на сокращение объемов исследования, эпидемиологическая обстановка по лямблиозу остается крайне сложной. В 2011 и 2012 гг. в связи со значительным увеличением количества обследованных на лямблиоз в структуре паразитозов 70,7% приходилось на протозоозы, гельминтозы составляли лишь 22,3% [5].

В подтверждении клинического диагноза при лямблиозе важную роль играет лабораторное исследование. Значимость качественной лабораторной диагностики лямблиоза определяется трудностью его обнаружения. Это свя-

зано с тем, что симптоматика лямблиоза мало специфична, полиморфна и не всегда сопровождается развитием острых симптомов [7].

Целью исследования являлся анализ пораженности лямблиозом различных категорий населения НАО, определенный по результатам лабораторного обследования.

## Материалы и методы

Материалом для исследования являлись: сыворотка крови, полученная у обследуемых групп путем венепункции в соответствии международными стандартами этических норм и качеств научных исследований GCP (Good Clinical Practice) и пробы фекалий, полученные в соответствии с МУК 4.2.735-99 «Паразитологические методы лабораторной диагностики гельминтозов и протозоозов». Для выполнения поставленных задач были применены следующие методы исследований:

1. микроскопический анализ нативного мазка в плотных, оформленных фекалиях для обнаружения цистных форм лямблий (время исследования было не ограничено), в полуоформленных и жидких — вегетативных форм (исследование проводили в течение 1 часа);
2. метод обогащения с использованием одноразовых концентраторов «Parasep». Пробирку с образцом для анализа герметично закрывали, помещали в центрифугу коническим концом вниз и центрифугировали. В процессе центрифугирования, имеющиеся в пробе цисты лямблий беспрепятственно проходили через фильтр, концентрируясь в поверхностном слое мелкодисперсного осадка, а далее производился их отбор для микроскопирования с помощью автоматической пипетки и нанесения его на предметное стекло;
3. иммунологические методы диагностики, основанные на выявлении специфического лямблиозного антигена в пробах фекалий или антител в сыворотке крови (ИФА-наборы «Вектор-Бест» с использованием автоматического ИФА-анализатора «LAZURITE» производства США фирмы «DYNEX Technologies»), направленные на выявление в сыворотках крови или эмульсии фекалий специфических антигенов или антител к ним. При выявлении положительных результатов исследования на лямблиоз проводилось определение диагностического титра;
4. метод описательных статистик (средние значения, процент, ошибки среднего, по-

строение линии тренда) и таблицы сопряженности ( $\chi^2$  Пирсона), выполненные с помощью пакета программ SPSS 20.00, Excel 2010;

5. метод анализа данных официальной статистической отчетности лечебных учреждений по обследованию на паразитарные заболевания, эндемичные для НАО округа за период с 2002 по 2013 гг., данные Управления Роспотребнадзора по НАО и данные собственных исследований за тот же период [2, 5].

## Результаты и обсуждение

В период с 2002 по 2013 гг. лечебными учреждениями округа выполнено различными методами диагностики 10 356 исследований на лямблиоз, зарегистрировано 3470 случаев заболеваний лямблиозом, что составило 99,14% от общего количества зарегистрированных протозоозов и 37,4% от всех зарегистрированных на территории НАО паразитозов.

С 2011 г. для выявления цистных форм лямблий в фекалиях стали применять одноразовые концентраторы «Parasep». Это значительно увеличило количество обследованных на лямблиоз.

В 2013 г. в округе заболеваемость населения лямблиозом снизилась на 15% по сравне-

**ТАБЛИЦА. СУБЪЕКТЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С НАИБОЛЕЕ ВЫСОКИМИ УРОВНЯМИ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЛЯМБЛИОЗОМ В 2013 г.**

Субъект Российской Федерации	Заболеваемость	
	число случаев всего, чел.	показатель на 100 тыс. населения
Российская Федерация	64 623	45,13
Ненецкий автономный округ	918	2154,3
Томская область	2577	242,9
Магаданская область	340	221,6
Республика Хакасия	1 046	196,4
Ямало-Ненецкий автономный округ	799	148,2
Красноярский край	4053	142,6
Кемеровская область	3786	137,8
Пермский край	3501	133,0
Курганская область	1167	131,0
Республика Коми	1011	114,2
Новосибирская область	3058	113,3
Волгоградская область	2670	103,1
Ханты-Мансийский автономный округ	1552	98,69
Вологодская область	1181	98,63
Чувашская республика	1126	90,43



нию с 2012 г. Всего зарегистрировано 918 случаев (2145,5 на 100 тыс. населения) против 1080 случаев (2544,9 на 100 тыс. населения) в 2012 г. [5]. Среди заболевших лямблиозом 40,7% составляют дети, показатель заболеваемости детей в 2013 г. увеличился по сравнению с 2012 г. на 18,5% и составил 3323,9 на 100 тыс. детей до 17 лет (2012 г. — 2805,2).

По данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в 2013 г. в НАО зарегистрирован самый высокий уровень заболеваемости лямблиозом по сравнению с РФ и другим субъектами РФ на 100 тыс. населения [6] (табл.).

Данные собственных иммунологических исследований получены в рамках реализации проекта «Красный Чум» при финансовой поддержке нефтяных компаний, работающих на территории округа [2]. Проект предполагал обследование населения в труднодоступных поселках НАО. Выполнялись скрининговые серологические исследования образцов клинического материала на лямблиоз. Всего обследовано 342 человек, проживающих в сельской местности, и 114 человек, проживающих в городе за 2013 г.

Все обследуемые делились на группы: по месту проживания — на сельское (75%) и городское население (25%); по возрасту — взрослые (65,1%) и дети до 17 лет (34,9%); по роду занятий: кочующие (35,1%) и оседлые (64,9%); по половой принадлежности — мужчины (39,4%) и женщины (60,6%); по этнической принадлежности: коренное население — ненцы (49,2%) и лица другой этнической принадлежности (50,8%). Критерием невключения был отказ от участия в исследовании и нетрудоспособность. Критериями исключения являлись сомнительные результаты по паразитозам.

Тип исследования: когортное (лонгитюдное). Рандомизация не проводилась при распределении обследуемых по группам.

По результатам скринингового обследования населения на лямблиоз положительные значения имелись в следующих группах:

1. по месту проживания — у сельского населения в 30 случаях (из 342), у городского в 23 случаях (из 114);
2. по возрасту — у детей в 23 случаях (из 118), у взрослых в 30 случаях (из 274);
3. по этнической принадлежности — у ненцев в 24 случаях (из 197), у лиц другой этнической принадлежности в 29 случаях (из 197);
4. по роду занятий — у кочующих в 8 случаях (из 149), у ведущих оседлый образ жизни в 45 случаях (из 245);
5. по половой принадлежности — у мужчин в 19 случаях (из 158), у женщин в 34 случаях (из 236) (рис. 1).

Начиная с 2009 г., заболеваемость лямблиозом населения НАО увеличилась на 316,7% по сравнению с периодом с 2002–2008 гг., в 2011 г. — на 3465,8% по сравнению с 2010 г. (рис. 2).

Заболеваемость населения на лямблиоз с 2004 г. имеет тенденцию к увеличению, как у взрослого (линия тренда:  $y = 100,8x - 366,08$  при  $R^2 = 0,5296$ ), так и детского населения (линия тренда:  $y = 42,801x - 149,29$  при  $R^2 = 0,3932$ ). Это может быть связано, во-первых, с улучшением лабораторной диагностики в лечебных учреждениях округа, во-вторых, с использованием одноразовых концентраторов для забора и фильтрации кала «Parasер», предназначенных для концентрирования кишечных паразитов методом центрифугирования через специальный фильтр, в фильтрате которого определяются паразиты и кишечные протозоозы (в частности лямблиоз).

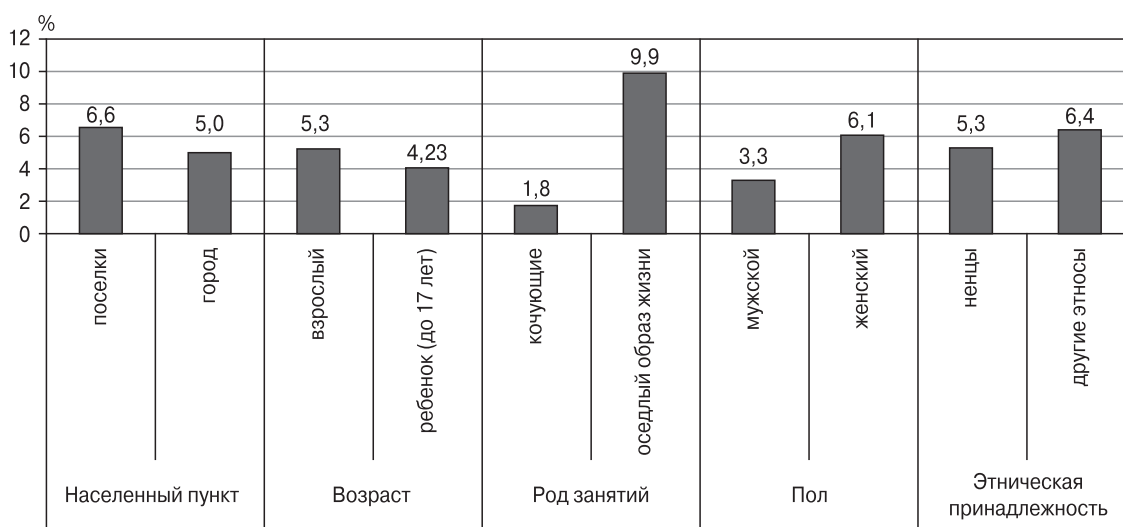
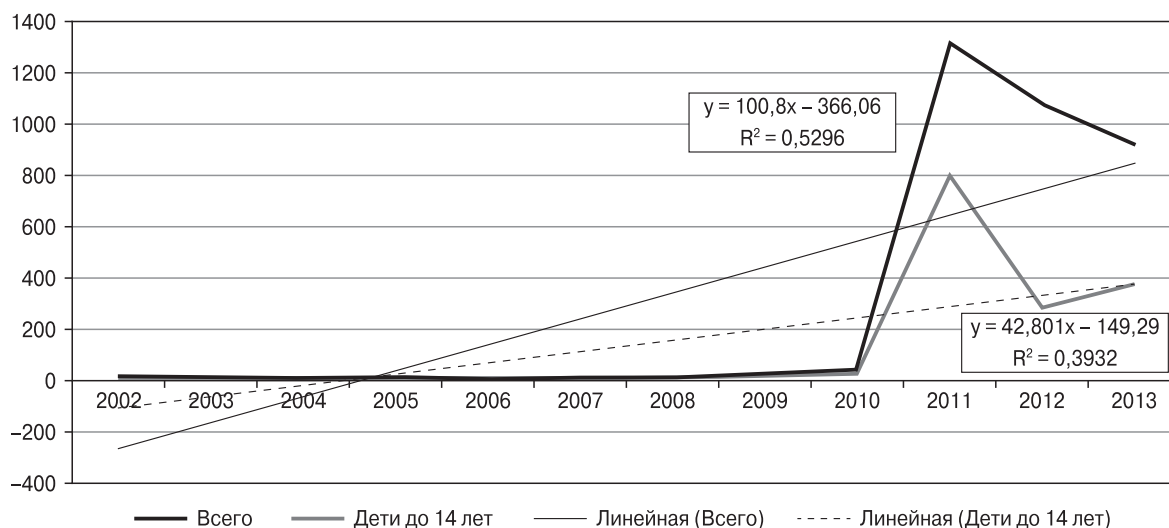


Рисунок 1. Уровень пораженности лямблиозом различных категорий населения НАО



**Рисунок 2. Динамика заболеваемости лямблиозом в НАО за период с 2002–2013 гг. (в абсолютных цифрах)**

При сравнении уровня пораженности лямблиозом у различных категорий обследуемых с помощью таблиц сопряженности ( $\chi^2$  Пирсона) выявлены статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) в следующих категориях: в зависимости от места проживания ( $p = 0,001$ ,  $\chi^2 = 13,3270$ ) и от рода занятий ( $p = 0,005$ ,  $\chi^2 = 10,603$ ). Более низкие показатели лямблиозной инвазии наблюдались у кочующих оленеводов по сравнению с ведущими оседлый образ жизни. Это может быть связано с врожденной толерантностью кочующего населения к лямблиозу, а также приспособительными механизмами к экстремальным погодным и геофизическим факторам высоких широт у этой категории населения, выработанными ими в результате естественного отбора в процессе многих поколений и обеспечивающими им сохранение здоровья [3]. У пришлого населения, ведущего оседлый образ жизни, вследствие отсутствия врожденной невосприимчивости к заражению лямблиозом, как правило, регистрировались высокие показатели иммунологических реакций. Более высокие показатели лямблиозной инвазии среди сельского населения связаны с отсутствием в округе системы канализации и водопровода, что обуславливает попадание в открытые водоемы цист лямблий, так как население округа употребляет в пищу талую воду (снег, лед), воду из открытых водоемов (рек, озер, ручьев). Не выявлено статистически значимых различий по критерию этнической и половой принадлежности. Это может свидетельствовать о тенденции одинаково низких значений выявляемых параметров, снижении числа обследуемого населения на паразитозы. По ре-

зультатам скрининговых иммуноферментных исследований можно судить только о факте встречи паразита и хозяина, а подтверждение факта наличия заболевания лямблиозом при положительных ИФА-результатах проверялось другими микроскопическими методами. Положительный ответ выдавался при обнаружении вегетативных форм или цист простейших с указанием интенсивности инвазии (число паразитов в поле зрения); отрицательный — только после 3-кратного исследования материала с промежутками в 2–3 дня.

## Выводы

Результаты проведенных исследований свидетельствуют об отсутствии в НАО тенденции к снижению уровня заболеваемости лямблиозом и о существующей тенденции к ее увеличению, что связано с неудовлетворительными санитарно-гигиеническими условиями жизни в ненецких поселках, скученностью проживания, отсутствием в большинстве населенных пунктов централизованных систем водоснабжения и канализации, способствующих широкому распространению паразитарных заболеваний. Недооценивается органами и учреждениями здравоохранения влияние лямблиоза на здоровье населения, особенно детей, в связи с чем профилактика лямблиоза часто сводится лишь к лечению выявленных инвазированных лиц. Для проведения рациональной лечебной и диагностической работы по отношению к инфицированным лямблиями лицам необходимо установление степени патогенности организма лямблиозом путем проведения скрининговых лабораторных исследований на лямблиоз.

## Список литературы/References

1. Авдюхина Т.И., Константинова Т.Н., Кучеря Т.В., Горбунова Ю.П. Лямблиоз. Учебное пособие. М.: РМАПО, 2003. 32 с. [Avdjuhina T.I., Konstantinova T.N., Kucherja T.V., Gorbunova Yu.P. Lyamblioz. Uchebnoe posobie [Lambliasis. Textbook]. Moscow: Russian Medical Academy of Post-Graduate Education, 2003. 32 p.]
2. Бобырева Н.С., Шипина Л.С., Дегтева Г.Н. Видовой состав паразитов и степень их распространенности в Ненецком автономном округе // Экология человека. 2013. № 12. С. 20–25. [Bobyreva N.S., Schipina L.S., Degteva G.N. The species composition of parasites and their incidence in the Nenets Autonomous Okrug. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2013, no. 12, pp. 20–25. (In Russ.)]
3. Борзунов В.М., Веревищев В.К., Донцов Г.И., Зверева Л.И., Кузнецов П.Л. Протозойные инвазии и гельминтозы человека. Екатеринбург: Уральская государственная медицинская академия, 2004. 171 с. [Borzunov V.M., Verevshikov V.K., Doncov G.I., Zvereva L.I., Kuznecov P.L. *Protozoinye invazii i gel'mintozy cheloveka* [Protozoal infestations and human helminthiasis]. Ekaterinburg: Ural State Medical Academia, 2004. 171 p.]
4. Доклад Комитета экспертов. Профилактика кишечных паразитарных инвазий и борьба с ними: Сер. техн. докл. Всемирная организация здравоохранения, 1988. 90 с. [The report of experts committee. Profilaktika kischechnykh parazitarnykh invazii i bor'ba s nimi. Ser. tekhn. dokl. [The report of experts committee. Prevention of intestinal parasitic infestations and control: Tech. Rep. Ser.]. World Health Organization, 1988. 90 p. (In Russ.)]
5. О санитарно-эпидемиологической обстановке в НАО за 2013 год: Государственный доклад Управления Роспотребнадзора по НАО за 2013 год. 79 с. Режим доступа: [http://83.rospotrebnadzor.ru/c/journal/view\\_article\\_content?groupId=10156&articleId=121186&version=1.1](http://83.rospotrebnadzor.ru/c/journal/view_article_content?groupId=10156&articleId=121186&version=1.1). Дата обращения: 28.12.2014 [O sanitarno-epidemiologicheskoi obstanovke v NAO za 2013 god: Gosudarstvennyi doklad Upravleniya Rospotrebnadzora po NAO za 2013 god [On the state sanitary-epidemiological of welfare of the population in the Nenets Autonomous District in 2013: State report]. 2013. 79 p.]
6. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 г.: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2014. 191 с. Режим доступа: [http://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/3b8/gd\\_2013\\_dlya-sayta.pdf](http://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/3b8/gd_2013_dlya-sayta.pdf). Дата обращения: 28.12.2014 [O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiiskoi Federatsii v 2013 godu: Gosudarstvennyi doklad [On the state sanitary-epidemiological of welfare of the population in the Russian Federation in 2013: State report]. Moscow: The Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 2014. 191 p.]
7. Осипова С.О. Иммунологические аспекты лямблиоза (обзор литературы) // Медицинская паразитология. 1982. № 5. С. 57–62. [Osipova S.O. Immunological aspects of giardiasis (review). *Meditsinskaya parazitologiya = Medical Parasitology*, 1982, no. 5, pp. 57–62. (In Russ.)]
8. Hanevik K., Kristoffersen E., Svard S., Bruserud O., Ringqvist E., Sørnes S., Langeland N. Human cellular immune response against *Giardia lamblia* 5 years after acute giardiasis. *J. Infect. Dis.*, 2011, vol. 204, no. 11, pp. 1779–1786.
9. WHO. Expert Committee. Intestinal protozoan and helminthic infections. *WHO Tech. Rep. Ser.*, 1981, no. 58, pp. 666–671.

**Авторы:**

**Бобырева Н.С.**, аспирант кафедры иммунологии и микробиологии СГМУ, младший научный сотрудник НИИ Арктической медицины ГБОУ ВПО СГМУ МЗ РФ, г. Архангельск, Россия;

**Дегтева Г.Н.**, д.м.н., профессор кафедры гигиены и медицинской экологии, директор НИИ Арктической медицины ГБОУ ВПО СГМУ МЗ РФ, г. Архангельск, Россия.

**Authors:**

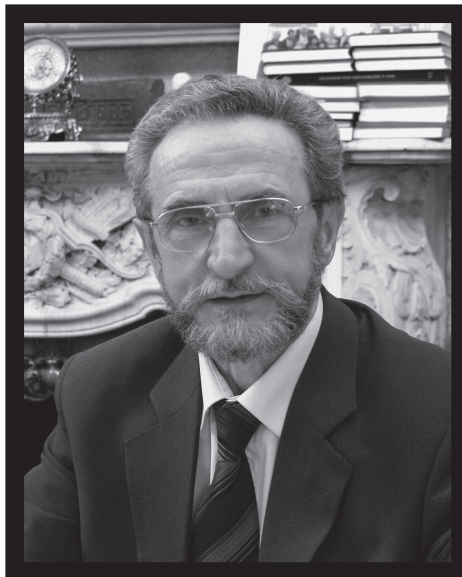
**Bobyreva N.S.**, PhD Candidate, Department of Immunology and Microbiology; Junior Researcher, Institute of Arctic Medicine, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation;

**Degteva G.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Hygiene and Medical Ecology, Director of the Institute of Arctic Medicine, Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.02.2015  
Отправлена на доработку 17.03.2015  
Принята к печати 24.06.2015

Received 24.02.2015  
Revision received 17.03.2015  
Accepted 24.06.2015

## ПАМЯТИ АНАТОЛИЯ БОРИСОВИЧА ЖЕБРУНА



Редакционная коллегия журнала «Инфекция и иммунитет» с глубоким прискорбием извещает, что 3 сентября 2015 года в возрасте 73 лет трагически ушел из жизни директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, главный редактор журнала «Инфекция и иммунитет» Анатолий Борисович Жебрун.

Анатолий Борисович родился 19 июня 1942 года в деревне Пиняны Пружанского района Брестской области. После окончания в 1965 году Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова проходил службу на Северном флоте. В 1968 году, став сотрудником лаборатории профессиональных заболеваний военно-морского флота, А.Б. Жебрун в составе медицинской группы принял участие в продолжительной морской экспедиции, по результатам которой в 1974 году им была защищена кандидатская диссертация. В 1975 году А.Б. Жебрун демобилизовался из Военно-Морского Флота в звании майора медицинской службы. С 1975 по 1977 годы был младшим научным сотрудником НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова.

Вся последующая деятельность Анатолия Борисовича была неразрывно связана с Санкт-Петербургским НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, куда в 1977 году он был принят на должность младшего научного сотрудника лаборатории детских бактериальных инфекций. В 1982 году А.Б. Жебрун стал руководителем лаборатории иммунологии и микробиологии детских бактериальных инфекций. В 1987 году защитил докторскую диссертацию. В 1994 году возглавил Институт, заняв пост директора. В 2004 году был избран членом-корреспондентом РАМН, а в 2014 году стал членом-корреспондентом РАН.

А.Б. Жебрун теоретически обосновал и совместно с учениками создал в России новую отрасль биотехнологии — тонкую иммунохимию, впервые внедрил в стране технологии нового поколения, основанные на биоафинной хроматографии. Обосновал и внес личный вклад в создание технологии производства первой в мировой практике противогриппозной вакцины для детей.

Под руководством А.Б. Жебруна в Институте имени Пастера были разработаны и реализованы на федеральном уровне новые прогрессивные технологии эпидемиологического надзора за актуальными инфекционными заболеваниями, в том числе за туберкулезом, полиомиелитом, вирусными гепатитами А, В, С, дифтерией, корью, краснухой, ВИЧ-СПИДом и др.

Анатолий Борисович внес важный вклад в разработку современных проблем контроля и ликвидации инфекционных болезней. Организовал на базе института имени Пастера субнациональные центры по ликвидации полиомиелита, кори и краснухи.



В последние годы профессиональные интересы А.Б. Жебруна были сконцентрированы на разработке проблем биоразнообразия и эволюции патогенных агентов, идентификации эпидемических клонов, доминирующих генетических линий патогенных микроорганизмов. Исследования по применению методов генотипирования и молекулярного маркирования возбудителей в изучении эпидемического процесса вывели возглавляемый им институт на передовые позиции в стране, а по ряду направлений — в мире.

А.Б. Жебрун внес большой вклад в укрепление международного авторитета отечественной медицинской науки. Активно развивал деятельность Санкт-Петербургского Института Пастера в международной Ассоциации пастеровских институтов. Успешно направлял международную научную кооперацию на актуальные для России проблемы здравоохранения. Лично являлся координатором Российско-Финляндской программы борьбы с инфекционными болезнями. За укрепление и развитие научных и культурных связей с Францией награжден Национальным орденом Французской Республики «За заслуги».

А.Б. Жебрун — автор и соавтор более 300 научных трудов, в том числе 4 монографий, 2 руководств, 2 учебных пособий, 3 книг, 32 изобретений и патентов, член редколлегий журналов «Эпидемиология и инфекционные болезни» и «Журнала эпидемиологии, микробиологии, иммунологии», с 2011 года — главный редактор журнала «Инфекция и иммунитет»

В течении многих лет Анатолий Борисович входил в состав правления Всероссийского научного общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов им. И.И. Мечникова, возглавлял Отделение общества по Санкт-Петербургу и Ленинградской области.

За высокие заслуги награжден орденом Почета, медалями «За безупречную службу в Вооруженных Силах СССР» II и III степени, «За воинскую доблесть», Национальным орденом Французской Республики «За заслуги», Почетным знаком Всемирной Организации Здравоохранения и др.

Анатолий Борисович на протяжении всей своей трудовой деятельности отдавал все свои силы развитию микробиологии и эпидемиологии в нашей стране и за ее пределами. Светлая память об Анатолии Борисовиче Жебруне навсегда останется в наших сердцах.

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте.

### Основные виды статей, публикуемых в журнале

#### Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

#### Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

#### Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

### Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

#### Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

#### Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

#### Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

### Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, кДа и т.д.).

### Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

#### Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

**Таблицы.** Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей.

Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (\*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (\*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

**Рисунки (графики и фотографии).** В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

#### Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

#### Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
  - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
    - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
    - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
    - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
    - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
    - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
    - полное название статьи, направляемой в редакцию;
    - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
    - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
    - дата отправления работы.
  - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)
  - 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
    - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
    - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);

- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
  - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
  - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
  - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
  - 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок\_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
  - 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
  - 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
  - 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.), редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы <a href="http://www.e-library.ru">www.e-library.ru</a> . DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://immun.ru>) в рубрике «Рецензирование» раздела «О журнале».

**Вы можете оформить подписку на журнал  
 «Инфекция и иммунитет» через отделения связи:  
 Каталог «Роспечать» — индекс 95001;  
 Объединенный каталог «Пресса России» и электронный каталог «Российская периодика»  
 в сети Internet на сайте [www.aprk.org](http://www.aprk.org) — индекс 41392.  
 Цена свободная.  
 Подписка на электронную версию журнала  
 на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**



## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Алешкин В.А. ....	225	Копылов П.Х. ....	201
Анисимов А.П. ....	201	Крюков А.И. ....	225
Баркова Е.П. ....	273	Кулешевич Е.В. ....	233
Батищева Т.Л. ....	219	Кунельская Н.Л. ....	225
Благодравова А.С. ....	243	Лисаков А.Н. ....	273
Бобырева Н.С. ....	279	Мордык А.В. ....	219
Борисова О.Ю. ....	225	Морозова О.В. ....	243
Бурова Л.А. ....	233	Нагиева Ф.Г. ....	273
Буторов Е.В. ....	253	Никулина В.Г. ....	273
Гаврилова М.В. ....	273	Новикова Н.А. ....	243
Гайдерова Л.А. ....	273	Пигаревский П.В. ....	233
Грудинин М.П. ....	265	Пименова А.С. ....	225
Гуров А.В. ....	225	Писарева М.М. ....	265
Дегтева Г.Н. ....	279	Послова Л.Ю. ....	243
Дентовская С.В. ....	201	Пузырева Л.В. ....	219
Елпаева Е.А. ....	265	Сашина Т.А. ....	243
Епифанова Н.В. ....	243	Сергеева А.В. ....	243
Ефимов Б.А. ....	225	Снегова В.А. ....	233
Жарков Д.А. ....	233	Товмасын А.С. ....	225
Кадникова Л.А. ....	201	Тотоян Артем А. ....	233
Кафарская Л.И. ....	225	Федотов А.Ю. ....	273
Киселев О.И. ....	265	Шадрин Г.Б. ....	225
Ковалишена О.В. ....	243	Шален К. ....	233
Комиссаров А.Б. ....	265		

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аденовирусы.....	243	периферическая кровь.....	273
активация лимфоцитов.....	273	постинфекционный гломерулонефрит.....	233
аналоги нуклеоз(т)идов.....	265	протозоозы.....	279
астровирусы.....	243	проточная цитометрия.....	273
ВААРТ.....	253	ПЦР.....	265
вирус гепатита В.....	265	реактивность организма.....	219
вирусная нагрузка.....	253	ротавирусы.....	243
вирусы гриппа.....	273	ротоглотка.....	225
ВИЧ-инфекция.....	253	секвенирование.....	265
диагностические тесты.....	219	социальные больные.....	219
иммунные комплексы.....	233	стафилококки.....	225
иммуногенез.....	201	стрептококки.....	225
интерфероновые рецепторы.....	273	труднодоступные регионы	
инfiltrативный туберкулез.....	219	Арктической зоны РФ.....	279
кандида.....	225	туберкулез.....	219
капсульный антиген.....	201	фактор патогенности.....	201
коренное население.....	279	хронический гепатит В.....	265
коринебактерии.....	225	хронический тонзиллит.....	225
кочевой образ жизни.....	279	чума.....	201
культивирование in vitro.....	273	экспрессия рецепторов.....	273
лямблиоз.....	279	эндогенная интоксикация.....	219
микробный пейзаж.....	225	Saf.....	201
микробиота.....	225	CD4 лимфоциты.....	253
молекулярно-генетический мониторинг.....	243	F1.....	201
моноклеарные клетки.....	273	Fc-рецепция.....	233
мутации.....	265	IgG.....	233
ненцы.....	279	L-аргинин.....	253
норовирусы.....	243	L-лизин.....	253
оседлый образ жизни.....	279	MALDI-TOF MS.....	225
острая кишечная инфекция.....	243	<i>Streptococcus pyogenes</i> .....	233
патогенез.....	201	<i>Yersinia pestis</i> .....	201



## VII Всероссийская с международным участием школа-конференция по клинической иммунологии

### «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

31 января – 6 февраля 2016 года  
Пушкинские Горы, Псковская область

#### Организаторы:

- Санкт-Петербургское региональное отделение Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов
- Российское научное общество иммунологов
- Российское цитокиновое общество
- Институт иммунологии ФМБА России
- Институт экспериментальной медицины
- Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
- Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

#### В программе школы:

- Лекции ведущих российских иммунологов
- Лекции зарубежных специалистов
- Семинары по практическим вопросам иммунологии

#### Пакет слушателя включает:

- Посещение лекций и семинаров
- Проживание
- 3-разовое питание
- Ежедневная культурная программа

**Всем слушателям будут выданы удостоверения о тематическом усовершенствовании  
установленного образца**

#### Координатор проекта:

**член-корр. РАН, профессор Тотолян Арег Артемович**

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора

Тел./факс: (812) 232-00-66

E-mail: [totolian@spbraaci.ru](mailto:totolian@spbraaci.ru)

**Заявки подавать до 1 декабря 2015 года.**

**Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна**

Тел./факс: (812) 233-08-58

E-mail: [shkola@spbraaci.ru](mailto:shkola@spbraaci.ru)

Адрес для корреспонденции: 197136, Санкт-Петербург, а/я 58, СПб РО РААКИ

[www.spbraaci.ru](http://www.spbraaci.ru)

[www.allergologi-immunologi.ru](http://www.allergologi-immunologi.ru)



**Подписной индекс:**  
Роспечать – 95001  
Пресса России – 41392

